

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
“Profesor Fermín Capitán García”



UNIVERSIDAD DE GRANADA

TESIS DOCTORAL
PROGRAMA DE DOCTORADO EN FARMACIA

**BIOINDICADORES MARINOS
EN EL ESTUDIO MEDIOAMBIENTAL Y
TRANSFERENCIA A LA CADENA TRÓFICA DE
CONTAMINANTES QUÍMICOS**

María Teresa García Córcoles

Granada, 2021

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: María Teresa García Córcoles
ISBN: 978-84-1306-975-3
URI: <http://hdl.handle.net/10481/69878>

No has llegado tarde, no has llegado temprano.

Estás justo a tiempo.

*A mi ángel en el cielo, mamá,
y a mi ángel en la tierra, papá.*

Resumen

La presente Tesis Doctoral se centra principalmente en el estudio de la presencia de contaminantes emergentes de origen antropogénico (bisfenoles, parabenos, filtros ultravioleta, compuestos perfluorados, triclosán y triclocarbán) en medios acuáticos y su capacidad de bioacumulación y biomagnificación a través de dos bioindicadores marinos de la contaminación: *Mytilus galloprovincialis* (mejillón mediterráneo) y *Holothuria tubulosa* (pepino de mar). Se propone el desarrollo de una nueva metodología para la determinación de los analitos seleccionados en estos bioindicadores y en el entorno natural de los mismos, aplicando técnicas de tratamiento de muestra y limpieza de extractos y análisis mediante cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem de triple cuadrupolo (UHPLC-MS/MS).

Debido a la actividad humana, numerosos contaminantes dañinos para la salud humana y otros muchos potencialmente peligrosos, ingresan continuamente en el medio ambiente, pudiendo incorporarse finalmente a la cadena trófica a través de los eslabones más bajos de la misma. En la actualidad, este hecho se está convirtiendo en una grave preocupación social y científica. Por este motivo, ha surgido una importante necesidad de estudiar, controlar y poner de manifiesto (denunciar), por parte de la comunidad científica, la presencia de una gran cantidad de compuestos químicos en el medioambiente, entre ellos se incluyen numerosos compuestos que aparecen en productos de cuidado personal ampliamente empleados en su día a día por la población. Estos compuestos emergentes, en su mayor parte de origen antropogénico, están demostrando tener una importante actividad carcinogénica, mutagénica o disruptora endocrina en los organismos vivos. Además, se han estudiado y demostrado efectos acumulativos de modo que están siempre presentes en sedimentos o aguas, desde donde pueden llegar a animales y plantas magnificando el problema.

Más del 40% de las aguas del mundo están afectadas por las actividades humanas. Una vez contaminados los medios acuáticos, los contaminantes pueden entrar en la cadena trófica a través de numerosas vías. El estudio de organismos vivos, a modo de bioindicadores, nos va a permitir determinar la

magnitud de esta contaminación en una determinada zona y además poner de manifiesto su incorporación al ciclo alimenticio, lo que los hace aun mas peligrosos. Un *bioindicador* es una especie biológica capaz de responder a la variación de un determinado factor ambiental con el cambio de magnitud en una o más variables de su propio organismo y con ello permiten conocer la “biodisponibilidad” de los contaminantes.

Aunque se han llevado a cabo algunos estudios en los que se han empleado estas especies como bioindicadores, estos se centran principalmente en metales pesados y compuestos orgánicos persistentes como PCBs (bifenilos policlorinados) o PAHs (hidrocarburos aromáticos policíclicos). Sin embargo, y según la extensa bibliografía consultada, ninguno de estos estudios se enfoca en contaminantes como los seleccionados para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, ya que el objetivo es el estudio de compuestos considerados como contaminantes emergentes no contemplados en estas investigaciones anteriores.

Como resultado de las investigaciones realizadas a lo largo de estos años y presentadas en la presente Tesis Doctoral:

- A. Se han elaborado dos estudios de revisión sobre los métodos analíticos para la determinación de contaminantes emergentes en aguas naturales, residuales y en lodos de depuradora, publicados en revistas científicas internacionales de alto impacto (Capítulo II):
 - o **María Teresa García-Córcoles**, Rocío Rodríguez-Gómez, Blanca de Alarcón-Gómez, Morsina Çipa, Laura Martín-Pozo, Jean M. Kauffmann, Alberto Zafra-Gómez. Chromatographic methods for the determination of emerging contaminants in natural water and wastewater samples: a review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 49:2 (2019) 160-186. DOI: [10.1080/10408347.2018.1496010](https://doi.org/10.1080/10408347.2018.1496010).
 - o Laura Martín-Pozo, Blanca de Alarcón-Gómez, Rocío Rodríguez-Gómez, **María Teresa García-Córcoles**, Morsina Çipa, Alberto Zafra-Gómez. Analytical methods for the determination of emerging contaminants in

sewage sludge samples. A review. *Talanta*, 192 (2019) 508-533. DOI: [10.1016/j.talanta.2018.09.056](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.056).

- B. Se ha desarrollado un nuevo método multiresiduo para la determinación de parabenos, bisfenoles y triclocarbán en muestras de mejillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*) con grandes prestaciones analíticas en cuanto a exactitud (veracidad y precisión), sensibilidad y selectividad. Esta investigación se ha enviado recientemente para su publicación en la revista científica internacional de alto impacto *Environmental Research*, encontrándose en la actualidad en fase de revisión por pares (Capítulo III):
- o **María Teresa García-Córcoles**, Laura García-Fernández, Felix Hidalgo, Alberto Navalón, Alberto Zafra-Gómez. Analytical Method for the Determination of Chemical Endocrine Disruptors in Mediterranean Mussel (*Mytilus Galloprovincialis*) Using Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. En revisión. 2021.
- C. Se ha llevado a cabo un estudio profundo de bioacumulación en especímenes de *Holothuria tubulosa* en un medio marino contaminado con cantidades elevadas de numerosos contaminantes con demostrada actividad como disruptores endocrinos. Esta investigación, se extendió durante un año y se realizó en colaboración con el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Sevilla. Los excelentes resultados obtenidos han sido publicados en dos revistas científicas internacionales de muy alto impacto (Capítulo IV):
- o Julia Martín, Félix Hidalgo, **María Teresa García-Córcoles**, Alejandro José Ibáñez-Yuste, Esteban Alonso, José Luis Vílchez, Alberto Zafra-Gómez. Bioaccumulation of perfluoroalkyl substances in marine echinoderms: Results of laboratory-scale experiments with *Holothuria tubulosa* Gmelin, 1791. *Chemosphere* 215 (2019) 261-271. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2018.10.037](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.037).

- Julia Martín, Félix Hidalgo, Esteban Alonso, **María Teresa García-Córcoles**, José Luis Vílchez, Alberto Zafra-Gómez. Assessing bioaccumulation potential of personal care, household and industrial products in a marine echinoderm (*Holothuria tubulosa*). *Science of the Total Environment* 720 (2020) 137668. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2020.137668](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137668).

- D. De manera complementaria al trabajo de laboratorio realizado, se ha colaborado en la elaboración y publicación de un libro a modo de monografía y dos capítulos de libro, relacionados con la temática de la presente tesis doctoral.
 - Rocío Rodríguez-Gómez, **María Teresa García-Córcoles**, Alberto Zafra-Gómez. 2018. Determinación de contaminantes residuales en muestras de agua natural y residual. Editado por la Editorial Académica Española, International Book Market Service Ltd., OmniScriptum Publishing Group, Beau Bassin, Mauritius. Monografía. ISBN: 978-620-2-10893-5.

 - Sergio López Martínez, **María Teresa García-Córcoles**, José Luis Vílchez Quero, Alberto Zafra Gómez. 2017. Biodegradation of Drugs in Agricultural Soil Amended with Sewage Sludge from Wastewater Treatment Plants. An Overview, in *Agricultural Research Update*, Vol 17. Edited by Prathmamesh Gorawala and Srushti Mandhatri. Nova Science Publishers, Inc. New York, USA. ISBN: 978-1-53610-907-8.

 - Alberto Zafra-Gómez, Laura Martín-Pozo, María del Carmen Gómez-Regalado, **María Teresa García Córcoles**. 2022. Removal of Quinolone Antibiotics from Wastewaters and Sewage Sludge, in: *Emerging Contaminants in the Environment*. Edited by Hemen Sarma, Delfina C. Domínguez, Wen-Yee Lee. Elsevier Inc. Philadelphia, PA, USA. Aceptado para su publicación (Fecha de publicación: 01/01/2022).

Para finalizar, y de forma complementaria al desarrollo de la presente Tesis Doctoral, durante mi estancia en el departamento de Química Analítica de la

Universidad de Granada, he desarrollado otros trabajos científicos también publicados en revistas científicas internacionales de alto impacto:

- **María Teresa García-Córcoles**, Morsina Cipa, Rocío Rodríguez-Gómez, Ana Rivas, Fátima Olea-Serrano, José Luís Vilchez, Alberto Zafra-Gómez. Determination of bisphenols with estrogenic activity in plastic packaged baby food samples using solid-liquid extraction and *clean-up* with dispersive sorbents followed by gas chromatography tandem mass spectrometry analysis. *Talanta* 178 (2018) 441-448. DOI: [10.1016/j.talanta.2017.09.067](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.067).
- Rocío Rodríguez-Gómez, **María Teresa García-Córcoles**, Morsina Cipa, Dolores Barrón, Alberto Navalón, Alberto Zafra-Gómez. Determination of quinolone residues in raw cow milk. Application of polar stir-bars and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A* 35:6 (2018) 1127-1138. DOI: [10.1080/19440049.2018.1430382](https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1430382).

Índice

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	1
OBJETO DE LA TESIS	7
INTRODUCCIÓN.....	11
1. CONTAMINANTES EMERGENTES	13
2. DISRUPTORES ENDOCRINOS. ANALITOS SELECCIONADOS	16
2.1. Disruptores endocrinos químicos objeto de estudio	18
2.2.1. <i>Parabenos</i>	18
2.2.2. <i>Triclosán y triclocarbán</i>	20
2.2.3. <i>Bisfenoles</i>	22
2.2.4. <i>Compuestos orgánicos perfluorados</i>	24
2.2.5. <i>Benzofenonas</i>	25
2.2. Disruptores endocrinos químicos en el medio marino.....	27
3. BIOINDICADORES MARINOS	29
3.1. Mejillón mediterráneo (<i>Mytilus galloprovincialis</i>) como bioindicador de contaminación marina	30
3.2. Pepino de mar (<i>Holothuria tubulosa</i>) como bioindicador de contaminación marina.....	35
CAPÍTULO I. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
1. REACTIVOS Y DISOLVENTES	43
2. MATERIAL DE LABORATORIO	45

3. INSTRUMENTACIÓN	46
4. PROGRAMAS INFORMÁTICOS.....	48
5. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ULTRA ALTA RESOLUCIÓN ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM	49
6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS ANALÍTICOS.....	56
6.1. Optimización de variables. Diseño de experimentos	56
6.2. Calibración analítica.....	62
6.3. Validación del método analítico	62

CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS NATURALES Y RESIDUALES Y LODOS DE DEPURADORA	67
1. INTRODUCCIÓN	69
2. DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS NATURALES Y RESIDUALES. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS	71
3. DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES EN LODOS DE DEPURADORA. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS	142

CAPÍTULO III. IDENTIFICACION Y DETERMINACIÓN DE EDCs EN MUESTRAS DE MEJILLÓN MEDITERRÁNEO (<i>Mytilus galloprovincialis</i>). ESTUDIOS DE BIOACUMULACIÓN	213
---	------------

1. OBJETIVOS	215
--------------------	-----

2. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS	216
3. CARACTERIZACIÓN DE LOS EDCs ESTUDIADOS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM	221
4. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	224
4.1. Elección de la fase estacionaria	224
4.2. Elección de la fase móvil y optimización del gradiente	224
5. OPTIMIZACIÓN DEL TRATAMIENTO DE MUESTRA.....	229
5.1. Toma y pretratamiento de muestras.....	229
5.2. Optimización del proceso de extracción.....	231
5.2.1. Selección del disolvente de extracción y optimización del volumen del mismo	231
5.2.2. Optimización de extracción asistida por ultrasonidos	235
5.2.3. Optimización del proceso de limpieza del extracto	236
5.2.4. Procedimiento final optimizado	240
5.3. Calibración del método analítico	242
5.4. Validación del método analítico.....	246
5.4.1. Linealidad y rango dinámico lineal	246
5.4.2. Sensibilidad.....	247
5.4.3. Exactitud.....	247
5.4.4. Selectividad	250
5.5. Aplicación del método analítico	252
 CAPÍTULO IV. ESTUDIOS DE BIOACUMULACIÓN DE LOS EDCs SELECCIONADOS EN HOLOTHURIA TUBULOSA.....	257
1. OBJETIVOS	259
2. BIOACUMULACIÓN DE CONTAMINANTES	260

3. ESTUDIO DE BIOACUMULACIÓN/BIODEGRADACIÓN.....	263
3.1. Captura de los animales en su medio	263
3.2. Estudio de laboratorio.....	263
3.2.1. <i>Diseño experimental</i>	265
3.2.2. <i>Toma de muestras</i>	265
3.2.3. <i>Tratamiento de muestra</i>	266
3.2.4. <i>Análisis de las muestras</i>	267
3.2.5. <i>Calibración metodológica y control de calidad</i>	269
4. ESTUDIO DE BIOACUMULACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS PERFLUORADOS	270
4.1. Distribución de PFAS en agua y sedimentos	270
4.2. Distribución entre agua y sedimentos marinos	275
4.3. Bioacumulación de PFAS en <i>Holothuria tubulosa</i>	276
4.4. Factor de bioacumulación (BAF) y factor de acumulación biota- sedimento (BASF).....	280
5. ESTUDIO DE BIOACUMULACIÓN DE BISFENOLES, PARABENOS, BENZOFENONA-3, TRICLOSÁN Y TRICLOCARBÁN	292
5.1. Distribución de PCPs en agua y sedimentos	292
5.2. Bioacumulación de PCPs en <i>Holothuria tubulosa</i>	297
5.3. Factor de bioconcentración (BCF) y factor de acumulación biota- sedimento (BASF).....	299
CAPITULO V. CONCLUSIONES	311
ANEXO I. Publicaciones de la Tesis	317
ANEXO II. Otras publicaciones	329

Acrónimos y abreviaturas

AcEt	Acetato de etilo
ACN	Acetonitrilo
BPA	Bisfenol A <i>2,2-Bis(4-hidroxifenil)propano</i>
BPA-d ₁₆	Bisfenol A deuterado <i>2,2-Bis(4-hidroxifenil)propano-d₁₆</i>
BPAF	Bisfenol AF <i>2,2-Bis(4-hidroxifenil)hexafluoropropano</i>
BisPB	Bisfenol B <i>2,2-Bis(4-hidroxifenil)butano</i>
BP-3	Benzofenona 3 <i>2-Hidroxi-4-metoxi-benzofenona</i>
BP-d ₁₀	Benzofenona deuterada
BPE	Bisfenol E <i>1,1-Bis(4-hidroxifenil)etano</i>
BPF	Bisfenol F <i>Bis(4-hidroxifenil)metano</i>
BPP	Bisfenol P <i>4,4'-(1,4-Fenilendilsopropilideno)bisfenol</i>
BPS	Bisfenol S <i>Bis(4-Hidroxifenil)sulfona</i>
BPs	Bisfenoles
BPB	Butilparabeno. <i>4-hidroxibenzoato de butilo</i>
C18	Octadecilsilano
CAS	Chemical abstracts service
DBB	Diseño experimental Box-Behnken
d-SPE	Extracción en fase sólida dispersiva

EDAR	Estación de depuración de aguas residuales
EDCs	Disruptores endocrinos químicos
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EPB	Etilparabeno <i>4-hidroxibenzoato de etilo</i>
EPB-d ₅	Etilparabeno deuterado <i>4-hidroxibenzoato de etilo-d₅</i>
ESI	Ionización por electrospray
FDA	US Food and Drug Administration
GC	Cromatografía de gases
ICH	Consejo Internacional sobre armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LC	Cromatografía de líquidos
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
MAE	Extracción asistida por microondas
MeOH	Metanol
MPB	Metilparabeno <i>4-hidroxibenzoato de metilo</i>
MRM	Multiple reaction monitoring
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
m/z	Relación masa/carga
PBs	Parabenos
PCPs	Productos de cuidado personal
PFAS	Compuestos orgánicos perfluorados

PFBuA	Ácido perfluorobutírico <i>Ácido heptafluoro-1-butanoico</i>
PFPeA	Ácido perfluoropentanoico <i>Ácido nonafluorovalerico</i>
PFHxA	Ácido perfluorohexanoico <i>Ácido undecafluoro-1-hexanoico</i>
PFHpA	Ácido perfluoroheptanoico <i>Ácido tridecafluoroheptanoico</i>
PFOS	Ácido perfluorooctano sulfónico <i>Ácido heptadecafluoro-1-octanosulfónico</i>
PFOA	Ácido perfluorooctanoico <i>Ácido pentadecafluoro-1-octanoico</i>
PFOA- ¹³ C ₄	Ácido perfluorooctanoico marcado <i>Ácido 5,6,7,8-¹³C₄-Perfluorooctanoico</i>
PhPB	Fenilparabeno <i>4-hidroxibenzoato de fenilo</i>
PPB	Propilparabeno <i>4-hidroxibenzoato de propilo</i>
PPCPs	Fármacos y productos de cuidado personal
PSA	Amina primaria secundaria
QDA	Detector de masas de cuadrupolo simple
QqQ	Triple cuadrupolo
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (Rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro)
RDL	Rango dinámico lineal
RSD	Desviación estándar relativa
SD	Desviación estándar
SRM	Selected reaction monitoring

TCC	Triclocarbán <i>1-(4-Clorofenil)-3-(3,4-diclorofenil)urea</i>
TCS	Triclosán <i>5-Cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol</i>
TQ-XS	Detector de masas de triple cuadrupolo
UAE	Extracción con ultrasonidos (Ultrasound assisted extraction)
UHPLC/UPLC	Cromatografía de líquidos de ultra alta resolución

Objeto de la Tesis

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es el estudio de la presencia de numerosos contaminantes en el medio acuático y su capacidad de bioacumulación y biomagnificación en dos bioindicadores marinos de gran interés medioambiental por sus características: el mejillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*) y el pepino de mar (*Holothuria tubulosa*). Como contaminantes objeto de estudio se han elegido el bisfenol A y algunos de sus análogos, los compuestos orgánicos perfluorados, y algunos productos de cuidado personal de elevado uso en la actualidad como son los parabenos, los filtros ultravioleta de tipo benzofenona, y los antimicrobianos triclosán y triclocarbán. Estos analitos han sido seleccionados principalmente en base a su actividad como disruptores endocrinos y su presencia ubicua en el medioambiente como consecuencia de su uso masivo en numerosas actividades cotidianas del ser humano.

Los objetivos concretos de esta Memoria de Doctorado son los planteados a continuación:

1. Elaborar una revisión exhaustiva de la información existente hasta la fecha en relación a los contaminantes seleccionados a nivel de su determinación analítica en medios acuáticos de interés para esta investigación. Este primer objetivo corresponde al **Capítulo II**. Los contaminantes llegan a los medios marinos a partir de las aguas residuales principalmente. Es por esto de interés conocer previamente el estado del arte en este campo.
2. Desarrollar métodos analíticos de buenas características para la detección y cuantificación de los contaminantes seleccionados en uno de los bioindicadores seleccionados: *Mytilus galloprovincialis*. Se emplearán procedimientos de extracción y de limpieza de los extractos (*clean-up*), así como metodología analítica para la caracterización de los analitos diana mediante técnicas cromatográficas. Se pretenden estudiar en profundidad los parámetros que pueden afectar a cada etapa del proceso analítico, aplicando en su mayoría estrategia multivariante de superficie de respuesta. Asimismo, se procederá a la validación de la metodología analítica propuesta en términos de exactitud (veracidad y precisión),

sensibilidad y selectividad, siguiendo las Guías Internacionales de Validación aplicables a la puesta a punto de métodos analíticos. Este segundo objetivo corresponde al **Capítulo III**. En el caso del bioindicador *Holothuria tubulosa* se partirá para los estudios de bioacumulación de una metodología analítica validada previamente a mi incorporación al grupo de investigación para la realización de la presente tesis doctoral.

3. Realizar un estudio de bioacumulación y transferencia a la cadena trófica en el bioindicador *Holothuria tubulosa* de los compuestos seleccionados en medios contaminados a propósito con los mismos. El fin será determinar la relación existente entre los niveles de estos en los distintos compartimentos corporales del bioindicador estudiado y los niveles presentes en el medio acuático donde habita, tratando de utilizar estas relaciones como herramienta en la monitorización de la contaminación química en las áreas de análisis. Durante el tiempo de duración del estudio, los animales son expuestos de forma forzada a los contaminantes tanto de forma puntual como continuada. Este tercer objetivo corresponde al **Capítulo IV**.

Las técnicas que se han empleado para lograr los objetivos de la presente Tesis Doctoral han sido:

- Cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS).
- Extracción asistida por ultrasonidos (UAE).
- Técnicas de precipitación química de proteínas y grasas y aplicación de la extracción con adsorbentes dispersivos (C18 y PSA).
- Herramientas estadísticas para llevar a cabo el tratamiento de datos procedentes de los diseños de experimentos multivariantes empleados en la optimización de los diferentes métodos analíticos y para la validación de los métodos propuestos.

Introducción

1. CONTAMINANTES EMERGENTES

En la sociedad actual, la continua intención de mejorar la calidad de vida ha conllevado a un mayor consumo y, con ello, a la aparición de nuevos productos considerados esenciales por la población. Los seres humanos disponemos de abundantes productos manufacturados que utilizamos en nuestra variada actividad diaria. Estas nuevas prácticas conllevan a que se originen numerosos residuos, la mayoría de los cuales acaban acumulándose en el medio ambiente. En los últimos años se han llevado a cabo innumerables estudios al respecto, que revelan la presencia de nuevas sustancias químicas en los diversos ecosistemas. Estos compuestos se denominan **contaminantes emergentes**¹. Se conoce relativamente poco sobre ellos en cuanto a impacto y tratamiento, y en su mayoría son contaminantes no regulados de manera clara y específica.

El concepto de contaminante emergente se refiere a compuestos de distinto origen y naturaleza química, cuya presencia en el medio ambiente no se considera significativa en términos de distribución y/o concentración, por lo que pasan inadvertidos; pese a ello, actualmente están siendo ampliamente estudiados y tienen el potencial de ocasionar un impacto ecológico, así como efectos adversos sobre la salud².

La característica principal de estos compuestos es que no necesitan estar constantemente en el ambiente para causar efectos negativos puesto que sus altas tasas de transformación son compensadas por su continua introducción en el ambiente³. Algunas fuentes a través de las cuales estas sustancias pueden entrar en el medio ambiente son: aguas residuales domésticas e industriales⁴,

¹ Rosal, R., Rodríguez, A., Perdigon-Melon, J.A., Petre, A., Garcia-Calvo, E., Gomez, M.J., Aguera, A., Fernandez-Alba, A.R. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Research*, 44 (2010) 578-588.

² Stuart, M., Lapworth, D., Crane, E., Hart, A. Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Science of the Total Environment*, 416 (2012) 1-21.

³ Barceló, L.D., López, M.J. Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Panel Científico-Técnico de seguimiento de la política de aguas. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales – CSIC. Barcelona. 2007.

⁴ Daughton, C.G. Non-regulated water contaminants: emerging research. *Environmental Impact Assessment Review*, 24:7-8 (2004) 711-732.

residuos de plantas de tratamiento⁵, efluentes hospitalarios⁶, actividades agrícolas y ganaderas⁷, y tanques sépticos⁸.



Figura 1. Contaminación marina (izquierda, fuente: <https://www.nationalgeographic.es/medio-ambiente/la-contaminacion-marina>). Emisario de aguas residuales en el interior del océano (derecha, fuente: <https://www.ecologiaverde.com/causas-y-consecuencias-de-la-contaminacion-de-los-mares-y-oceanos-1539.html>).

Los contaminantes emergentes incluyen una amplia gama de compuestos químicos: productos farmacéuticos (antibióticos, analgésicos, reguladores lipídicos, etc.), productos de cuidado personal (parabenos, benzofenonas, antimicrobianos, etc.), agentes tensioactivos (sulfonatos de alquilbenceno lineales, entre otros), plastificantes y aditivos industriales (bisfenoles, compuestos orgánicos perfluorados, ftalatos, etc.). El denominado reglamento REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical*

⁵ Kolpin, M.S., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M. Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environmental Science and Technology*, 36 (2002) 1202-1211.

⁶ Kümmerer, K. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources: a review. *Chemosphere*, 45 (2001) 957-969.

⁷ Watanabe, N., Bergamaschi, B.A., Loftin, K.A., Meyer, M.T., Harter, T. Use and environmental occurrence of antibiotics in freestall dairy farms with manure forage fields. *Environmental Science and Technology*, 44 (2010) 6591-6600.

⁸ Swartz, C.H., Reddy, S., Benotti, M.J., Yin, H., Barber, L.B., Brownawell, B.J., Rudel, R.A. Steroid estrogens, nonylphenol ethoxylate metabolites, and other wastewater contaminants in groundwater affected by a residential septic system on Cape Cod, MA. *Environmental Science and Technology*, 40 (2006) 4894-4902.

substances) establecido en 2007 en la Unión Europea, tiene como objetivo identificar nuevos contaminantes químicos peligrosos y tratar de descubrir estrategias que puedan reemplazarlos por otros no tan nocivos, y así disminuir su impacto sobre el medio ambiente.

En muchos casos, estas sustancias se han clasificado como altamente peligrosas y persistentes en el medio ambiente, ya que se consideran tóxicas y potencialmente carcinogénicas. Un aspecto de gran relevancia en relación al interés por estos compuestos de síntesis, radica en que se está demostrando que presentan actividad como disruptores endocrinos químicos (EDCs, *Endocrine Disrupting Chemicals*). Se trata agentes que imitan y antagonizan la función biológica de las hormonas naturales, responsables del mantenimiento de la homeostasis, reproducción, desarrollo y/o comportamiento. Actúan de diferentes modos según el momento específico de desarrollo del tejido con el que contacten, y el efecto adverso causado puede variar dependiendo del momento de la exposición, así como del equilibrio hormonal del ser vivo expuesto. Algunos de los efectos observados son cáncer de mama y útero, endometriosis, cáncer de testículo y próstata, reducción de la calidad seminal, pubertad precoz, criptorquidia, e incluso anomalías neurocerebrales y de la conducta.

Dado que la mayoría de estas sustancias se han convertido en parte de nuestra rutina diaria y que desconocer sus efectos nocivos hace incontrolable su uso en ciertas ocasiones, la situación comienza a ser alarmante y el estudio de estos potenciales contaminantes de origen antropogénico, debe convertirse en un objetivo prioritario de nuevas investigaciones. De esta manera pretendemos contribuir a poner solución a este problema medioambiental, que ha de pasar tanto por la concienciación social como por la mejora del tratamiento en las EDAR y la extensión de sus redes de saneamiento, evitando los vertidos marinos de aguas residuales sin depurar.

2. DISRUPTORES ENDOCRINOS. ANALITOS SELECCIONADOS

Un importante grupo de este tipo de sustancias son las empleadas como aditivos activos en los **productos de cuidado personal** (PCPs), incluyen productos para el cuidado dental o de la piel, jabones y detergentes, así como agentes protectores solares y productos para el cabello, productos para el hogar, aditivos alimentarios, etc.⁹. Se producen en grandes cantidades (miles de toneladas al año). Los surfactantes (detergentes), fragancias (almizcles nitrados y policíclicos), bloqueadores de rayos UV (benzofenonas y canfores), conservantes (parabenos y derivados de isotiazolina) y antisépticos (triclosán y triclocarbán) se encuentran de manera habitual en la composición de estos PCPs¹⁰. Aunque estos compuestos se utilizan en algunos productos destinados a la ingestión directa, la principal vía de exposición es la absorción a través de la piel, siendo posteriormente metabolizados y eventualmente bioacumulados y/o excretados¹¹. Esta absorción dérmica puede resultar en efectos adversos para la salud como la dermatitis, pero también en efectos más graves, como actividad mutagénica, carcinogénica y estrogénica^{12,13}.

⁹ Jiménez-Díaz, I., Zafra-Gómez, A., Ballesteros, O., Navalón, A. Analytical methods for the determination of personal care products in human samples: an overview. *Talanta*, 129 (2014) 448-458.

¹⁰ Ternes, T.A., Knacker, T., Oehlmann, J. Körperpflegenmittel in der aquatischen Umwelt. *UWSF – Z Umweltchem Ökotox*, 15 (2003) 169-180.

¹¹ Dietrich, D.R., Hitzfeld, B.C. Bioaccumulation and ecotoxicity of synthetic musks in the aquatic environment. Rimkus G.G. Series Anthropogenic Compounds - *Handbook of Environmental Chemistry*, 3 (2004) 233-244.

¹² Foran, C.M., Bennett, E.R., Benson W.H. Developmental evaluation of a potential non-steroidal estrogen: triclosan. *Marine Environmental Research*, 50 (2000) 153-156.

¹³ Golden, R., Gandy, J., Vollmer, G. A review of the endocrine activity of parabens and implications for potential risks to human health. *Critical Reviews in Toxicology*, 35 (2005) 435-458.



Figura 2. Introducción de los productos de cuidado personal en el medio ambiente.

Otro grupo de sustancias químicas potencialmente peligrosas y que se deben tener en cuenta por su actividad biológica, es el de los monómeros empleados para la fabricación de resinas de recubrimiento, plásticos de amplio uso y envases para alimentos. El **bisfenol A y sus homólogos** se encuentran en la actualidad de forma ubicua en los diferentes compartimentos ambientales, siendo muy destacable su presencia directa en forma de plásticos o microplásticos en los océanos de todo el mundo. Estos contaminantes amenazan la vida de todos los individuos de manera directa o indirecta, ya sea por la ingesta por parte de los organismos marinos o por la bioacumulación a largo plazo de sustancias tóxicas que se propagan a través de la cadena trófica¹⁴.

¹⁴ Li, J., Green, C., Reynolds, A., Shi, H., Rotchell, J.M. Microplastics in mussels sampled from coastal waters and supermarkets in the United Kingdom. *Environmental Pollution*, 241 (2018) 35-44.

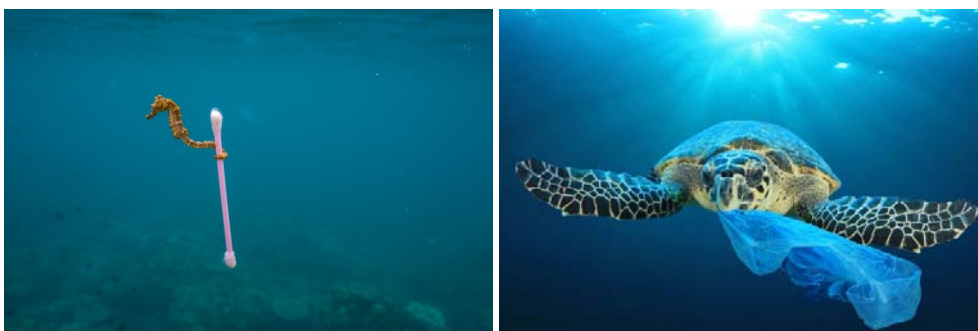


Figura 3. Plásticos en el medio marino (Fuente: https://www.nationalgeographic.com.es/naturaleza/grandes-reportajes/ahogados-mar-plastico_12712)

Por último, en los últimos años, se ha comenzado a prestar atención como potencialmente peligrosos a los **compuestos orgánicos perfluorados** (PFAS), empleados en una amplia variedad de productos industriales y domésticos como en la fabricación de velcro, muebles, alfombras, detergentes, envoltorios y envases alimentarios, y como aditivos del teflón para fabricar utensilios de cocina¹⁵. Tienen numerosas aplicaciones en procesos como fabricación de tintas, ceras, lubricantes, barnices, cueros y espumas contra incendios.

2.1. Disruptores endocrinos químicos objeto de estudio

En base a lo anteriormente expuesto, en la presente Tesis Doctoral, se han seleccionado 21 disruptores endocrinos como objeto de estudio en base a su empleo doméstico e industrial, persistencia en el medio ambiente, capacidad de bioacumulación y toxicidad. Dichos compuestos han sido 5 conservantes (parabenos), 2 antisépticos (triclosán y triclocarbán), 7 plastificantes (bisfenoles), 1 filtro ultravioleta (benzofenona 3) y 6 aditivos industriales.

2.2.1. Parabenos

Un conservante es una sustancia que se agrega a productos finales como productos de higiene personal (cosméticos, cremas, geles, lociones, productos

¹⁵ Ghisi, R., Vamerali, T., Manzetti, S. Accumulation of perfluorinated alkyl substances (PFAS) in agricultural plants: A review. *Environmental Research*, 169 (2019) 326-341.

capilares, pastas dentífricas, espumas de afeitar), alimentos y bebidas, fármacos, madera, material biológico, etc., para evitar la descomposición por crecimiento microbiano o por cambios químicos indeseables. Los **parabenos** (PB) o ésteres de alquilo del ácido *p*-hidroxibenzoico se utilizan ampliamente para este fin.

Los parabenos son conservantes efectivos frente a hongos, como mohos y levaduras, y bacterias Gram- (*Salmonella*, *Escherichia Coli* y *pseudomonas*), por ello empezaron a estar presentes en numerosos productos a partir de 1925¹⁶. Se utilizan en más de 13200 formulaciones comerciales diferentes, este uso generalizado se debe a su baja toxicidad, amplia inercia y bajo coste, sin embargo, actualmente se intenta evitar su uso por la creciente evidencia de que actúan como disruptores endocrinos¹⁷.

Estos compuestos están autorizados y regulados por la Unión Europea en el Reglamento 1004/2014 sobre los productos cosméticos¹⁸, y la Directiva 95/2/CE relativa a aditivos alimentarios distintos de colorantes y edulcorantes¹⁹. El nivel máximo permitido para estas sustancias en la industria cosmética oscila entre 0.4%, si se aplican de manera aislada, y 0.8%, si se utilizan combinados. No obstante, todavía no existe una legislación que permita su regulación en cuanto a emisiones o existencia en el medio ambiente.

Se trata de compuestos sólidos cristalinos, incoloros, inodoros, lipofílicos, no volátiles, relativamente solubles en agua, con mayor carácter hidrofóbico al aumentar el tamaño de su cadena hidrocarbonada, poseen gran estabilidad en un amplio intervalo de temperatura y de pH (4.5 - 7.5). En la **Tabla 1** se muestran los parabenos estudiados en esta Tesis Doctoral, sus estructuras moleculares y sus propiedades físico-químicas más significativas.

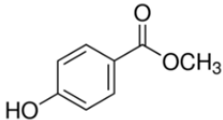
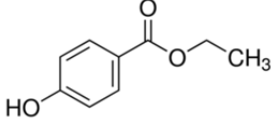
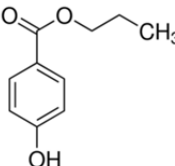
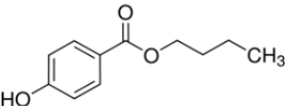
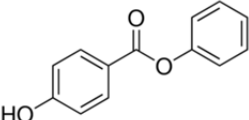
¹⁶ Błędzka, D., Gromadzińska, J., Wąsowicz, W. Parabens. From environmental studies to human health. *Environment International*, 67 (2014) 27-42.

¹⁷ Nowak, K., Ratajczak-Wrona, W., Górka, M., Jabłońska, E. Parabens and their effects on the endocrine system. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 474 (2018) 238-251.

¹⁸ Comisión Europea. Reglamento (UE) N° 1004/2014. Diario Oficial de la Unión Europea. 2014. (<https://www.boe.es/doue/2014/282/L00005-00008.pdf>).

¹⁹ Comisión Europea. Directiva 95/2/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, relativa a aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes. 1995. (<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1995L0002:20060815:ES:PDF>).

Tabla 1. Parabenos estudiados: estructuras y propiedades físico-químicas.

Compuesto	Fórmula molecular	Estructura química	Masa molecular (g/mol)	pK _a	Log K _{ow}
MPB	C ₈ H ₈ O ₃		152.15	8.50	1.66
EPB	C ₉ H ₁₀ O ₃		166.17	8.34	2.19
PPB	C ₁₀ H ₁₂ O ₃		180.2	8.50	2.71
BPB	C ₁₁ H ₁₄ O ₃		194.23	8.47	3.24
PhPB	C ₁₃ H ₁₀ O ₃		214.22		3.56

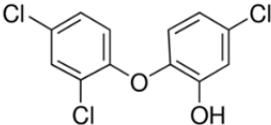
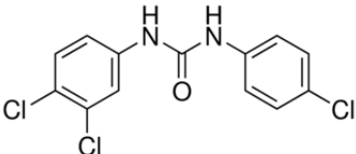
2.2.2. Triclosán y triclocarbán

El **triclosán** (TCS) y el **triclocarbán** (TCC) son agentes antimicrobianos y fungicidas, capaces de ralentizar y hasta detener el crecimiento de bacterias Gram+ (y algunas Gram-), hongos y mohos. Junto a los detergentes, poseen acciones sinérgicas a concentraciones $\geq 1\%$ ²⁰. Se trata de compuestos aromáticos clorados, solubles en disolventes orgánicos y con apariencia de polvo cristalino blanco, se pueden descomponer por la acción de la luz, el cloro, el ozono y algún microorganismo y poseen elevada toxicidad a altas dosis. En la

²⁰ Fang, J.L., Stingley, R.L., Beland, F.A., Harrouk, W., Lumpkins, D.L., Howard, P. Occurrence, efficacy, metabolism, and toxicity of triclosan. *Journal of Environmental Science and Health, Part C* 28:3 (2010) 147-171.

Tabla 2 se recogen las estructuras moleculares y las propiedades físico-químicas más destacadas de ambos compuestos.

Tabla 2. Agentes antimicrobianos estudiados: estructuras y propiedades físico-químicas.

Compuesto	Fórmula molecular	Estructura química	Masa molecular (g/mol)	pK _a	Log K _{ow}
TCS	C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂		289.5	7.9	4.76
TCC	C ₁₃ H ₉ Cl ₃ N ₂ O		315.6	12.7	4.34

Dada su acción antiséptica, desinfectante y conservante, se encuentran en productos de hospital, de higiene personal (jabones, desodorantes, pastas dentífricas, enjuagues bucales), de limpieza, etc. No se conocen en profundidad sus mecanismos de acción, pero como biocidas actúan sobre múltiples dianas. Lo más preocupante es su actividad como disruptores endocrinos²¹. En 2016, la Comisión Europea suspendió el triclosán como sustancia activa existente para su uso en biocidas para la higiene humana²². En ese mismo año, la Agencia Estadounidense Reguladora de Alimentos y Fármacos (FDA, *Food and Drug Administration*) decretó la retirada del mercado de aquellos productos antisépticos de consumo libre que tuviesen triclosán y triclocarbán, permitiéndolos únicamente para productos de asistencia sanitaria²³.

²¹ Perencevich, E.N., Wong, M.T., Harris, A.D. National and regional assessment of the antibacterial soap market: a step toward determining the impact of prevalent antibacterial soaps. *American Journal of Infection Control*, 29 (2010) 281-283.

²² Comisión Europea. Decisión de Ejecución (UE) 2016/110. Diario Oficial de la Unión Europea. 2016. (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32016Do110&from=ES>).

²³ Food and Drug Administration. Safety and effectiveness of consumer antiseptics; topical antimicrobial drug products for over the counter human use. FDA-1975-N-0012 (No. 1975N-0183H). (<https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2016-09-06/pdf/2016-21337.pdf>).

2.2.3. Bisfenoles

Los **bisfenoles** son los compuestos de síntesis de mayor producción a nivel mundial. En particular, en la última década, el bisfenol A cuenta con una producción anual de más de 4 millones de toneladas, cifra que continúa creciendo en la actualidad. Se trata de compuestos sólidos cristalinos de color blanco, poco solubles en agua, hidrofóbicos, no volátiles y tienen elevada tendencia a adsorberse a matrices sólidas. En la **Tabla 3** se muestran los bisfenoles seleccionados en la presente Tesis Doctoral, sus estructuras y sus propiedades físico-químicas más relevantes.

Tabla 3. Bisfenoles estudiados: estructuras y propiedades físico-químicas.

Compuesto	Fórmula molecular	Estructura química	Masa molecular (g/mol)	pK _a	Log K _{ow}
BPF	C ₁₃ H ₁₂ O ₂		200.23	7.5	2.91
BPE	C ₁₄ H ₁₄ O ₂		214.26	9.81	3.74
BPA	C ₁₅ H ₁₆ O ₂		228.29	9.6	3.32
BisPB	C ₁₆ H ₁₈ O ₂		242.31	10.1	4.13
BPS	C ₁₂ H ₁₀ O ₄ S		250.27	8.2	1.65
BPAF	C ₁₅ H ₁₀ F ₆ O ₂		336.23	9.2	4.47
BPP	C ₂₄ H ₂₆ O ₂		346.5	9.8	6.72

El bisfenol A es el compuesto principal de esta familia. Sus aplicaciones son múltiples y su uso está muy extendido actualmente. Es el monómero base para la fabricación de las resinas epoxi, polímeros de excelentes propiedades químicas, térmicas y mecánicas; y para la obtención de los plásticos policarbonato, que poseen gran estabilidad mecánica y térmica, así como muy buena transparencia. Estos plásticos están presentes en infinidad de productos y de actividades como la industria del automóvil y aeronáutica, en instalaciones de alumbrado, en construcción, en sistemas eléctricos, tuberías de agua potable, telecomunicaciones, equipos fotográficos, lentes ópticas y discos compactos, envasado de alimentos y aguas; también puede destacarse el uso de bisfenol A en fungicidas, retardantes de llama y colorantes, entre otras muchas aplicaciones²⁴. La presencia de estos compuestos también se ha demostrado en alimentos²⁵, productos manufacturados²⁶ y productos farmacéuticos²⁷, por lo que el riesgo de exposición humana es considerable.

Se tienen evidencias claras y abundantes de que el bisfenol A produce alteraciones endocrinas y crónicas de bajo nivel, así como que afecta a la salud reproductiva de los seres humanos. En consecuencia, la Unión Europea ha prohibido la utilización de este compuesto para elaborar productos como biberones o envases de fórmulas infantiles²⁸. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria²⁹ (EFSA, *European Food Safety Authority*) en el año 2006

²⁴ Del Olmo, M., Zafra, A., Jurado, A.B., Vílchez, J.L. Determination of bisphenol A (BPA) in the presence of phenol by first-derivative fluorescence following micro liquid-liquid extraction (MLLE). *Talanta*, 50 (2000) 1141-1148.

²⁵ García-Córcoles, M.T., Çipa, M., Rodríguez-Gómez, R., Rivas, A., Olea-Serrano, F., Vílchez, J.L., Zafra-Gómez, A. Determination of bisphenols with estrogenic activity in plastic packaged baby food samples using solid-liquid extraction and *clean-up* with dispersive sorbents followed by gas chromatography tandem mass spectrometry analysis. *Talanta*, 178 (2018) 441-448.

²⁶ Brotons, J.A., Olea-Serrano, F., Villalobos, M., Olea, N. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environmental Health Perspectives*, 103:6 (1995) 97-104.

²⁷ Olea, N., Pulgar, R., Pérez, P., Olea-Serrano, F., Rivas, A., Novillo-Fertrell, A., Pedraza, V., Soto, A.M., Sonnenschein, C. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environmental Health Perspectives*, 104 (1996) 298-305.

²⁸ Comisión Europea. Directiva 2004/19/CE. Diario Oficial de la Unión Europea. 2004. (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32004L0019&from=SK>).

²⁹ Scientific opinion on Bisphenol A: evaluation of a study investigating its neurodevelopmental toxicity, review of recent scientific literature on its toxicity and advice on the Danish risk assessment of Bisphenol A. *The EFSA Journal*, 8:9 (2010) 1829.

fijó inicialmente un valor límite de ingesta diaria de bisfenol A de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, que se modificó en el año 2010 a 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$. El resto de bisfenoles siguen siendo un poco desconocidos, aunque la Directiva 2004/19/CE²⁸ prohibió el uso de BPF en cualquier tipo de alimento.

2.2.4. Compuestos orgánicos perfluorados

Los **compuestos orgánicos perfluorados** (PFAS) se utilizan en una amplia variedad de productos industriales y domésticos. Algunos de los efectos que causan en el organismo son daños hepáticos, alteraciones en el nivel de colesterol, triglicéridos, ácidos grasos libres y lipoproteínas³⁰. Los PFAS más peligrosos por su posible potencial carcinogénico para los seres humanos son el ácido perfluorooctanoico (PFOA) y el ácido perfluorooctanosulfónico (PFOS)³¹, por este motivo, se encuentran más restringidos que el resto de compuestos perfluorados. En el año 2008, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria estableció la ingesta diaria máxima tolerable de 0.15 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para PFOS y de 1.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para PFOA³².

Estos compuestos pueden clasificarse en iónicos o neutros (ácidos sulfónicos y carboxílicos) dependiendo del grupo funcional que contengan. Tienen gran estabilidad química y térmica gracias a sus enlaces flúor-carbono, elevada tensión superficial, son hidrofóbicos, oleofóbicos y tensioactivos. Se consideran muy persistentes en el medio ambiente debido a que son resistentes a procesos metabólicos, hidrólisis y fotólisis, y a los ácidos fuertes y compuestos alcalinos y tienen carácter oxidante, por lo cual se utilizan en electrónica, química y medicina³³. En la **Tabla 4** se exponen los compuestos

³⁰ US Environmental Protection Agency, 2016. Health Effects Support Document for Perfluorooctane Sulfonate (PFOS), EPA 822-R-16-002, and for Perfluorooctanoic Acid (PFOA), EPA 822-R-16-003.

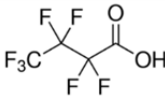
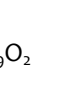



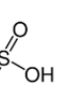
³¹ Bartolomé, M., Gallego-Picó, A., Cutanda, F., Huetos, O., Esteban, M., Pérez-Gómez, B., Castaño, A. Perfluorinated alkyl substances in Spanish adults: Geographical distribution and determinants of exposure. *Science of The Total Environment*, 603:604 (2017) 352-360.

³² Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain: perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts. *The EFSA Journal*, 653 (2008) 1-131.

³³ Sun, T.F., Xiang, L., Chen, L., Xiao, T., Mo, C.H., Li, Y.W., Cai, Q.Y., Hu, G.C., Hu, D.C. Research progresses of determination of perfluorinated compounds in environmental water and solid samples. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 45:4 (2017) 601-610.

orgánicos perfluorados seleccionados en esta Tesis Doctoral, así como sus estructuras y sus propiedades físico-químicas más notables.

Tabla 4. Compuestos orgánicos perfluorados estudiados: estructuras y propiedades físico-químicas.

Compuesto	Fórmula molecular	Estructura química	Masa molecular (g/mol)	pK _a	Log K _{ow}
PFBuA	C ₄ HF ₇ O ₂		214.04	0.20	2.14
PFPeA	C ₅ HF ₉ O ₂		264.05	0.40	2.81
PFHxA	C ₆ HF ₁₁ O ₂		314.05	- 0.16	3.48
PFHpA	C ₇ HF ₁₃ O ₂		364.06	- 2.29	4.15
PFOA	C ₈ HF ₁₅ O ₂		414.07	-0.5 - 4.2	4.81
PFOA	C ₈ HF ₁₇ O ₂ S		500.13	<1.0	4.49

2.2.5. Benzofenonas

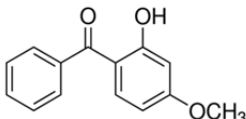
Las **benzofenonas** (BPs) se emplean como filtros UV en la formulación de productos cosméticos para la protección solar. Se utilizan también a diario en cremas hidratantes y antiarrugas, productos de después del afeitado, maquillaje, champús, etc³⁴. Las más utilizadas son las que se denominan desde

³⁴ Chisvert, A., Balaguer, A., Salvador, A. Tanning and whitening agents in cosmetics. Regulatory aspects and analytical methods. *Analysis of cosmetics products (1st edition)*. Ed. Elsevier Science (2007) 128-140.

la benzofenona 1 (BP-1) a la benzfenona 12 (BP-12), aunque existen otras menos habituales como las hidroxibenzofenonas (OH-BP). Se trata de compuestos sólidos blancos de color cristalino. Son poco volátiles y, excepto la BP-4 y la BP-5, tienen carácter hidrofóbico.

La más importante es la benzofenona 3 (BP-3) ya que es la más ampliamente usada en las formulaciones de los protectores solares para proteger la piel y el cabello del daño causado por la radiación UV. Aunque este compuesto representa un riesgo relativamente bajo para los humanos y otros animales en términos de actividad estrogénica, Watanabe y col.³⁵ observaron que es activada metabólicamente para la actividad estrogénica por los microsomas de hígado de rata no tratados, y por los microsomas inducidos por el tratamiento con fenobarbital, 3-metilcolantreno o acetona, transformándose en BP-1. Este dato es congruente con el hecho que la BP-1 presenta una actividad estrogénica muy elevada³⁶. En la **Tabla 5** se muestra la estructura y propiedades físico-químicas más relevantes de la BP-3.

Tabla 5. Benzofenona estudiada: estructura y propiedades físico-químicas.

Compuesto	Fórmula molecular	Estructura química	Masa molecular (g/mol)	pK _a	Log K _{ow}
BP-3	C ₁₄ H ₁₂ O ₃		228.24	7.1	3.79

³⁵ Watanabe, Y., Kojima, H., Takeuchi, S., Uramaru, N., Sanoh, S., Sugihara, K., Kitamura, S., Ohta, S. Metabolism of UV-filter benzophenone-3 by rat and human liver microsomes and its effect on endocrine-disrupting activity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 282 (2015) 119-128.

³⁶ Suzuki, T., Kiatmura, S., Khota, R., Sugihara, K., Fujimoto, N., Ohta, S. Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203 (2005) 9-17.

2.2. Disruptores endocrinos químicos en el medio marino

La contaminación acuática se define como cualquier alteración física, de parámetros químicos o biológicos que afectan a la calidad del agua, siendo altamente perjudiciales para la biota del ecosistema. La introducción de EDCs, sin ser habituales en un ambiente acuático, conlleva cambios importantes en él, incluyendo la contaminación, y su acumulación podría dar lugar a la pérdida de biodiversidad. Estas sustancias químicas causan daños de gran relevancia tanto a los seres humanos como a todos los seres vivos que habitan en el medio ambiente en general, y el acuático en particular³⁷. En las últimas décadas, ha aumentado la fabricación de estos productos químicos día a día, a nivel mundial, si bien pueden beneficiarnos en numerosas ocasiones, en otras son tóxicos para el medio ambiente debido a su persistencia en él³⁸, y debido a ello, se ha comenzado a estudiar su persistencia en el medio marino³⁹.

Las bajas concentraciones a las que se encuentran los EDCs en este medio pueden promover la toxicidad de los organismos marinos, fundamentalmente a causa de la exposición crónica, introduciéndose de forma continua (directa o indirectamente) y desencadenando efectos graves a cualquier ser vivo. La principal fuente de contaminación del medio acuático es la aplicación humana y veterinaria a través de las aguas residuales, descubriéndose, por ejemplo, peces macho feminizados como efecto en aguas contaminadas⁴⁰. El impacto adverso de este tipo de contaminación en los ecosistemas marinos ha llevado al desarrollo de varias estrategias para estudiarlo y evaluarlo en las últimas décadas, por ejemplo, con los **organismos centinela**, los cuales son capaces de

³⁷ Caban, M., Lis, E., Kumirska, J., Stepnowski, P. Determination of pharmaceutical residues in drinking water in Poland using a new SPE-GC-MS(SIM) method based on Speedisk extraction disks and DIMETRIS derivatization. *Science of the Total Environment*, 538 (2015) 402-411.

³⁸ Sosa-Ferrera, Z., Mahugo-Santana, C., Santana-Rodríguez, J.J. Analytical methodologies for the determination of endocrine disrupting compounds in biological and environmental samples. *BioMed Research International*, 2013 (2013) 1-23.

³⁹ Goldberg, E.D., Bertine, K.K. Beyond the Mussel Watch - New directions for monitoring marine pollution. *Science of the Total Environment*, 247:2-3 (2000) 165-174.

⁴⁰ Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G., Sumpter J.P. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science & Technology*, 32:17 (1998) 2498-2506.

detectar la variación temporal y espacial de estas sustancias contaminantes, y así conocer mejor el comportamiento de las mismas⁴¹.

Por último en este apartado comentar que como efecto de la situación actual en el mundo debido a la COVID-19, ha disminuido la contaminación atmosférica, mejorando así la calidad del aire, no obstante, ha aumentado la entrada en el medio ambiente de plásticos (mascarillas y guantes) a causa de un mal uso excesivo. Por este motivo en España, se está tramitando una *Ley de Residuos*⁴², con el fin de garantizar la protección del medio ambiente y la salud humana mediante la prevención o la reducción de la generación de residuos y de los impactos adversos de su generación y gestión.



Figura 4. Consecuencias de COVID-19 en ecosistemas marinos (Fuente: <https://www.compromisorse.com/rse/2020/06/08/el-aumento-del-plastico-por-el-covid-19-una-amenaza-mas-para-nuestros-mares/>).

⁴¹ Azizi, G., Akodad, M., Baghour, M., Layachi, M., Moumen, A. The use of *Mytilus* spp. mussels as bioindicators of heavy metal pollution in the coastal environment. A review. *Journal of Materials and Environmental Science*, 9:4 (2018) 1170-1181.

⁴² Borrador del anteproyecto de *Ley de residuos y suelos contaminados*. Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico. 2020. (https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/participacion-publica/200602aplresiduosysc_informacionpublica_tcm30-509526.pdf).

3. BIOINDICADORES MARINOS

El crecimiento y la modernización de las áreas de costa suelen ser la causa de un aumento de los vertidos desechados directamente al mar, incluidos materiales que contienen disruptores endocrinos químicos⁴³. Habitualmente, la eliminación de contaminantes del agua se realiza a través de estaciones de depuración de aguas residuales (EDAR), pero muchas de ellas no poseen la maquinaria necesaria para eliminar determinados contaminantes, por ello, estos se acumulan en el medio marino por sedimentación y formación de lodos residuales contaminados, o pasan a la cadena trófica de distintos organismos acuáticos que los incorporan por su ingesta⁴⁴.

Para poder observar la presencia y dispersión de estos contaminantes en los tejidos animales, se hace necesario el empleo de bioindicadores. Un **bioindicador** es una especie biológica, o parte de ella, capaz de responder a la variación de un determinado factor ambiental con el cambio de magnitud en una o más variables de su propio organismo. Las propiedades más destacadas de un buen bioindicador son:

- Debe ser abundante, estar bien distribuido y disperso en el medio donde se localice.
- Debe ser fácilmente detectable mediante métodos objetivos.
- Debe ser sedentario y de un tamaño que permita la obtención de muestras de sus órganos y tejidos.
- Debe tolerar al contaminante en concentraciones del orden a las del ambiente estudiado.

⁴³ Jiang, J.Q., Zhou, Z., Sharma, V.K. Occurrence, transportation, monitoring and treatment of emerging micro-pollutants in waste water – A review from global views. *Microchemical Journal*, 110 (2013) 292-300.

⁴⁴ Healy, M.G., Fenton, O., Cormican, M., Peyton, D.P., Ordsmith, N., Kimber, K., Morrison, L. Antimicrobial compounds (triclosan and triclocarban) in sewage sludges, and their presence in runoff following land application. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 142 (2017) 448-453.

- Debe tolerar las condiciones de estabulación y mantenimiento en cautividad.
- Debe ser lo más sensible posible a los cambios.

Los invertebrados marinos bentónicos son buenos bioindicadores de la calidad de las aguas y sedimentos marinos. Las especies bentónicas viven sobre el sustrato e, incluso, se alimentan de él. Entre estas especies, el mejillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*) y el pepino de mar (*Holothuria tubulosa*) son bioindicadores muy adecuados y utilizados en la literatura científica^{41,45,46}. Estos organismos, además, constituyen una importante fuente de alimento para otros animales ocupando un lugar importante en la cadena trófica acuática. Por este motivo, estos dos bioindicadores marinos han sido los seleccionados para llevar a cabo la presente Tesis Doctoral.

3.1. Mejillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*) como bioindicador de contaminación marina

El mejillón mediterráneo es un organismo invertebrado marino bivalvo perteneciente al reino *Animalia*, phylum *Mollusca*, clase *Bivalvia*, subclase *Autobranchia*, orden *Mytilida*, superfamilia *Mytiloidea*, familia *Mytilidae* y subfamilia *Mytilinae*. El mejillón es un animal comestible que primordialmente se produce mediante acuicultura a escala mundial⁴⁷, China y la Unión Europea son los productores principales, siendo España el mayor productor europeo.

Esta especie, *Mytilus galloprovincialis*, está presente tanto en el océano Atlántico como en el mar Mediterráneo, en países como Irlanda, Gran Bretaña, Marruecos, España, entre otros. Estos seres pueden vivir en una amplia variedad de hábitats, desde las aguas salobres de los estuarios a las zonas más

⁴⁵ Warnau, M., Dutrieux, S., Ledent, G., Rodríguez y Baena, A.M., Dúbois, P. Heavy metals in the sea cucumber *Holothuria tubulosa* (Echinodermata) from the Mediterranean *Posidonia oceanica* ecosystem: body compartment, seasonal, geographical and bathymetric variations. *Environmental Bioindicators*, 1:4 (2006) 268-285.

⁴⁶ Eriksson, E., Christensen, C., Schmidt, J.E., Ledin, A. Potential priority pollutants in sewage sludge. *Desalination*, 226:1-3 (2008) 371-388.

⁴⁷ EUMOFA (European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products), 2016. El mercado pesquero de la UE. www.eumofa.eu

batidas de los acantilados de mar abierto, algunos viven en zonas intermareales y otros en zonas sumergidas totalmente (15 m de profundidad). Unos viven aferrados a las rocas, otros a la grava de la playa, y algunos se entierran en la arena o en el fango. Ha adaptado perfectamente la forma de su concha y de su cuerpo a las condiciones del entorno en el que vive. El extremo por donde se fija a las rocas, para facilitar el anclaje, se ha estrechado al máximo, y la parte opuesta, se ha ensanchado de manera considerable para poder obtener el alimento. Los mejillones son seres filtradores de agua marina, a través de sus branquias, que se alimentan básicamente de materia orgánica en forma de partículas inertes (detritos), fitoplancton (microalgas) y zooplancton (larvas)⁴⁸. Son capaces de filtrar de 6 a 8 litros de agua por hora.



Figura 5. *Mytilus galloprovincialis*.

El mejillón (**Figura 6.A**) se caracteriza por un cuerpo blando, protegido por una concha alargada con dos valvas abisagradas, con un tono negro o pardo azulado, simétricas, alargadas y de forma triangular ovalada. Posee dos músculos abductores que han evolucionado de manera que el anterior ha quedado muy reducido y el posterior es el encargado de la apertura y cierre de las valvas. El manto reviste la parte interior de las valvas, y de él sobresale el pie, el cual presenta un pequeño abultamiento con actividad secretora

⁴⁸ OESA - Fundación Biodiversidad. Cultivo del mejillón (*Mytilus galloprovincialis*). Madrid (2017) 104 pp.

denominada glándula del biso, que genera unos filamentos que permiten la fijación del mejillón⁴⁹. Estos organismos no presentan dimorfismo sexual externo, la diferencia radica en el color del manto en época de desove: en hembras es de color anaranjado y en machos se torna más pálido, como se muestra en la **Figura 6.B**, tienen sexos separados y la proporción en la población de hembras y machos es similar.

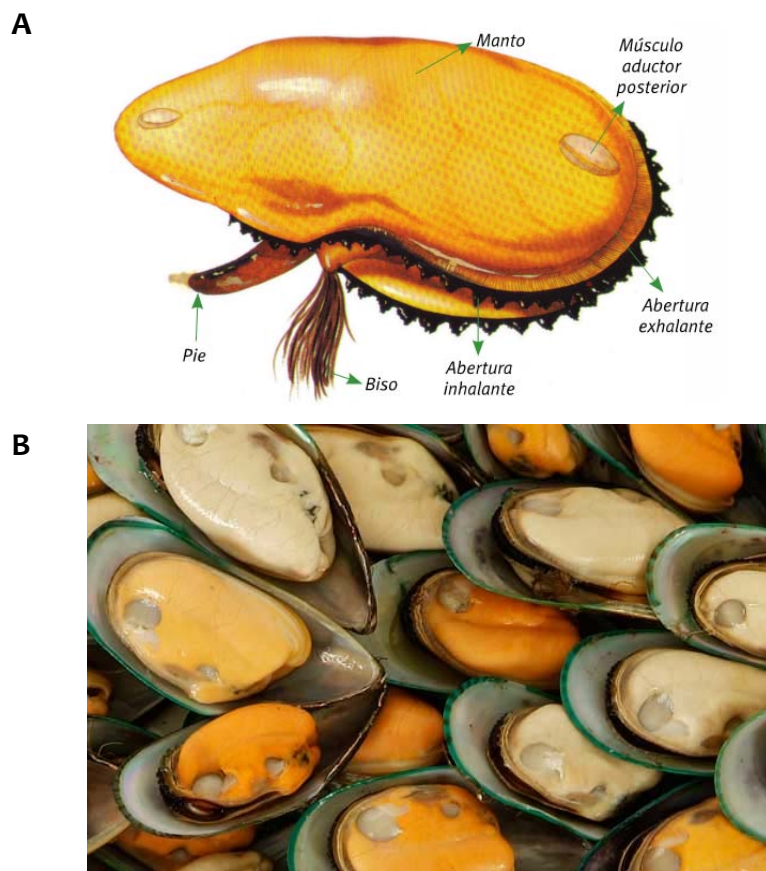


Figura 6. A Morfología del cuerpo del mejillón. **B** Mejillones machos y hembras.

Los mejillones tienen una vida media entre 3 y 4 años, crecen hasta los 15 centímetros, pero pueden alcanzar longitudes de 25 cm. Su ciclo de vida se inicia con la madurez sexual de hembras y machos con alrededor de 3 a 8

⁴⁹ Tirado Narváez, C., Macías Rivero, J.C. Cultivo de mejillón. Aspectos generales y experiencias en Andalucía. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. (2006) 182 pp.

meses de vida. Tienen fecundación externa: ciertos factores ambientales cíclicos, fundamentalmente, dan lugar al proceso de desove del mejillón y conlleva a una comunicación entre ellos mediante moléculas químicas liberándose los gametos al medio marino para su fecundación. Este proceso se suele realizar en la temporada de primavera y en la de otoño. Las larvas son planctónicas y su supervivencia depende del alimento disponible y de los depredadores. Al principio, realizan una fijación primaria en el fondo, donde se producen cambios en su organismo, y tras alcanzar los 1-2 milímetros, se desprenden para fijarse con el biso en las rocas o en otros sustratos sólidos⁴⁸.

Los bivalvos son la especie bioindicadora por elección ya que presentan características excelentes para tal propósito. Entre estas se encuentran: alta sensibilidad a la contaminación, disponibilidad a amplias distribuciones, facilidad para el muestreo, son organismos sésiles, es decir, se encuentran en alta abundancia con baja movilidad, gran importancia ecológica y económica⁵⁰, y sobre todo, su elevada capacidad de filtración, puesto que son capaces de acumular, en sus tejidos, las sustancias químicas contaminantes presentes en el agua, proporcionando así una medida integrada de la concentración y la biodisponibilidad de los contaminantes del agua de mar *in situ*⁵¹.

La bioacumulación, o bioconcentración, es un proceso que se determina mediante un organismo acuático que tiene más concentración de químicos en su propio organismo que en el agua en el que se encuentra. Los bivalvos del género *Mytilus*, al ser organismos filtradores, asimilan los compuestos libres en el medio acuático acumulándolos en su organismo (bioacumulación) y transfiriéndolos a la cadena trófica cuando son consumidos posteriormente por otras especies (biomagnificación).

⁵⁰ Laitano, M.V., Fernández-Gimenez, A.V. Are mussels always the best bioindicators? Comparative study on biochemical responses of three marine invertebrate species to chronic port pollution. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 97:1 (2016) 50-55.

⁵¹ Luna-Acosta, A., Bustamante, P., Budzinski, H., Huet, V., Thomas-Guyon, H. Persistent organic pollutants in a marine bivalve on the Marennes–Oléron Bay and the Gironde Estuary (French Atlantic Coast) – Part 2: potential biological effects. *Science of The Total Environment*, 514 (2015) 511-522.

Se han propuesto varios bioindicadores de mejillón durante los últimos años como “herramientas sensibles de alerta temprana” para evaluar los efectos biológicos de los contaminantes en los organismos marinos^{52,53}, y algunos de ellos han sido incorporados por diferentes programas de vigilancia de la contaminación marina, como es el convenio OSPAR sobre la protección del medio ambiente marino del Atlántico Nordeste⁵⁴. La Comisión OSPAR en su Programa Conjunto de Evaluación y Monitoreo (JAMP, *Joint Assessment and Monitoring Programme*)⁵⁵ establece que las siguientes sustancias peligrosas deben incluirse en esos programas de vigilancia de la contaminación marina: metales (mercurio: Hg; cadmio: Cd; plomo: Pb), hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), éteres difenílicos polibromados (PBDEs), bifenilos policlorados (PCBs), y plaguicidas organoclorados (diclorodifenil tricloroetano: DDT; y sus metabolitos α - y γ -hexaclorociclohexano: α - y γ -HCH), sin embargo, no constituye nada acerca de los disruptores endocrinos químicos.

En lo que respecta a los EDCs, se han realizado estudios de BPA, dialilftalato (DAP) y éter de tetrabromodifenilo (tetraBDE) en *Mytilus edulis* y se ha observado que provocan daños severos en el ovario de la hembra, así como un desove temprano en el macho⁵⁶. En el bivalvo marino *Mytilus galloprovincialis* se ha demostrado recientemente que diferentes compuestos estrogénicos individuales o en mezclas, afectan la función inmunológica tanto *in vitro* como *in vivo*, y además, se ha evidenciado que los estrógenos individuales (17- β -estradiol: E2; y BPA) alteran los parámetros funcionales y la expresión génica en la glándula digestiva del mejillón, un tejido que desempeña un papel central en el metabolismo y en la distribución de nutrientes a las

⁵² Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environmental of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of the Total Environment*, 247:2-3 (2000) 295-311.

⁵³ Sarkar, A., Ray, D., Shrivastava, A.M., Sarker, S. Molecular biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology*, 15 (2006) 333-340.

⁵⁴ OSPAR Commission. Background document and technical annexes for biological effects monitoring. 2013. (<https://www.ospar.org/documents?v=7316>).

⁵⁵ OSPAR Commission. OSPAR Joint Assessment and Monitoring Programme (JAMP) 2014-2023. OSPAR Agreement 2014-02.

⁵⁶ Aarab, N., Lemaire-Gony, S., Unruh, E., Hansen, P.D., Larsen, B.K., Andersen, O.K., Narbonne, J.F. Preliminary study of responses in mussel (*Mytilus edulis*) exposed to bisphenol A, diallyl phthalate and tetrabromodiphenyl ether. *Aquatic Toxicology*, 78:Supplement (2006) 86-92.

gónadas durante la maduración de los gametos, con posibles consecuencias sobre la gametogénesis⁵⁷. En otro estudio se demostró la presencia de 8 PFAs⁵⁸ (PFHxA; PFHpA; PFOA; ácido perfluorononanoico: PFNA; ácido perfluorodecanoico: PFDA; ácido perfluoroundecanoico: PFUnA; ácido perfluorododecanoico: PFDoA; y PFOS) en muestras de moluscos de la costa norte de España, entre ellos *Mytilus galloprovincialis*, encontrándose valores de PFOS de hasta 7.3 ng g⁻¹ y de PFUnA de hasta 8.3 ng g⁻¹.

Adicionalmente, se han realizado estudios de bioacumulación de algunos de estos contaminantes en la especie *Mytilus galloprovincialis*, mostrando una alta capacidad de bioacumulación (BCF = 10.9 L g⁻¹ referido a materia seca, m.s.) al exponerse a tetraBDE durante un período de 30 días⁵⁹. En otro trabajo, se investigó la presencia de tres EDCs (4-*n*-nonilfenol: 4-NP, TCS y BPA) y el factor de bioconcentración en esta especie de mejillón varió de 1.7 L g⁻¹ para 4-NP y TCS a 4.5 L g⁻¹ para BPA durante un periodo de exposición de 28 días, este experimento demostró que las tasas de depuración de todos los compuestos objeto de estudio eran más bajas que las tasas de absorción⁶⁰.

3.2. Pepino de mar (*Holothuria tubulosa*) como bioindicador de contaminación marina

El pepino de mar del género *Holothuria* es un equinodermo marino perteneciente al reino *Animalia*, phylum *Echinodermata*, subphylum *Echinozoa*, clase *Holothuroidea*, subclase *Aspidochirota*, orden *Holothurillida*, y familia *Holothuriidae*. Se trata de un alimento muy utilizado en el sureste y este de

⁵⁷ Canesi, L., Borghi, C., Ciacci, C., Fabbri, R., Lorusso, L.C., Vergani, L., Marcomini, A., Poiana, G. Short-term effects of environmentally relevant concentrations of EDC mixtures on *Mytilus galloprovincialis* digestive gland. *Aquatic Toxicology*, 87:4 (2008) 272-279.

⁵⁸ Villaverde-de-Sáa, E., Quintana, J.B., Rodil, R., Ferrero-Refojos, R., Rubí, E., Cela, R. Determination of perfluorinated compounds in mollusks by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402 (2012) 509-518.

⁵⁹ Vidal-Liñán, L., Bellas, J., Fumega, J., Beiras, R. Bioaccumulation of BDE-47 and effects on molecular biomarkers acetylcholinesterase, glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase in *Mytilus galloprovincialis* mussels. *Ecotoxicology*, 24 (2015) 292-300.

⁶⁰ Gatidou, G., Vassalou, E., Thomaidis, N.S. Bioconcentration of selected endocrine disrupting compounds in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Pollution Bulletin*, 60 (2010) 2111–2116.

Asia, puesto que lo consideran un tratamiento eficaz contra la artritis, el cáncer y otras dolencias. *Holothuria tubulosa* es un organismo muy abundante en el mar Mediterráneo, tanto occidental como oriental, y en el océano Atlántico (desde Francia hasta Mozambique) en zonas con profundidades que varían desde los 2 hasta los 80 metros. Vive sobre fondos arenosos puesto que se alimenta ingiriendo el sedimento y aprovechando la materia orgánica digerible contenida en éste, incluidos microorganismos. Esta estrecha relación es relevante ya que es sabido que el sedimento contiene el grueso de los contaminantes del ambiente marino. Finalmente, expulsa el resto de sedimento en forma de cordones arenosos envueltos por una capa fina de mucosa intestinal. Muchas especies viven también bajo rocas o en grietas.

Este animal presenta forma alargada parecida a un gusano, con una longitud de entre 20 y 45 centímetros y 6 centímetros de un diámetro. Su color varía de pardo-rojizo a violeta, y en ocasiones, puede cubrirse de algas, hojas, arena, conchas, etc., que le permiten camuflarse. Su carcasa corporal es dura y coriácea, por su forma de vida, ha adaptado su superficie ventral con numerosos pies ambulacrales terminados en ventosas que le facilitan el desplazamiento junto con los movimientos peristálticos del cuerpo. Una estrategia de defensa de este organismo es que su pared corporal secreta una mucosa que contiene *holothurinas*, agentes de defensa química formados en su mayoría por saponinas que poseen propiedades antioxidantes, antifúngicas, citotóxicas, etc⁶¹. Otro mecanismo para defenderse es expulsando sus vísceras (aparatos digestivo y respiratorio), las cuales se regeneran posteriormente, con el fin de distraer al depredador mientras huye.

⁶¹ Blunt, J.W., Copp, B.R., Hu, W.P., Munro, M.H.G., Northcote, P.T., Prinsep, M.R. Marine natural products. *Natural Product Reports*, 26 (2009) 170-244.

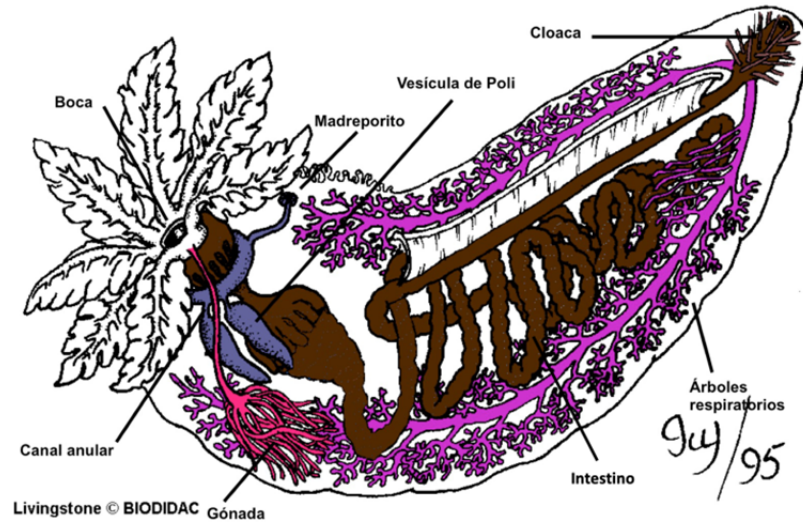


Figura 7. *Holothuria tubulosa*.

Las holoturias son especies dioicas, es decir, no hay diferencias entre machos y hembras externamente, presentan una única gónada. La reproducción suele realizarse en verano en los días de luna llena, cuando cae el sol, estos animales empiezan a colocarse en posición inclinada (**Figura 8.B**) levantando del sustrato dos tercios de la parte anterior del cuerpo y comienzan a expulsar de manera intermitentemente a través del gonoporo una sustancia blanquecina (con esperma y óvulos) que es arrastrada por las corrientes. Esta postura tiene como objetivo separar el gonoporo del sustrato lo máximo viable y así, posibilitar una mejor dispersión de las células germinales. Cuando los óvulos son fecundados, pasan a formar parte del plancton y suceden varias etapas previas a depositarse en el fondo y transformarse en juvenil⁶².

⁶² Ocaña, A., Pérez, A., Sánchez, L. El litoral de Granada - *Holothuria tubulosa*. Departamento de Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada.

A



B



Figura 8. A Morfología del cuerpo de *Holothuria tubulosa*. **B** Reproducción de *Holothuria*.
(Fuente: <https://litoraldegranada.ugr.es/el-litoral/el-litoral-sumergido/fauna/equinodermos/holoturoideos/holothuria-tubulosa/>).

Las *Holothurias* pueden ayudar al seguimiento de una gran variedad de contaminantes en los ecosistemas marinos, debido a que se alimentan por filtración y al estar ampliamente distribuidos a lo largo de las costas están muy expuestos a compuestos orgánicos. Estos organismos son funcionalmente importantes en la transferencia de estos contaminantes a niveles tróficos más altos, porque, a su vez, son fuente de alimento de otras especies marinas, aves acuáticas, y también son calificados como una delicia gastronómica en países

como China, Hong-Kong, Japón, Noruega, Turquía, etc., en consecuencia, se convierten en fuente potencial de exposición humana a los contaminantes.

Recientemente han aumentado los estudios que han utilizado estos equinodermos para evaluar el riesgo ecotoxicológico de aguas y sedimentos contaminados con metales pesados^{45,63} y compuestos orgánicos como PCBs y PBDEs⁶⁴, biocidas⁶⁵ y alquilfenoles dentro del grupo de disruptores endocrinos químicos⁶⁶, sin embargo, la literatura continúa siendo escasa acerca de la bioacumulación de contaminantes emergentes y de sus efectos en organismos invertebrados marinos, en concreto, en *Holothuria tubulosa*.

La Comisión OSPAR ha creado un Programa Coordinado de Seguimiento Ambiental (CEMP, *Coordinated Environmental Monitoring Programme*)⁶⁷ y lo ha adaptado para alinearlo con la Directiva Europea sobre la Estrategia Marina (MSFD, *Marine Strategy Framework Directive*)⁶⁸. Con esta iniciativa se pretende conseguir que el marco de la Unión Europea para la protección del medio marino sea uno de los más completos y ambiciosos del mundo, aunque debe reforzarse en diferentes áreas, por ejemplo, en el estudio de las interacciones que ocurren entre el agua, los sedimentos y la biota y, de este modo, poder comprender el destino y los efectos en el medio acuático de los EDCs, con el fin de respaldar la legislación con un conocimiento científico sólido. En este

⁶³ Mohammadzadeh, M., Bastami, K.D., Ehsanpour, M., Afkhami, M., Mohammadzadeh, F., Esmailzadeh, M. Heavy metal accumulation in tissues of two sea cucumbers, *Holothuria leucospilota* and *Holothuria scabra* in the northern part of Qeshm Island, Persian Gulf. *Marine Pollution Bulletin*, 103 (2016) 354-359.

⁶⁴ Goutte, A., Chevreuil, M., Alliot, F., Chastel, O., Cherel, Y., Eléaume, M., Massé, G. Persistent organic pollutants in benthic and pelagic organisms off Adélie Land, Antarctica. *Marine Pollution Bulletin*, 77 (2013) 82-89.

⁶⁵ Novelli, A., Losso, C., Ghetti, P.F., Ghirardini, A.V. Toxicity of tributyltin and triphenyltin to early life-styles of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21 (2002) 859-864.

⁶⁶ Arslan, O.C., Parlak, H., Oral, R., Katalay, S. The effects of nonylphenol and octylphenol on embryonic development of sea urchin (*Paracentrotus lividus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 53 (2007) 214-219.

⁶⁷ OSPAR Commission. OSPAR Coordinated Environmental Monitoring Programme (CEMP). OSPAR Agreement 2016-01.

⁶⁸ European Commission. Report on the implementation of the Marine Strategy Framework Directive (Directive 2008/56/EC). 2020.

aspecto, cabe destacar algunas investigaciones realizadas en los últimos años⁶⁹⁻⁷², aunque una pequeña minoría ha sido desarrollada en la especie *Holothuria tubulosa*^{73,74}.

-
- ⁶⁹ Ruhí, A., Acuña, V., Barceló, D., Huerta, B., Mor, J.R., Rodríguez-Mozaz, S., Sabater, S. Bioaccumulation and trophic magnification of pharmaceuticals and endocrine disruptors in a Mediterranean river food web. *Science of the Total Environment*, 540 (2016) 250-259.
- ⁷⁰ Koba, O., Grabicova, K., Cerveny, D., Turek, J., Kolarova, J., Randak, T., Zlabek, V., Grabic, R. Transport of pharmaceuticals and their metabolites between water and sediments as a further potential exposure for aquatic organisms. *Journal of Hazardous Materials*, 342 (2018) 401-407.
- ⁷¹ Sanganyado, E., Rajput, I.R., Liu, W. Bioaccumulation of organic pollutants in Indo-Pacific humpback dolphin: a review on current knowledge and future prospects. *Environmental Pollution*, 237 (2018) 111-125.
- ⁷² Rocha, A.C., Camacho, C., Eljarrat, E., Peris, A., Aminot, Y., Readman, J.W., Boti, V., Nannou, C., Marques, A., Nunes, M.L., Almeida, C.M. Bioaccumulation of persistent and emerging pollutants in wild sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Environmental Research*, 161 (2018) 354-363.
- ⁷³ Martín, J., Zafra-Gómez, A., Hidalgo, F., Ibáñez-Yuste, A.J., Alonso, E., Vílchez, J.L., Navalón, A. Multi-residue analysis of 36 priority and emerging pollutants in marine echinoderms (*Holothuria tubulosa*) and marine sediments by solid-liquid extraction followed by dispersive solid phase extraction and liquid-chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *Talanta*, 166 (2017) 336-348.
- ⁷⁴ Parra-Luna, M., Martín-Pozo, L., Hidalgo, F., Zafra-Gómez, A. Common sea urchin (*Paracentrotus lividus*) and sea cucumber of the genus *Holothuria* as bioindicators of pollution in the study of chemical contaminants in aquatic media. A revision. *Ecological Indicators*. 113 (2020) 106185.

CAPÍTULO I

Materiales y métodos

En este capítulo se describen los reactivos, disolventes, material de laboratorio, instrumentación y programas informáticos utilizados para la elaboración de la presente investigación, así como los procedimientos estadísticos llevados a cabo para la calibración y validación de los métodos analíticos desarrollados.

1. REACTIVOS Y DISOLVENTES

- Acetonitrilo. Calidad LC-MS. Scharlau®.
- Ácido clorhídrico. Calidad analítica. Scharlau®.
- Acido fórmico, 98-100%. HPLC LiChropur®. Sigma-Aldrich.
- Agua purificada (H₂O) (18 MΩ·cm) mediante sistema Milli-Q®. Merck Millipore.
- Amoníaco, ACS reagent, 25% v/v, aditivo para LC-MS. Sigma-Aldrich.
- C18 granel. Calidad analítica. Supelco (Sigma-Aldrich).
- Cloruro de sodio. Calidad analítica. Honeywell (Fluka).
- Metanol. Calidad LC-MS. Scharlau®.
- PSA (amina primaria/secundaria). Calidad analítica. Scharlau®.
- Sulfato de magnesio. Calidad analítica. Panreac.
- Sulfato de sodio. Calidad analítica. J.T. Baker.
- Patrones puros.

Todos los patrones utilizados se muestran en la **Tabla 1.1**. Se disolvieron en metanol o acetonitrilo.

Tabla I.1. Listado y características de los patrones analíticos utilizados.

Nombre	Abreviatura	CAS	Pureza	Marca Comercial
Metilparabeno	MPB	99-76-3	99%	Sigma-Aldrich
Etilparabeno	EPB	120-47-8	99%	Sigma-Aldrich
Propilparabeno	PPB	94-13-3	99%	Sigma-Aldrich
Butilparabeno	BPB	94-26-8	99%	Sigma-Aldrich
Fenilparabeno	PhPB	17696-62-7	98%	Fluorochem
Etilparabeno deuterado	EPB-d ₅	126070-21-1	95%	Cambridge Isotope Laboratories
Triclosán	TCS	3380-34-5	97%	Sigma-Aldrich
Triclocarbán	TCC	101-20-2	99%	Sigma-Aldrich
Bisfenol F	BPF	620-92-8	98%	Sigma-Aldrich
Bisfenol E	BPE	2081-08-5	98%	Sigma-Aldrich
Bisfenol A	BPA	80-05-7	99%	Sigma-Aldrich
Bisfenol B	BPB	77-40-7	98%	Sigma-Aldrich
Bisfenol AF	BPAF	1478-61-1	99%	Sigma-Aldrich
Bisfenol S	BPS	80-09-1	98%	Sigma-Aldrich
Bisfenol P	BPB	2167-51-3	99%	Sigma-Aldrich
Bisfenol A deuterado	BPA-d ₁₆	96210-87-6	98%	Sigma-Aldrich
Benzofenona 3	BP-3	131-57-7	98%	Sigma-Aldrich
Benzofenona deuterada	BP-d ₁₀	22583-75-1	99%	Sigma-Aldrich
Ácido perfluorobutanoico	PFBuA	375-22-4	98%	Sigma-Aldrich
Ácido perfluoropentanoico	PFPeA	2706-90-3	97%	Sigma-Aldrich
Ácido perfluorohexanoico	PFHxA	307-24-4	98%	Sigma-Aldrich
Ácido perfluoroheptanoico	PFHpA	375-85-9	99%	Sigma-Aldrich
Ácido perfluorooctanoico	PFOA	335-67-1	99%	Sigma-Aldrich
Ácido perfluorooctano-sulfónico	PFOS	1763-23-1	99%	Sigma-Aldrich
Ácido perfluorooctanoico- ¹³ C ₄	PFOA- ¹³ C ₄	159118-65-7	98%	Cambridge Isotope Laboratories

2. MATERIAL DE LABORATORIO

En este apartado se enumera todo el material de laboratorio utilizado para el desarrollo del trabajo experimental.

- Botellas de vidrio ámbar de 100 mL de capacidad.
- Botellas de vidrio graduadas de 1 litro Pyrex®.
- Gradillas.
- Matraces aforados clase A de diferentes volúmenes.
- Micropipetas de 100, 250 y 1000 µL.
- Mortero de acero inoxidable.
- Parafilm M® Laboratory Film.
- Pesasustancias.
- Pipetas Pasteur de vidrio y de plástico.
- Puntas de micropipetas.
- Tapones de rosca para viales cromatográficos.
- Tubos cilíndricos de vidrio de 10 mL de capacidad.
- Tubos cónicos Falcon de 50 mL de capacidad.
- Tubos eppendorf de 1,5 y 2 mL.
- Vasos de precipitados de diferentes capacidades.
- Viales de vidrio para inyección cromatográfica.

La limpieza y mantenimiento de todo el material empleado se realizó con detergente y/o mezcla crómica y enjuagando posteriormente con abundante agua desionizada y metanol, antes de su posterior utilización.

3. INSTRUMENTACIÓN

Los instrumentos y aparatos empleados para el desarrollo de los experimentos llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral fueron:

- Agitador Vórtex Yellowline TTS2 (IKA).
- Balanzas analíticas
 - PJ 360 Delta Range (Mettler). Máx = 310 g – Min = 0.01 g; e = 0.01 g; d = 0.001 g.
 - GR-200 (AND). Máx = 210 g – Min = 0.01 g; e = 0.001 g; d = 0.0001 g.
 - GX-400 (AND). Máx = 410 g – Min = 0.02 g; e = 0.01 g; d = 0.001 g.
- Baño de ultrasonido Ultrasons-HD (JP Selecta).
- Centrífuga Universal 320 (Hettich).
- Concentrador a vacío CoolSafe™ ScanSpeed MaxiVac (Scanvac).
- Cromatógrafo Acquity UPLC™ I-Class acoplado a espectrómetro de masas triple cuadrupolo Xevo TQ-XS™ (Waters), provisto de:
 - Bomba: Quaternary Solvent Manager. Acquity UPLC I-Class (Waters).
 - Inyector: Sample Manager-TFN. Acquity UPLC (Waters).
 - Detector: Xevo TQ-XS, equipado con una sonda ortogonal Z-Spray™ electro-spray ionization (ESI) (Waters).
- Cromatógrafo HPLC Agilent serie 1200 (Agilent, EEUU), equipado con un desgasificador de vacío, una bomba binaria, un muestreador automático y un compartimento termostatzado para la columna. El sistema LC está acoplado a un espectrómetro de masas de triple

cuadrupolo 6410, equipado con una fuente de ionización de electrospray (ESI) de Agilent.

- Liofilizador CoolSafe™ (Scanvac).
- Microcentrífuga Spectrafuge 24D (Labnet).
- Refrigerador *Reddot design award* (Samsung), provisto de dos compartimentos: 4 °C y -20 °C.
- Sonda de ultrasonidos Digital Sonifier S450D (Branson), provista de:
 - Convertidor tipo 102.
 - Resonador estándar de 12.7 mm de diámetro.
 - Punta enroscable de 12.7 mm de diámetro.
 - Sonda de temperatura.
 - Micropunta enroscable de diámetro final 3 mm.

4. PROGRAMAS INFORMÁTICOS

- Paquete Microsoft® Office: Word®, Excel® y PowerPoint® 2016.
- Software de tratamiento estadístico Statgraphic Plus, versión 5.0.
- Software MassLynx, versión 4.1 (SNC 803). Programa de gestión y tratamiento de los datos obtenidos con el cromatógrafo Acquity UPLC™ I-Class-Xevo TQ-XS™ de Waters.
- Software MassHunter. Programa de gestión y tratamiento de los datos obtenidos con el cromatógrafo HPLC Agilent serie 1200 – QqQ 6410 de Agilent.

5. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ULTRA ALTA RESOLUCIÓN ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM

Tradicionalmente, la separación de EDCs se ha llevado a cabo empleando como técnica principal la cromatografía de líquidos en fase inversa (RP-LC) acoplada a diferentes tipos de detector, y usando columnas estándar con rellenos C8 o C18. En los últimos años y gracias a la investigación de las casas comerciales dedicadas al campo de la cromatografía, se ha dado un nuevo paso en la evolución de la técnica hacia el uso de columnas de menor tamaño de partícula ($< 3 \mu\text{m}$), con menores diámetros de columna (2.1 mm de diámetro interno, i.d.) y menores longitudes que las tradicionales (1 a 10 cm), capaces de trabajar a flujos de fase móvil óptimos para el acoplamiento con la espectrometría de masas con interfaces ESI ($100\text{-}500 \mu\text{L min}^{-1}$). Estos nuevos diseños de columna cromatográfica permiten una mejora notable en las características del pico cromatográfico en cuanto a forma y resolución respecto a las columnas tradicionales y con tiempos de análisis notablemente más cortos, de un orden de magnitud menores. El inconveniente de estas nuevas columnas aparece por el gran incremento en la presión necesaria del sistema llegando hasta 1000 bares. Esto ha obligado a las casas comerciales a diseñar cromatógrafos dotados con bombas capaces de proporcionarlas y elementos capaces de resistirlas sin perder sus prestaciones. Son los llamados equipos de UHPLC. En la **Figura 1.1** se muestra el modelo empleado en la presente Tesis Doctoral.



Figura I.1. Equipo de cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplado a espectrometría de masas empleado. Waters Acquity UPLC™ I-Class–Xevo TQ-XS™.

Esta técnica de ultra alta resolución emplea las mismas fases móviles que la cromatografía de líquidos de alta resolución tradicional. Los disolventes habituales en la separación específica de los compuestos de interés seleccionados en esta tesis son agua, metanol y acetonitrilo. Además, para la detección por espectrometría de masas, se utilizan como aditivos para incrementar la eficiencia en la ionización, electrolitos que no dejan residuo como acetato de amonio, amoníaco, ácido acético, ácido fórmico o trietilaminas, especialmente en la interfase ESI.

Se podría determinar cierta incompatibilidad entre la cromatografía de líquidos y la espectrometría de masas, ya que la primera utiliza una fase móvil líquida (que suele contener cantidades relevantes de agua) a alta presión, mientras que la segunda se debe mantener en condiciones de alto vacío. Este contratiempo se resuelve colocando una *interfase* entre ambos dispositivos, cuya finalidad es descartar la fase móvil tanto como sea posible, pero permitiendo el paso de la máxima cantidad de analito desde el cromatógrafo hacia el detector, para no comprometer la sensibilidad del método. En esta

interfase se produce la ionización de las moléculas, que se convierten en iones en fase gaseosa, y a partir de estas condiciones el espectrómetro de masas es capaz de generar toda la información analítica. Los iones se separan, se detectan y se miden ateniendo a su relación masa/carga (m/z). Los métodos de ionización más comunes en LC-MS incluyen:

- Ionización por impacto electrónico (EI)
- Ionización química (CI)
- Bombardeo rápido de átomos (FAB)
- Ionización por *termospray* (TSP)
- Ionización por *electrospray* (ESI)
- Ionización química a presión atmosférica (APCI)

Durante la presente Tesis Doctoral se ha empleado una interfase de tipo ESI (**Figura 1.2**). Este sistema de ionización es de especial interés analítico, porque ocurre a presión atmosférica, lo que supone una gran facilidad para acoplarse al sistema de cromatografía de líquidos; asimismo, la eficiencia de la ionización es de 10^3 a 10^4 veces mayor que para la ionización química a presión reducida⁷⁵, lo que hace que sea un método de ionización muy sensible y robusto.

⁷⁵ De Hoffman, E., Stroobant, V. Mass Spectrometry. Principles and Applications. John Wiley & Sons. 3rd ed. England (2007) 502 pp.

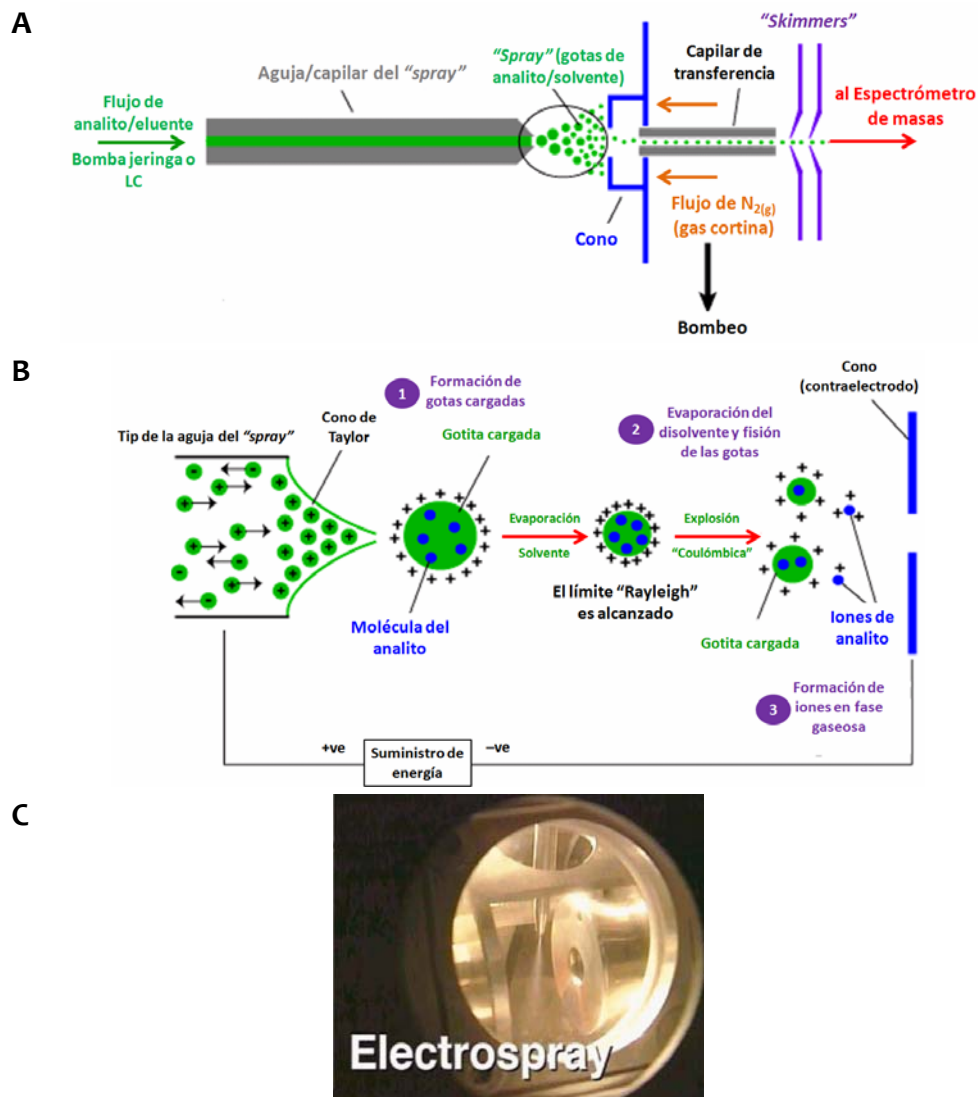


Figura I.2. Método de ionización por electrospray (ESI). **A** Estructura de la interfase. **B** Mecanismo de ionización. **C** Imagen de la formación del spray.
(Fuente: <http://www.bris.ac.uk/nerclsmf/techniques/hplcms.html>)

Este tipo de ionización es muy suave con muy poca energía residual retenida por el analito después de la ionización, no produciendo excesiva fragmentación de la molécula dentro de la fuente, lo que la dota de buena selectividad. Los compuestos de bajo peso molecular forman generalmente iones monocargados por pérdida o ganancia de un protón, y las biomoléculas de alto peso molecular y polímeros forman iones multicargados, pudiendo

formar aductos o multímeros con el disolvente; los más comunes son: NH_4^+ ($M+18$), Na^+ ($M+23$) y K^+ ($M+39$).

El espectrómetro de masas Xevo TQ-XS™ acoplado al cromatógrafo UPLC™ I-Class de Waters® se caracteriza por tener una *interfase ESI ortogonal Uni-Spray™* (Figura 1.3). Esta fuente genera varios mecanismos diferentes para producir gotas más pequeñas y mejorar la desolvatación. Estos efectos se combinan para producir un mayor número de iones libres a partir de la misma cantidad de muestra en comparación con los modos de ionización tradicionales (ESI) y en la mayoría de los casos da como resultado un aumento de la respuesta en una amplia gama de compuestos. En general, la interfase ESI presenta gran sensibilidad y selectividad para el análisis de productos de cuidado personal en muestras complejas. Tanto los bisfenoles, como los parabenos, benzofenonas, triclosán y triclocarbán se suelen analizar usando el modo de ionización negativo, empleando aditivos apropiados en las fases móviles para mejorar la eficiencia de ionización.

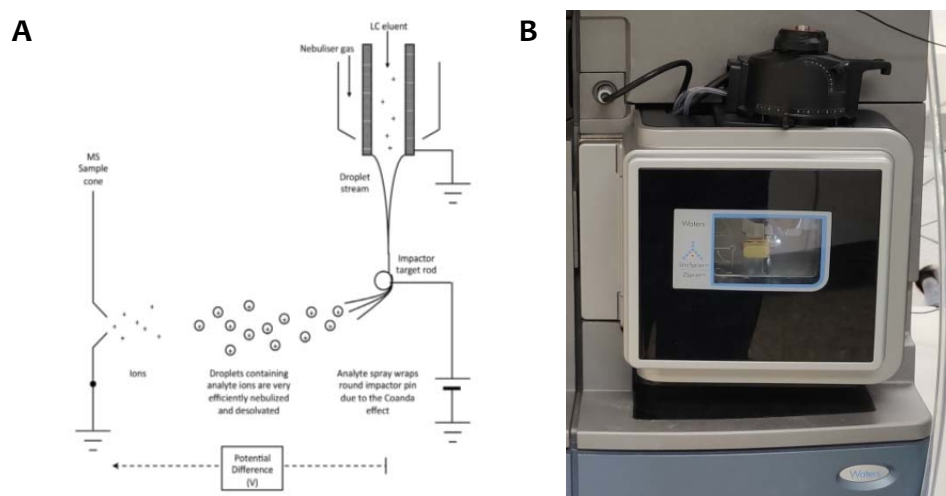


Figura 1.3. A Esquema. B Imagen de la interfase ESI Uni-Spray™ (Fuente: Waters®)

El detector de masas más utilizado para análisis cuantitativo a nivel traza debido a su sensibilidad es el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. En él, después de generar iones en la fuente, se fragmentan en el primer cuadrupolo (Q_1). Aplicando un **voltaje de cono** se selecciona un único

fragmento, denominado ion precursor, en función de su relación masa/carga (m/z), que debe ser característico del propio analito que queremos determinar. El voltaje de cono permite eliminar asociaciones no deseadas entre el ion objetivo y cualquier otra especie que acompañe al analito. Este voltaje debe ser lo suficientemente elevado para eliminar estas asociaciones, pero lo suficientemente bajo para no causar la ruptura del ion precursor. Este ion precursor pasa a una segunda parte, celda de colisión (q_2), en la cual se induce una nueva fragmentación, producida por la colisión de un gas neutro (disociación inducida por colisión, CID), que genera varios iones producto. Estos iones generados serán separados y analizados en función de su relación masa/carga (m/z) aplicando un potencial eléctrico, denominado **energía de colisión**, en el tercer cuadrupolo (Q_3). En la **Figura 1.4** se muestra un esquema de los procesos llevados a cabo en el interior de un triple cuadrupolo.

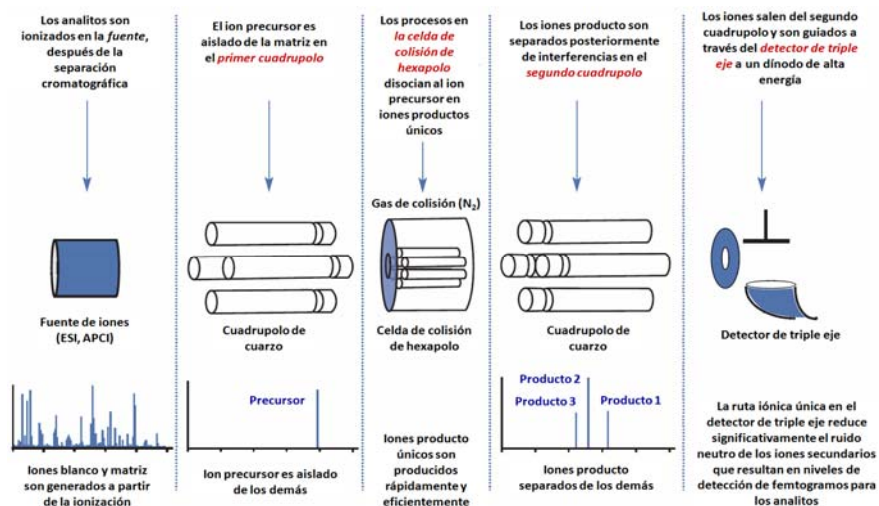


Figura 1.4. Esquema de los procesos llevados a cabo en el interior de un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. (Fuente: Waters®)

Existen varios modos de análisis en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo:

- **Product ion scan.** En Q_1 se selecciona el ion precursor de interés y todos los iones producto se detectan y se registran, obteniendo un espectro MS/MS completo.

- **Precursor ion scan.** Se fija una relación m/z determinada en Q3 con el objetivo de detectar todos aquellos iones precursores que originan ese ion producto concreto.
- **Neutral loss scan.** Se realiza un barrido tanto en Q1 como en Q3 fijando una diferencia de relación m/z entre los barridos, de modo que solamente se obtiene respuesta para aquellos iones en el Q1 que sufran una pérdida de masa igual a la diferencia establecida entre los cuadrupolos.
- **Selected reaction monitoring (SRM).** El Q1 y el Q3 están fijados para fragmentar un único ion precursor y detectar un solo ion producto. Este modo se utiliza únicamente para el análisis de sustancias previamente pre-seleccionadas (target), requiere que ambos iones sean conocidos, lo cual mejorará la selectividad y la sensibilidad de los análisis. A cada análisis SRM se le conoce como transición, si se analizan varias simultáneamente en un mismo análisis se denomina *Multiple Reaction Monitoring (MRM)*. En este modo (**Figura I.5**), la confirmación de los positivos obtenidos se realiza con una segunda transición, en la cual el ion producto seleccionado es diferente al primero.

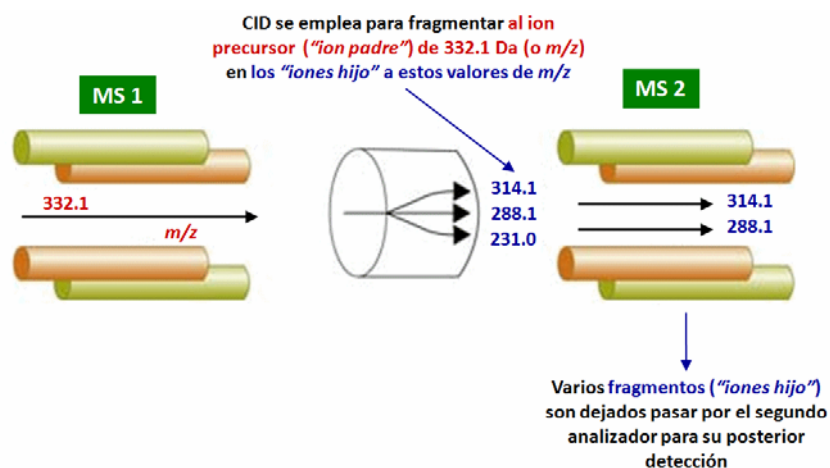


Figura I.5. Fundamento del modo Multiple Reaction Monitoring (MRM).

6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE DATOS ANALÍTICOS

6.1. Diseño experimental y optimización de variables

El diseño estadístico de experimentos es el proceso de planificar un experimento para obtener datos apropiados que puedan ser analizados mediante métodos estadísticos con el objeto de obtener conclusiones válidas y objetivas⁷⁶.

El empleo de técnicas de extracción de microcontaminantes en matrices de naturaleza compleja requiere de una optimización adecuada de todas las variables implicadas en cada caso. Del entendimiento de la naturaleza y las características del proceso de extracción resultará el establecimiento de las variables relevantes más influyentes que serán estudiadas en la optimización del método. Podemos encontrar con un *diseño univariante*, es decir, que los factores involucrados en el análisis son independientes. No obstante, este método clásico de optimización es largo, tedioso y presenta numerosos inconvenientes.

Las interacciones entre variables suelen ser muy frecuentes y a veces son los efectos más importantes sobre la respuesta de un sistema, por lo que conocerlas es imprescindible para comprender su comportamiento. Para ello, se puede variar más de un factor simultáneamente al realizar un nuevo experimento, *diseño multivariante (Figura 1.6)*. En todos ellos se observa una o más variables experimentales dependientes (respuestas: y) cuyo valor depende de una o más variables independientes controlables (factores: x). Las respuestas también pueden estar influidas por otras variables que no son controladas por el experimentador (z).

⁷⁶ Montgomery, D.C. Diseño y Análisis de Experimentos, *Limusa Wiley*. 2^{da} ed. México (2004) 686 pp.

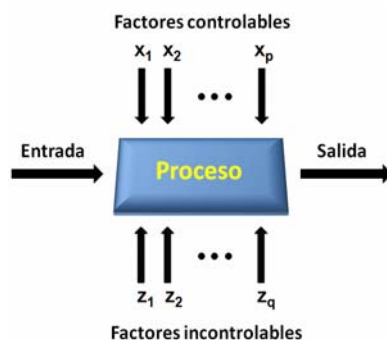


Figura 1.6. Esquema general de un proceso o sistema.

En química analítica, se emplea la aplicación de métodos de superficie de respuesta. La metodología de superficie de respuesta (RSM) consiste en un grupo de técnicas matemáticas y estadísticas que se basan en el ajuste de modelos empíricos a datos obtenidos a partir de un diseño experimental. Para cumplir este objetivo, se emplean funciones lineales o polinomiales para describir el sistema estudiado, y adicionalmente, para explorar (modelar y desplazar) las condiciones experimentales hasta su optimización. El modelo más simple que se puede emplear en la RSM se basa en una función lineal. Pero en este caso, la respuesta no presentará ninguna curvatura. Para evaluar la curvatura, se debe usar un modelo de segundo orden. Los *diseños factoriales de dos niveles* se emplean para estimar los efectos de primer orden, pero fallan en la evaluación de efectos adicionales, como los efectos de segundo orden. Si adicionalmente se desean estudiar las *interacciones entre las variables*, será necesario seleccionar modelos más complejos, donde hay que asegurarse que, en el diseño experimental, todas las variables se estudien por lo menos a tres niveles. Con este objeto, se requieren de diseños de segundo orden simétricos como el *diseño factorial completo a tres niveles*, el *Box-Behnken*, el *compuesto central* y el *Doehlert*. Estos diseños difieren uno de otro en relación a la selección de los puntos experimentales, número de niveles por variables y número de experimentos y bloques. En esta Tesis doctoral se han empleado diseños factorial completo y Box-Behnken.

A. Diseño factorial completo a tres niveles. Es una matriz de experimentos que tiene una aplicación limitada en RSM cuando el número de factores es superior a 2, porque el número de experimentos que se requiere para este diseño (que se calcula por la expresión $N = 3k$, donde N es el número de experimentos y k es el número de factores) sería demasiado grande, con lo que se perdería la eficiencia en la modelación de funciones cuadráticas. La **Figura 1.7** muestra la representación de este diseño para dos variables, que fue el que se empleó en la presente Memoria para la optimización de la técnica de extracción asistida por ultrasonidos de los compuestos seleccionados en *Mytilus galloprovincialis*, y para un segundo ensayo de optimización del proceso de limpieza de los extractos obtenidos de la misma. Asimismo, la **Tabla 1.2** muestra la matriz experimental para la optimización de dos variables usando este diseño.

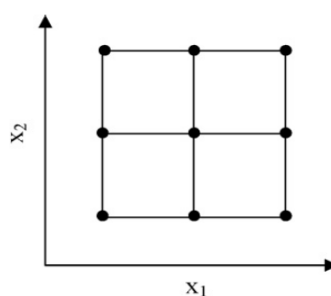


Figura 1.7. Diseño factorial completo de tres niveles para la optimización de dos variables (indicadas como x_1 y x_2)⁷⁷

Tabla 1.2. Matriz de experimentos para el diseño factorial completo de tres niveles para dos variables (indicadas como x_1 y x_2).

Experimento	x_1	x_2	Experimento	x_1	x_2
1	-1	-1	6	0	1
2	-1	0	7	1	-1
3	-1	1	8	1	0
4	0	-1	9	1	1
5*	0	0			

* Las réplicas del punto central no están incluidos en esta matriz

⁷⁷ Almeida Bezerra, M., Erthal Santelli, R., Padua Oliveira, E., Silveira Villar, L., Escaleira, L.A. Response Surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76:5 (2008) 965-977.

B. Diseño Box-Behnken (DBB). Es un diseño muy ampliamente usado en química analítica. Es un tipo de diseño de segundo orden rotatable o casi rotatable que se basa en un diseño factorial de tres niveles incompleto⁷⁸. La **Figura 1.8** muestra el DBB para tres factores, que corresponden a los valores codificados en la **Tabla 1.3**. El número de experimentos (N) requerido para el desarrollo de un DBB es $N = 2k(k - 1) + C_0$ (donde k es el número de factores y C_0 es el número de puntos centrales). Este diseño consiste en tres partes de cuatro experimentos cada una. Dentro de cada parte, dos factores se arreglan como un diseño completo de dos niveles, mientras que el nivel del tercer factor es fijado a cero. La representación gráfica del DBB para tres factores puede ser interpretada de dos maneras: primero, como un cubo que consiste de un punto central y el resto de puntos, cada uno en el medio de todas las aristas del cubo, como se observa en la **Figura 1.8a**; y segundo, un sólido geométrico que se forma a partir de tres diseños factoriales 2^2 unidos y un punto central, como se indica en la **Figura 1.8b**. Los puntos caen en la superficie de una esfera centrada en el origen del sistema coordinado.

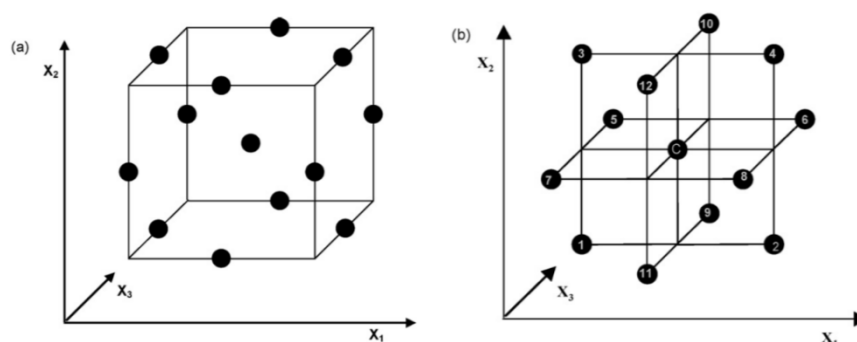


Figura 1.8. Diseño Box-Behnken para la optimización de tres variables (indicadas como x_1 , x_2 , y x_3)⁷⁹

⁷⁸ Box, G.E.P., Behnken, M.S. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2:4 (1960) 455–475.

⁷⁹ Ferreira, S.L.C., Bruns, R.E., Ferreira, H.S., Matos, G.D., David, J.M., Brandão, G.C., Da Silva, E.G.P., Portugal, L.A., Dos Reis, P.S., Souza, A.S., Dos Santos, W.N.L. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597:2 (2007) 179–186.

Tabla 1.3. Matriz de experimentos para el diseño Box-Behnken para tres variables (indicadas como x_1 , x_2 y x_3).

Experimento	x_1	x_2	x_3	Experimento	x_1	x_2	x_3
1	-1	-1	0	8	1	0	1
2	1	-1	0	9	0	-1	-1
3	-1	1	0	10	0	1	-1
4	1	1	0	11	0	-1	1
5	-1	0	-1	12	0	1	1
6	1	0	-1	13	0	0	0
7	-1	0	1				

* Las réplicas del punto central no están incluidos en esta matriz.

Algunos autores han propuesto el *diseño Box-Behnken* como idóneo para estimar una superficie de respuesta adecuada para la optimización de métodos espectrométricos, electroanalíticos y cromatográficos. Se trata de uno de los diseños de segundo orden más usados en la actualidad. La **Tabla 1.4** presenta la estructura y la eficiencia de este diseño hasta un máximo de 8 variables.

Tabla 1.4. Diseño Box-Behnken para hasta 8 variables.

Variables (k)	Número de coeficientes (p)	Número de experimentos (f)	Eficiencia (p/f)
2	6	---	---
3	10	13	0.77
4	15	25	0.60
5	21	41	0.61
6	28	61	0.46
7	36	85	0.42
8	45	113	0.40

A continuación, se debe examinar el modelo ajustado para asegurar que se adecúa al comportamiento del sistema real. El modelo queda validado si muestra una buena capacidad de predicción. El método más potente para la

validación del modelo es la aplicación del *análisis de varianza* (ANOVA). ANOVA comprueba la adecuación del modelo de regresión en términos de la prueba de falta de ajuste (*lack-of-fit test*) y si los coeficientes estimados son influyentes. También se debe evaluar el coeficiente de determinación (R^2), que mide cuantitativamente la correlación entre los datos experimentales y las respuestas predichas. Un valor de R^2 igual a 1.0 indica que la regresión se ajusta perfectamente a los datos.

Finalmente, también se puede validar el modelo de forma gráfica. El método gráfico más conocido es el *diagrama de Pareto* (**Figura I.9**). En este diagrama, las variables y las interacciones posibles aparecen en el eje y, mientras el valor del efecto estimado estandarizado es representado en el eje x. Estos efectos, para cada variable, aparecen como una barra horizontal, cuya longitud es proporcional al valor absoluto del efecto estimado, mientras que también se incluye una línea vertical de referencia que corresponde al intervalo de confianza especificado (95% habitualmente). El efecto se considera significativo si su valor sobrepasa esta línea de referencia mientras que los signos positivo y negativo revelan los casos cuando la respuesta es disminuida o incrementada, respectivamente, cuando se pasa del nivel más bajo al más alto de una variable específica. En el trabajo realizado en esta Tesis Doctoral se empleó un 95% de nivel de confianza.

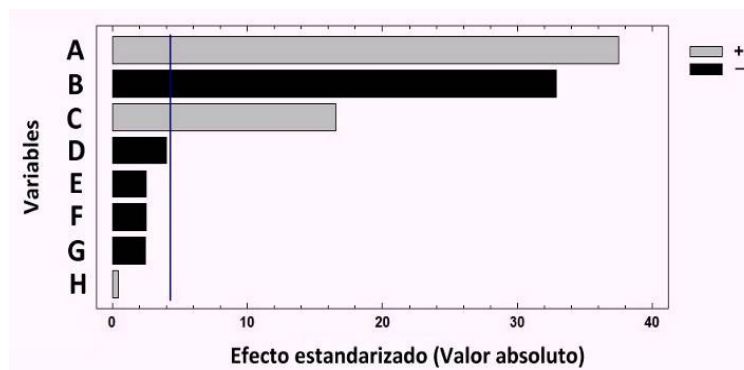


Figura I.9. Diagrama de Pareto. La línea vertical en el diagrama define el 95% del nivel de confianza, y permite determinar que, en este caso, solamente las variables A, B, C ejercen una influencia estadísticamente significativa en la respuesta.

6.2. Calibración analítica

Como fase integrante del proceso analítico, la calibración resulta de gran importancia y sólo se puede obtener una buena precisión en los resultados si se aplican buenos métodos de calibración. El modelo seleccionado en la presente Tesis Doctoral fue el lineal de regresión univariante por mínimos cuadrados, donde la variable independiente (concentración) se relaciona con la respuesta (señal instrumental) mediante una relación lineal de tipo: $y = a + b \cdot x$; donde y es la variable dependiente; x es la variable independiente; a y b son dos parámetros estimados a partir de los datos experimentales. En todos los casos se ha estudiado también la homogeneidad de varianzas, es decir, la condición de homocedasticidad, a partir del **análisis gráfico de los residuos**⁸⁰.

6.3. Validación del método analítico

La validación de cualquier método analítico debe realizarse a través de diferentes pruebas de laboratorio: *“La validación de un proceso analítico es el procedimiento por el cual éste es establecido a través de estudios de laboratorio, de modo que la información que de él se derive sea útil para cumplir los requerimientos necesarios de los problemas analíticos en los que será aplicado”*⁸¹.

Son numerosas las razones que justifican la necesidad de validar un método analítico. Entre ellas, caben destacar requerimientos regulatorios, buenas prácticas de laboratorio y control de calidad. El Código de Regulaciones Federales (CFR) 311.165c establece explícitamente que “la exactitud, sensibilidad, especificidad, y reproducibilidad de los métodos analíticos empleados deberán ser establecidos y documentados”.

La validación implica en primer lugar la verificación de la exactitud de los resultados que genera un método analítico. La exactitud se define por la

⁸⁰ Boqué, R., Rius, F.X., Avances en Quimiometría Práctica. Servicio de publicaciones e intercambio científico de la Universidad de Santiago de Compostela. España. (1994) 150-157.

⁸¹ USP 32. General Chapter 1225. Validation of Compendial Methods. United States Pharmacopeia XXXIII. Rockville: United Pharmacopoeial Convention, Inc. 2009.

Norma ISO 5725 como “el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y un valor de referencia aceptado”⁸². La exactitud combina dos propiedades: la veracidad y la precisión de los resultados. La veracidad se logra al eliminar los errores sistemáticos, mientras que la precisión se obtiene al minimizar los errores aleatorios. Para completar la validación de un método de análisis es necesario establecer otros parámetros de calidad del mismo, dentro de los cuales podemos incluir: rango dinámico lineal, linealidad, sensibilidad, selectividad, límites de detección y de cuantificación.

A. Evaluación de la exactitud. La exactitud de cualquier método analítico debe ser evaluada en términos tanto de veracidad como de precisión.

Veracidad. Se define como “el grado de concordancia entre la media aritmética de un conjunto de resultados y el valor aceptado o de referencia”⁸². Su evaluación consiste en estimar la concentración media del analito en una muestra y compararla con el valor verdadero empleando el protocolo estadístico apropiado. Ya que es imposible conocer el valor verdadero de una especie química en una muestra, es necesario obtener un valor verdadero convencional o aceptado para emplearlo como valor de referencia.

Antes de determinar la veracidad es necesario evaluar la existencia de “efecto matriz” y en consecuencia error sistemático proporcional. Este hecho se manifiesta por un cambio en las pendientes de las rectas de calibrado con patrones y en matriz. Para detectar este efecto, se deben comparar las pendientes de ambas rectas de calibrado⁸³ mediante un test de la *t de Student*. Las soluciones posibles para reducir/compensar el “efecto matriz” consisten en el uso de patrones internos y la preparación de rectas de calibrado de acuerdo al método de adición de patrón o la calibración en matriz, *matrix-matched calibration*, los cuales se aplican

⁸² Norma ISO 5725. Partes 1 y 2. Exactitud (Veracidad y Precisión). International Organization for Standardization. Ginebra. 1994.

⁸³ Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., De Jong, S., Lewi, P.J., Smeyers-Verbeke, J. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A. *Data Handling in Science and Technology*. Elsevier. Amsterdam (1997) 867 pp.

para matrices complejas que no pueden ser imitadas artificialmente. Ninguna de estas soluciones ofrece garantías totales de que el error sistemático se haya eliminado por completo, lo que obliga a validar siempre la veracidad de los métodos analíticos.

Para la estimación de la veracidad en la presente Tesis Doctoral, se han empleado los *ensayos de recuperación* sobre muestras libres de los analitos, dopadas con los compuestos objeto de estudio a un mínimo de tres niveles de concentración. El porcentaje de recuperación (%R), se calcula dividiendo la cantidad de analito encontrada mediante la interpolación en la función de calibración entre la concentración añadida al blanco de muestra. Esta forma de validación de la veracidad es la aceptada en la Decisión 2002/657/EC⁸⁴, cuando no existen materiales de referencia certificados.

Precisión. Mide el grado de concordancia entre resultados independientes de un ensayo obtenidos bajo condiciones estipuladas⁸². Desde un punto de vista práctico, la precisión viene determinada por la desviación estándar relativa o coeficiente de variación de la serie de resultados. La desviación estándar relativa de la concentración, RSD (*relative standar deviation*), se puede calcular a partir de la expresión:

$$\text{RSD} = 100 \cdot s_c / c$$

donde s_c es la desviación estándar obtenida a partir de replicados⁸⁵, y c es el valor de la concentración media.

La precisión se puede calcular en condiciones de *repetibilidad*, es decir, medidas realizadas en las mismas condiciones experimentales, en el mismo laboratorio, con el mismo operador, usando el mismo equipo y en un corto intervalo de tiempo, o de *reproducibilidad*, donde las medidas se

⁸⁴ Commission Decision 2002/657/EC. Official Journal of the European Communities. L 221 (2002).

⁸⁵ Cuadros-Rodríguez, L., García-Campaña, A.M., Jiménez-Linares, C., Román-Ceba M. Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment. *Analytical Letters*, 26:6 (1993) 1243-1258.

realizan con el mismo método, pero en diferentes laboratorios, con diferentes operadores y distintos intervalos de tiempo. Puede estimarse también la *precisión intermedia*, a partir de las variaciones dentro de un mismo laboratorio, por ejemplo, con medidas en diferentes días.

B. Otros parámetros de calidad. Estos parámetros se han evaluado a partir de las correspondientes rectas de calibrado. Para ello, se ha establecido un número de tres réplicas para cada nivel de calibración, empleando en todos los casos al menos seis valores de concentración igualmente espaciados sobre el intervalo de aplicación del método. Los parámetros evaluados a lo largo de esta Tesis Doctoral han sido⁸⁶:

- Rango dinámico lineal y linealidad.
- Sensibilidad. Límites de detección y de cuantificación.
- Selectividad.

Rango dinámico lineal y linealidad. El *rango dinámico lineal* (RDL) viene definido por el límite superior del intervalo de concentraciones en el que ha aplicado el método y el límite de cuantificación de dicho método. Por otra parte, la *linealidad* indica el grado de ajuste de los valores de la señal medidos sobre la recta de calibrado⁸⁷. En la presente Memoria se han evaluado dos tipos de linealidad:

- La *linealidad in-line* (en línea) estimada con el valor P del test de fallo de ajuste. Estableciéndose como condición de linealidad un valor $P \geq 5\%$.
- La *linealidad on-line* (sobre la línea), como el coeficiente de determinación (R^2).

⁸⁶ Shabir, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, 987:1-2 (2003) 57-66.

⁸⁷ Analytical Methods Committee. Is my calibration linear? *Analyst*, 119 (1994) 2363-2366.

Sensibilidad. Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ). Estos parámetros se asocian con la menor concentración de analito en una muestra que puede ser discernida del ruido de fondo, siendo posible su detección. El *límite de cuantificación* o de determinación (LOQ) es una medida de la capacidad de cuantificación inherente de un proceso de medida químico, es decir, la concentración de analito mínima cuantificable en una muestra. En esta Tesis, los límites de detección y cuantificación se han calculado a partir de la relación señal-ruido, obtenida directamente a partir del cromatograma. El LOD correspondería a aquella concentración en la que dicha relación es igual a 3 y el LOQ es igual a 10. Esta modalidad de cálculo cumple con los requerimientos de la Comisión Europea que establece los criterios relativos a la validación de un método y la interpretación de los resultados analíticos⁸⁸.

Selectividad (especificidad). La ICH define a la especificidad como “*la habilidad de distinguir inequívocamente la presencia del analito en medio de otros componentes que pueden encontrarse presentes. Típicamente se pueden incluir a impurezas, componentes de la matriz, etc.*”. Aunque es un parámetro de los más importantes a establecer en el proceso de aseguramiento de la calidad de un método de análisis, se trata de un concepto difícil de definir desde un punto de vista cuantitativo. En la práctica se suele representar la selectividad a través de la cuantificación de la interferencia producida por una especie química concreta en la determinación de un analito en un procedimiento dado, de modo que se establece un nivel máximo de interferente que no produce interferencia. En la presente Memoria, se ha evaluado este parámetro mediante la comparación del cromatograma correspondiente al blanco en cada caso y el mismo cromatograma correspondiente a dicho blanco dopado con diferentes concentraciones de cada analito.

⁸⁸ European Commission. Commission Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities. L 221 17/8/2002.

CAPÍTULO II

Revisión bibliográfica

**Contaminantes emergentes en
aguas naturales y residuales y
lodos de depuradora**

1. INTRODUCCIÓN

Un aspecto relevante a la hora de abordar una problemática como la que se aborda en la presente Tesis Doctoral, es el conocimiento previo del origen de la contaminación en los medios marinos objeto de estudio y por extensión en los bioindicadores seleccionados para los estudios de bioacumulación. Por invitación de dos revistas científicas internacionales de alto impacto en el campo de la química analítica ambiental, se realizaron dos trabajos de revisión bibliográfica sobre las diferentes metodologías analíticas publicadas en la literatura para la detección y análisis de EDCs en aguas tanto naturales como residuales, y en los lodos generados durante los procesos de depuración de estas últimas. Estos medios son punto de partida para la contaminación posterior de los medios marinos y terrestres, y son de interés como base para los estudios posteriores desarrollados en la presente Tesis.

Por lo general, estas metodologías consisten en detectar familias de contaminantes de semejantes características y estructura química. Estos métodos requieren, en su mayoría, un tratamiento eficiente de la muestra para disminuir todo lo posible la influencia de la matriz sobre el análisis final. Los procedimientos suelen constar de 3 etapas, esquematizadas para el análisis de EDCs en la **Figura II.1**:

1. Preparación de un **extracto** de la matriz a estudiar, a través de técnicas clásicas como la extracción líquido-líquido (LLE) o la extracción en fase sólida (SPE), o técnicas más modernas como la extracción asistida por ultrasonidos (UAE) o por microondas (MAE), la extracción con barras agitadoras adsorbentes (SBSE) o la técnica de los QuEChERS.
2. Realización de procesos de limpieza del extracto, denominada comúnmente **clean-up**, para reducir el efecto matriz, mediante extracción con adsorbentes dispersivos (C18 y/o PSA).
3. **Determinación** de los contaminantes objeto de estudio en el extracto mediante la técnica analítica seleccionada, principalmente

cromatografía de líquidos/gases acopladas a espectrometría de masas u otros detectores.

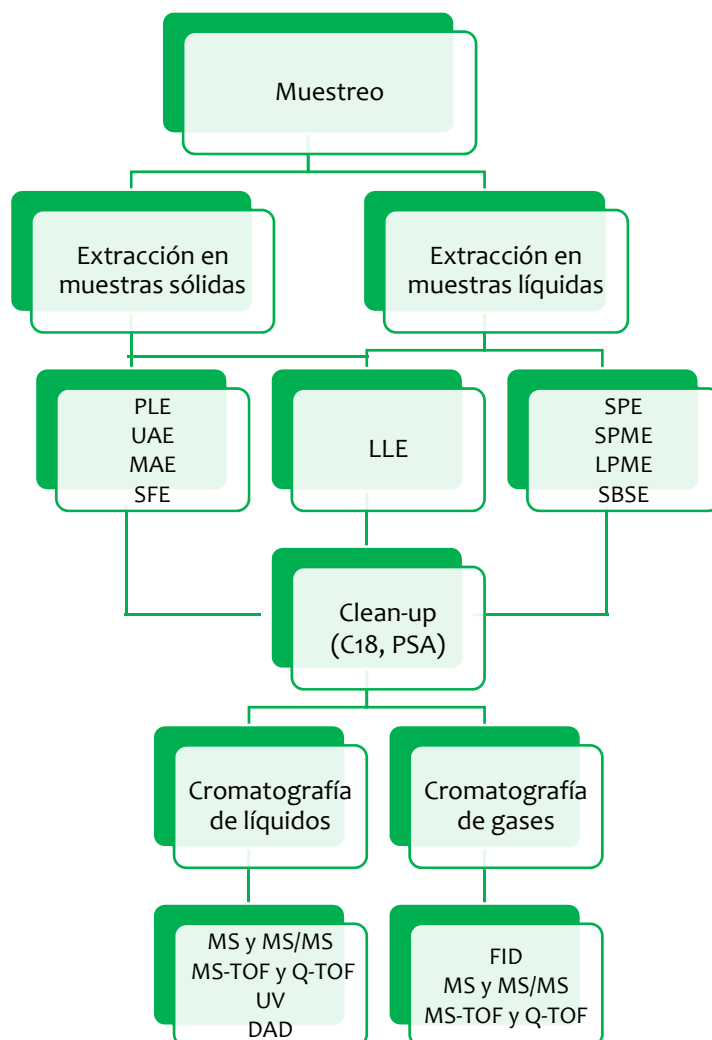


Figura II.1. Esquema adaptado³⁸ de la metodología analítica para la determinación de EDCs en aguas y lodos de depuradora.

A continuación, se describen de manera breve las metodologías más empleadas habitualmente en la extracción y determinación de EDCs en aguas tanto naturales como residuales y lodos de depuradora incluidas en los dos trabajos de revisión realizados durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral.

2. DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS NATURALES Y RESIDUALES. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS

2.1. Introducción

Los recursos hídricos se degradan continuamente debido al impacto humano en las actividades agrícolas, industriales, urbanas y turísticas [1]. La alta densidad de población, la expansión urbana y el desarrollo industrial implican un aumento de la demanda de agua. Además, este desarrollo implica riesgos simultáneos de contaminación y reducción del volumen de almacenamiento de agua dulce disponible [2]. Se han identificado una amplia variedad de sustancias como contaminantes en fuentes de agua, como compuestos orgánicos e inorgánicos, patógenos, nanopartículas, etc.

El desarrollo industrial ha generado un aumento en la cantidad de nuevas sustancias químicas producidas y empleadas en la actividad diaria que representan un motivo de preocupación para los ciudadanos, la comunidad investigadora y las autoridades. La contaminación de las aguas por contaminantes emergentes es un fenómeno extendido a todo el mundo. Los principales problemas relacionados con la contaminación de las fuentes de agua se han relacionado con la determinación de las vías de emisión y transporte y la definición de soluciones para la reducción de los riesgos e impactos relacionados con la contaminación [3]. La Directiva Marco del Agua (DMA) de la Unión Europea (UE) requiere la determinación de varios grupos de compuestos en las aguas dulces europeas [4]. La evaluación de estos productos químicos se basa en los riesgos ambientales para la salud de los ecosistemas acuáticos [5,6]. Se han encontrado varios estudios en la literatura sobre la presencia de sustancias antropogénicas en muestras de agua ambiental. Sin embargo, una minoría de estas sustancias está actualmente legislada o regulada desde el punto de vista de la contaminación ambiental [7-9].

Los contaminantes emergentes cubren una gama significativa de compuestos pertenecientes a diferentes familias de especies químicas, tales

como productos farmacéuticos, productos para el cuidado personal, plastificantes, retardadores de llama, disruptores endocrinos químicos, etc.; siendo sus efectos toxicológicos relativamente desconocidos [10]. Los productos farmacéuticos son una clase de contaminantes ambientales emergentes ampliamente utilizados en medicina humana y veterinaria y esenciales para la atención médica moderna. Su riesgo potencial para la salud humana ha despertado interés por los impactos negativos que pueden resultar de la contaminación continua del medio ambiente con los mismos [11]. Los éteres de difenilo polibromados (PBDEs) son aditivos retardantes de llama que se utilizan en una amplia gama de materiales poliméricos, como espumas, resinas y adhesivos. Estos compuestos son persistentes y se bioacumulan en el medio ambiente, lo que provoca efectos adversos en el ecosistema [12,13]. Además, se ha observado que las PDBE tienen riesgos potenciales para la salud humana, causando neurotoxicidad y alteración del sistema endocrino [14,15]. Los disruptores endocrinos químicos (EDCs) son un grupo de sustancias sintéticas y naturales capaces de alterar la función hormonal normal de la vida silvestre y los seres humanos [9]. Estos compuestos imitan y antagonizan la acción biológica de las hormonas naturales, lo que produce efectos adversos sobre la reproducción y el desarrollo. El bisfenol A (BPA) y sus derivados, los bifenilos policlorados (PCBs), los alquilfenoles (APs), los ftalatos, los filtros UV orgánicos, los parabenos (PB), etc., se incluyen en este grupo [16,17]. Las nanopartículas (NPs) son materiales sólidos formados por partículas inorgánicas y metálicas, lípidos, proteínas, polímeros sintéticos o naturales cuya longitud no supera los 100 nm [18-20]. Los NPs pueden liberarse naturalmente al medio ambiente durante la producción y el uso de los productos que los contienen. Se han notificado posibles efectos adversos para la salud humana debido a la exposición a NPs mediante inyección, absorción o inhalación, especialmente para nanopartículas metálicas, normalmente nanopartículas de oro (AuNP) y nanopartículas de plata (AgNP) [21-27].

La deficiente eficiencia de las plantas de tratamiento de aguas residuales (EDAR) es una de las principales causas que provoca la presencia de contaminantes emergentes en el medio acuático. Las EDAR suelen estar diseñadas para eliminar la demanda biológica de oxígeno, los sólidos en

suspensión y el amoníaco [28]. Sin embargo, no son adecuados para eliminar contaminantes presentes en niveles traza y que pueden presentar efectos ecotoxicológicos [29,30]. Hasta principios de este siglo, las regulaciones ambientales en todo el mundo no requerían pruebas explícitas para algunos contaminantes emergentes en las aguas. Dada la creciente preocupación por la contaminación del medio acuático con estos compuestos, la legislación ha comenzado recientemente a reconocer este problema potencial. El principal objetivo de la directiva marco europea 2000/60/CE [31] es salvaguardar el agua como patrimonio clave y recurso vital y escaso, y mantener un buen estado ecológico y químico de la misma. El control de la calidad ambiental de las fuentes de agua es una herramienta importante que puede servir como base para proteger el medio ambiente contra los efectos biológicos adversos de la exposición a sustancias químicas antropogénicas [32]. El objetivo de un entorno no tóxico se ha empezado a tener en cuenta hace relativamente poco tiempo, y todavía no se han estudiado muchos aspectos relevantes como por ejemplo, los efectos de las mezclas de contaminantes en la salud humana y el medio ambiente [33].

La DMA también requiere que cada estado miembro de la UE prepare planes de gestión de las cuencas hidrográficas (PHC) para enfrentar los problemas relacionados con la calidad del agua y su protección. En 2013, en respuesta a la creciente preocupación de la UE por la liberación de productos farmacéuticos sin tratar en el medio acuático, se incluyeron tres compuestos en la primera lista de vigilancia: diclofenaco, 17 β -estradiol y 17 α -etinilestradiol [11].

El objetivo de este trabajo de investigación bibliográfica es proporcionar una descripción general de los métodos desarrollados en los últimos 10 años para la determinación de contaminantes emergentes en muestras de agua provenientes de fuentes naturales de agua como ríos, lagos, mares y aguas residuales. Se hace hincapié en la preparación de muestras y en las técnicas cromatográficas utilizadas para la determinación de contaminantes.

2.2. Compuestos de interés

2.2.1. Retardantes de llama

El término "*retardante de llama*" se refiere a un grupo amplio de productos químicos, siendo los más destacados los éteres difenílicos polibromados (PBDEs). Estos últimos se han producido y utilizado industrialmente como retardantes de llama bromados (BFRs) durante más de cincuenta años [34]. Se pueden encontrar en una amplia gama de productos debido a su capacidad para prevenir o retrasar la propagación del fuego, incluidos materiales electrónicos (plásticos para ordenadores, televisores y cables), materiales de construcción (revestimientos, espumas, alfombras, tuberías de agua y alcantarillado), muebles o textiles [35]. Los PBDEs son aditivos que no están unidos covalentemente a la matriz de los polímeros y por tanto, pueden filtrarse al entorno circundante durante el proceso de producción, uso, eliminación o reciclaje. Además, su liberación se acelera mediante el calentamiento y el contacto con el aire o el agua [12,13].

Los PBDEs son sustancias hidrófobas que han demostrado tener propiedades acumulativas en los tejidos animales, en algunas especies de plantas y en la biota del suelo [36-38]. Tienen una alta persistencia y son ubicuos en todos los compartimentos ambientales (aire, sedimentos, aguas superficiales, aguas residuales), incluida la vida silvestre y los seres humanos [39]. Sin embargo, la mayoría de los PBDEs se acumulan en los océanos, a través de la deposición de la atmósfera, la escorrentía de la tierra o las aguas residuales [12].

Hay más de 200 posibles congéneres de PBDEs, pero tres de ellos son los más frecuentes en mezclas comerciales: c-pentaBDE, c-octaBDE y c-decaBDE [13]. Como se ha demostrado que los grados de bromación superiores a siete tienen menos efectos tóxicos debido a su mayor estabilidad, el c-decaBDE ha escapado a las prohibiciones legislativas [34]. Debido a sus propiedades peligrosas, el c-pentaBDE y el c-octaBDE se han prohibido y eliminado en Europa y América del Norte [40]. Los PBDEs se han convertido en una preocupación creciente en las últimas dos décadas debido a sus riesgos

potenciales para la salud humana. Las principales fuentes de exposición humana a estos compuestos son la dieta, principalmente a través de pescados y mariscos contaminados y el polvo. Los PBDEs tienen una toxicidad aguda baja; sin embargo, los PBDEs bromados de cadena inferior han mostrado efectos disruptores endocrinos, deficiencia neuroconductual y posiblemente riesgo de desarrollo de cáncer [40]. Estos BFR también se han encontrado en la leche materna, lo que es un hecho alarmante ya que el impacto de los PBDE es mucho mayor en los bebés y niños pequeños, dado su menor desarrollo [41,42].

2.2.2. *Fármacos y productos de cuidado personal*

Los PPCPs integran un gran grupo de compuestos orgánicos, desde compuestos farmacéuticos hasta productos de cuidado personal diario (PCPs). Estos van desde jabones, lociones, pasta de dientes, fragancias, protectores solares y repelentes de insectos hasta una variedad de otros productos cosméticos. Los fármacos incluyen antibióticos, hormonas, fármacos antiinflamatorios, fármacos antiepilépticos, reguladores de lípidos en sangre, betabloqueantes o fármacos citostáticos entre otros [43]. Los PPCPs se encuentran principalmente en ambientes acuáticos debido a sus propiedades polares. Su entrada a estos ecosistemas se produce a través de la descarga directa de aguas residuales y a través de los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales (STP) debido a una eliminación incompleta [43-46]. Muchos compuestos agrupados en PPCP son biológicamente activos y pueden interferir con el sistema endocrino. Los estrógenos esteroides (y los compuestos fenólicos que se utilizan habitualmente en tensioactivos, desinfectantes y antisépticos provocan alteraciones endocrinas en concentraciones relativamente bajas [47]. Esto puede provocar feminización en los machos, disminución de la fecundidad, anomalías del desarrollo y fenómenos intersexuales, entre otros efectos alarmantes [43, 48-51]. Se trata de compuestos ubicuos con alta persistencia en el medio ambiente y se bioacumulan en los organismos acuáticos. Esta bioacumulación se magnifica a niveles tróficos más altos, causando efectos adversos en la vida silvestre y los seres humanos [47]. La exposición continua a los antibióticos puede desencadenar la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos [52,53].

Además, la acción combinada de estos productos químicos puede tener efectos sinérgicos, lo que hace que los compuestos de baja persistencia tengan efectos no deseados en el medio ambiente [43,48,54]. Debido a estas propiedades peligrosas, los PPCPs se han considerado contaminantes emergentes y han recibido una mayor atención en los últimos años.

2.2.3. *Disruptores endocrinos químicos*

Los disruptores endocrinos (EDCs) son sustancias exógenas derivadas de fuentes antropogénicas o naturales capaces de alterar el sistema endocrino en humanos y animales [9]. Estas sustancias químicas pueden ser naturales (lignanos, cumestanos, isoflavonas, micotoxinas) o sintéticas, como el bisfenol A (BPA) y compuestos clorados (bifenilos policlorados, PCBs), alquilfenoles, ftalatos, filtros UV orgánicos y parabenos [16,17]. Se utilizan a menudo en el proceso de fabricación de productos plásticos, como botellas de agua, envases de alimentos o productos electrónicos. Durante la degradación de estos productos, los EDCs se liberan y se bioacumulan debido a sus propiedades de estabilidad, persistencia e hidrofobicidad. Por lo tanto, su presencia en el medio ambiente es ubicua. La exposición humana se produce generalmente por inhalación o absorción dérmica [55].

Los EDCs alteran la función normal del sistema endocrino al interferir con la unión del receptor, la esteroidogénesis y el metabolismo de las hormonas [56]. Estos productos químicos afectan tres aspectos de la función endocrina: (i) entrada neural al sistema endocrino, (ii) modulación hormonal del sistema nervioso y (iii) regulación de la biosíntesis, secreción y metabolismo de hormonas y receptores [57]. En la fauna silvestre se ha observado una correlación entre los EDC y trastornos como la oligospermia, el cáncer testicular y la feminización en los machos, el adenocarcinoma vaginal o la hiperplasia de próstata en machos adultos [17,57,58].

Aunque los EDCs pueden actuar en diversas etapas de la vida humana (desarrollo fetal, infancia, primera infancia, pubertad, edad adulta y vejez), se ha sugerido que la fuerza del impacto de los EDCs es mayor en las primeras etapas de la vida. La exposición a los EDCs durante el desarrollo (fetal y en la

primera infancia) puede tener efectos permanentes si se ve afectado un tejido en desarrollo específico [17]. Los problemas de salud derivados de la exposición a los EDCs se centran principalmente en los efectos adversos para la reproducción y el desarrollo. La alteración de las funciones reproductivas femeninas debido a estos productos químicos puede causar subfertilidad, infertilidad, producción inadecuada de hormonas, anomalías del ciclo menstrual, anovulación y senescencia reproductiva temprana [56]. Además, estas sustancias pueden pasar a través de la placenta de las mujeres embarazadas y/o ser secretadas a la leche materna debido a la acumulación de formas libres de EDCs en ciertos tejidos humanos, debido a su naturaleza lipofílica [17]. Esto podría dar lugar a una exposición del sistema nervioso central de los embriones y los recién nacidos a los EDCs, lo que afectaría a su correcto desarrollo [58-60]. La exposición a los EDCs se produce a niveles muy bajos, por lo que es complicado determinar sus efectos a largo plazo [57].

2.2.4. Nanopartículas

Las nanopartículas (NPs) son dispersiones de partículas orgánicas o partículas sólidas inorgánicas o metálicas cuya longitud está en el rango de 10-100 nm para al menos una dimensión [18-20]. Dependiendo de la dimensión, se clasifican en punto cuántico (0-D), nanoalambre o nanotubo (1-D), nanofilm (2-D) o nanoestructura (3-D). Han tenido un gran impacto en todos los campos de la ciencia debido a sus propiedades versátiles, como la resistencia mecánica, la polarización eléctrica o la magnetización, que varían según el material a granel utilizado en la nanopartícula [61]. Los usos de los NPs en materiales de uso diario incluyen su presencia en pelotas de golf, cera de esquí, productos de almacenamiento de energía, cosméticos y fármacos nanoterapéuticos [57]. La naturaleza de las nanopartículas abarca desde lípidos, proteínas, polisacáridos, polímeros sintéticos o naturales, óxidos metálicos y cerámicas hasta materiales magnéticos [20,21]. Según la composición de su estructura, las nanopartículas se pueden clasificar en nanopartículas inorgánicas, nanopartículas de base lipídica, nanopartículas poliméricas (PNPs) y nanopartículas magnéticas [19].

La presencia de NPs se ha extendido a protectores solares, ropa resistente a las manchas, equipamiento deportivo, adhesivos dentales, productos de limpieza o fármacos [20]. La liberación de nanopartículas al medio ambiente ocurre durante la producción y uso de estos productos [22,57]. Las vías de exposición incluyen la inhalación, la absorción a través de la piel o el tracto digestivo y la inyección, absorción o implantación voluntaria de sistemas farmacológicos [22]. La investigación ha demostrado los efectos adversos de las nanopartículas metálicas (AuNP y AgNP) en un modelo de piel humana, pulmones y células madre, junto con otros organismos, como las plantas [23-27]. Varios estudios informaron que la toxicidad de las nanopartículas metálicas es mayor cuando hay en los medios iones metálicos del mismo elemento [62]. Además, se ha demostrado que la concentración, el tamaño y la forma de las nanopartículas metálicas influyen en sus propiedades tóxicas [63,64]. Sin embargo, a pesar de los usos generalizados de las nanopartículas, las propiedades toxicológicas de las NP aún no se comprenden [22].

2.3. Métodos y aplicaciones

En los últimos años, el número de publicaciones científicas centradas en la determinación de contaminantes emergentes en medios acuosos ha crecido exponencialmente. Las **Tablas II.1-4** resumen las publicaciones más relevantes desde el punto de vista analítico. Para el tratamiento de muestras, se han utilizado la extracción líquido-líquido (LLE) y la extracción en fase sólida (SPE) principalmente. Además, se han considerado otras técnicas de extracción, como la microextracción en fase sólida (SPME), la extracción por adsorción con barra de agitación (SBSE), la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLE) o la microextracción por emulsificación asistida por ultrasonido (USAEME) para reducir el uso de disolvente a la vez que se elevan los factores de concentración. Como técnicas instrumentales, las más usadas para la detección y cuantificación de los compuestos estudiados en muestras de aguas naturales y aguas residuales son la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía de líquidos (LC) acoplada a espectrometría de masas (simple o en tándem).

Tabla II.1. Determinación de contaminantes emergentes en aguas naturales por cromatografía de gases.

Compuestos	Tratamiento de muestra	Rango LOD	Origen de muestra	Rango detectado	Ref.
GC-MS/MS					
PCPs	PBs, TCS y fenoles relacionados	- Filtrado; USAEME - Filtrado; HS-SPME	Agua de río (España) Agua de río (España)	13-7 pg L ⁻¹ 13 - 77.5 pg L ⁻¹	[66] [67]
	TCS y MTCs	- Filtrado; DLLME	Agua de grifo y de río (España), 2007	100.9 - 105.5 ng L ⁻¹	[68]
	Fragancias, olores terrosos-mohosos	- SPME (metal alloy fibre)	Agua superficial, potable y subterránea (Portugal), 2008-2009	No encontrado	[69]
Filtros UV	- Filtrado; Ajustar pH (3); SPME	LOQs: 0.5 - 10 ng L ⁻¹ 2 ng L ⁻¹	Agua de río (España), 2007-2008 Agua de río (Brasil), 2011-2012	37 - 52 ng L ⁻¹ <LOQ	[70] [71]
	- Filtrado; SPE (Strata X)	0.03 - 23.5 ng L ⁻¹	Agua de río (Brasil), 2012-2013	<LOQ	[72]
	- Filtrado; SPE (Strata X)				
OPs	PAHs, PEs, PCBs, PBDEs, APs, OCPs y BPA	- SPE (HLB)	Agua de río y mar (España)	Sin dato	[73]
	PAHs, PCBs, OCPs, PBDEs y APs	- SPE	Costas, puerto, desembocadura de río, agua de mar y agua de río (España)	0.2 - 1193 ng L ⁻¹	[74]
EDCS	Pesticidas, PAHs, drogas de abuso, nitrosaminas, productos farmacéuticos y de cuidado personal	- SPE (HLB) LLE (n-hexano)	Aguas de río, embalses y humedales (España), 2009-2010	1 - 1908 ng L ⁻¹	[75]
	EDCS	- Filtrado SPE automatizada (HLB)	Agua de lago (EEUU), 2003-2010	0.64 - 106 ng L ⁻¹	[76]
PBDEs	BDE-47, -138, -183, -209, -99	- Filtrado; Ajustar pH (<2) SPE	Agua subterránea (Canadá), 2004-2007	0.015 - 92 ng L ⁻¹	[77]
PPCPs	PPCPs	- Filtrado SPE automatizada (HLB)	Agua de lago (EEUU), 2003-2010	0.64 - 106 ng L ⁻¹	[76]
GC-MS					
PCPs	Fragancias de almizcle, PEs y lindano	- USAEME	Agua embotellada, piscina, agua de grifo, agua de río y agua de mar (España)	119 - 663pg mL ⁻¹	[78]
	Fragancias de almizcle	- SBSE-TD	Agua de río y subterránea (España), 2009-2010	63 - 530 ng L ⁻¹	[79]

Repelentes de insectos: DMP, butopironoxil, DEET, icaridina, permetrina, R-326, MGK-264 y PBO	- SBSE-TD	0.5 – 150 ng L ⁻¹	Río y lago (Alemania), 2007	3 – 45 ng L ⁻¹	[80]
	- SBSE-TD				
Filtros UV	- MEPS (C8)	0.2 – 63 ng L ⁻¹	Río y lago (Alemania), 2007	2 – 250 ng L ⁻¹	[81]
	- Ajustar pH (3); dSPE basado en MNPs	35 – 87 ng L ⁻¹	Agua de lago (Alemania), 2008	83 – 3052 ng L ⁻¹	[82]
	- Ajustar pH (5); SPME	0.2 – 6 ng L ⁻¹	Río, grifo y agua de mar (España)	56 – 1222 ng L ⁻¹	[83]
	- UA-DLLME	0.5 – 6.8 ng L ⁻¹	Agua de río (Singapur)	<LOD	[84]
	- Ajustar pH (2.5); Filtrado; DLLME	1 – 2 ng L ⁻¹	Agua de río (Taiwán)	6.1 – 15.4 ng L ⁻¹	[85]
	- Ajustar pH (2.5); Filtrado; DLLME	10 – 30 ng L ⁻¹	Agua de mar (España)	91 – 750 ng L ⁻¹	[86]
	- Ajustar pH (2-3); SPE (HLB)	0.1 – 1.9 ng L ⁻¹	Agua de mar (Eslovenia y Croacia), 2013	2.4 – 380 ng L ⁻¹	[87]
	- Filtrado; SPE (C18)	0.1 – 3 ng L ⁻¹	Agua de río (Japón), 2008	1 – 4780 ng L ⁻¹	[88]
	- Ajustar pH (3) SPE (Strata X)	13 – 266 ng L ⁻¹	Mar, piscina, lago y agua de río (Eslovenia), 2004	15–400 ng L ⁻¹	[89]
	- MASE-LVI-PTV	0.03 – 20.4 ng L ⁻¹	Estuario y agua de mar (España)	1.9 – 223 ng L ⁻¹	[90]
PAHs, PCBs, OCPs, PBDEs, PE, BPA y APs	- SPE (HLB) <i>Clean-up</i> : Florisil	1 – 75 ng L ⁻¹	Aguas costeras y estuarios (España), 2009	0.4 – 35583 ng L ⁻¹	[91]
	- LLE (DCM, neutro-ácido)	0.1 µg L ⁻¹	Aguas superficiales (Inglaterra y Gales), 2002-2012	50 – 9000 ng L ⁻¹	[92]
	- SPE (C18)	0.02–1 µg L ⁻¹	Agua superficial y subterránea (España)	Sin datos	[93]
Herbicidas de cloro-s-triazina	- Ajustar pH (7); Filtrado; SPE (ENV)	2.3 – 115 ng L ⁻¹	Agua de grifo y de acuífero (España)	38.2 – 248 ng L ⁻¹	[94]
	- Filtrado; Ajustar pH; SPE (HLB)	0.01 – 0.13 ng L ⁻¹	Aguas superficiales (China), 2006-2007	0.4 – 1.8 ng L ⁻¹	[95]
Estrógenos esteroides	- Filtrado; Ajustar pH (2-3); SPE (HLB)	0.10 – 0.65 ng L ⁻¹	Agua de río (China), 2007	0.64 – 55.3 ng L ⁻¹	[96]
	- Ajustar pH (3); Filtrado; SPE (HLB)	0.2 – 2 ng L ⁻¹	Agua de río (China), 2007	0.6– 8890 ng L ⁻¹	[97]
Estrógenos	- Ajustar pH (3); Filtrado; SPE (HLB)	0.2 – 2 ng L ⁻¹	Agua de río (China), 2007	0.6– 8890 ng L ⁻¹	[97]
	- Ajustar pH (3); Filtrado; SPE (HLB)	0.2 – 2 ng L ⁻¹	Agua de río (China), 2007	0.6– 8890 ng L ⁻¹	[97]
Fármacos y compuestos fenólicos: 4-t-OP, 4-NP, BPA, E1, E2 y TCS	- Ajustar pH (3); Filtrado; SPE (HLB)	0.2 – 2 ng L ⁻¹	Agua de río (China), 2007	0.6– 8890 ng L ⁻¹	[97]
	- Ajustar pH (3); Filtrado; SPE (HLB)	0.2 – 2 ng L ⁻¹	Agua de río (China), 2007	0.6– 8890 ng L ⁻¹	[97]

APs, BPA, y natural y hormonas sintéticas	- MEPS C18-Sorbents	2.1 – 87 ng L ⁻¹	Agua de río (Alemania), 2010	6.7 – 161 ng L ⁻¹	[98]
	- MEPS C18-Sorbents + MIP	1.3 – 22 ng L ⁻¹	Agua de estuario (España), 2013	52 – 59 ng L ⁻¹	[99]
	- Filtrado; Sorptive micro-extracción	15 – 89 ng L ⁻¹		83 – 347 ng L ⁻¹	
NP, OP, NP1EO, NP2EO, BPA, E1, 17a- y 17b-estradiol, E3, mestranol y EE2	- Filtrado; SPE (HLB)	1.9 – 14.0 ng L ⁻¹	Agua de mar (Grecia), 2005:2006	10.6 – 346 ng L ⁻¹	[100]
	- Filtrado SPE	0.1 – 1.2 ng L ⁻¹	Agua de río (China), 2009	0.78 – 189 ng L ⁻¹	[101]
EDPs	- Filtrado; SPE (ENV1-18)	<10 ng L ⁻¹	Embalses y agua de río (China)	37.9 – 2948.9 ng L ⁻¹	[102]
	- Filtrado; Ajustar pH (2) SPE (HLB)	0.6 – 5.5 ng L ⁻¹	Agua de río (Portugal), 2011	3.3 – 598.5 ng L ⁻¹	[103]
Estrógenos naturales y sintéticos, fármacos, compuestos industriales y pesticidas	- Filtrado; Ajustar pH (3) SPE (HLB)	18 – 90 ng L ⁻¹	Agua de río (Portugal), 2013	70 – 307.9 ng L ⁻¹	[104]
PBDES	- PC-HFME	0.04 – 0.21 ng L ⁻¹	Agua de mar (Singapur)	1.89 – 21.84 ng L ⁻¹	[105]
PDBE congéneres	- Sol-gel SWNTs-TSO-OH coated SPME-TD	0.08 – 0.8 ng L ⁻¹	Agua de embalse (China)	1.3 – 4 ng L ⁻¹	[35]
PBDES	- LLE (Hexano-DCM, 1:1, v/v)	LOQs: 0.007 – 0.067 ng L ⁻¹	Río y agua mineral (Alemania)	0.0005 – 0.0143 ng L ⁻¹	[39]
PBDEs, PFAAs	- C18 adsorción en fase sólida disk-LD; Clean-up: sílica	0.003 – 1 ng L ⁻¹	Aguas superficiales (Canadá), 2008-2009	0.02 – 47 ng L ⁻¹	[106]
	- Filtrado; Ajustar pH (<2) SPE	Sin datos	Aguas superficiales (Canadá), 2004-2007	0.015 – 92 ng L ⁻¹	[77]
BDE-47, -138, -183, -99, -209	- Filtrado; CPE-UABE	1 – 2 pg mL ⁻¹	Agua potable, lago y río (Argentina)	<LOD	[107]
	- Filtrado; USAEME	1 – 2 pg mL ⁻¹	Agua potable, lago y río (Argentina)	<LOD	[108]
BDE-17, -28, -47, -49, -66, -209	- Soxhlet; Clean-up: Florisil	Sin datos	Agua de lago (China), 2004-2005	1.1 – 1100 pg L ⁻¹	[109]
PBDE congéneres y PAHs	- Filtrado; LLE (DCM)	Sin datos	Agua de río (China), 2011	0.016 – 31.2 ng L ⁻¹	[110]
	Clean-up: columna multicapa				

PBDES, NBFRs, OPFRs	- SPE (HLB)	0.003 – 0.06 µg L ⁻¹	Agua de río (España), 2012	0.001 – 4.6 µg L ⁻¹	[111]
OH-PBDES	- Ajustar pH (3); LLE (Hexano-DCM, 1:1, v/v)	0.0039 – 0.0220 µg L ⁻¹	Lago, embalse y río (China), 2014	0.0034 – 0.131 µg L ⁻¹	[112]
APEs y BFRs	- Ajustar pH (ácido) SPE (Strata-X)	0.01 – 0.2 µg L ⁻¹	Agua de río (Sur de África), 2013	0.09 – 0.26 µg L ⁻¹	[113]
PBDES, DP, NBFRs, OPFRs	- SPE (ENVI)	0.017 – 0.03 pg L ⁻¹	Agua potable (Pakistán)	0.02 – 0.556 pg L ⁻¹	[114]
PBDES, OH- y MeO-BDES, HBCDs y TBBP-A	- Filtrado SPE (HLB)	0.002 – 0.3 ng L ⁻¹	Agua de río (Corea)	16.68 – 814 ng L ⁻¹	[115]
PPCPs	- Filtrado; Ajustar pH (4 o 7); SPE	0.1 – 5 ng L ⁻¹	Agua de río (China), 2005-2006	1 – 30548 ng L ⁻¹	[50]
CEC	- SPE	0.03 – 1350 ng L ⁻¹	Cuencas costeras urbanas (EEUU), 2011	0.4 – 1345 ng L ⁻¹	[116]
GC-HRMS	- SPE	1 – 250 ng L ⁻¹	Agua de río (EEUU), 2013	5.4 – 29000 ng L ⁻¹	[117]
Esteroides y hormonas	- SFE o CLLE con cloruro de metileno - Clean-up con alúmina en capas/columna Florisil si es necesario - Derivatización con BSTFA:TMCS	0.1 – 20 ng L ⁻¹	Muestras acuosas sin partículas visibles Método 1698 EPA	-	[118]
EDCS	- SFE o CLLE con cloruro de metileno a pH neutro - Clean-up con columna SPE de aminopropilo seguida de una columna de microsíllice o GPC - Clean-up de plaguicidas organoclorados o con cromatografía de gel de sílice, Florisil o alúmina	1 – 183 pg L ⁻¹	Muestras acuosas que contienen <1% de sólidos Método 1699 EPA	-	[119]

PBDES	BDEs	- SPE o SFE o CLLE con metileno	20 – 40 pg L ⁻¹	Muestras acuosas que contienen <1% de sólidos Método 1614A EPA	[120]
-------	------	---------------------------------	----------------------------	---	-------

Abreviaturas APes, etoxilados de alquilfenol; APs, alquilfenoles; BDEs, éteres de difenilo bromados; BFRs, retardantes de llama bromados; BPA, bisfenol A; CECs, químicos de preocupación emergente; CPE, extracción de punto de nube; DCM, diclorometano; DEET, N,N-dietil-m-toluamida; DMP, dimetil ftalato; DES, dietilstilbestrol; DLLME, microextracción líquido-líquido dispersiva; DP, dechlorane plus; E1, estrone; E2, estradiol; E3, estriol; ECD, detector de captura de electrones; EDCs, disruptores endocrinos químicos; EDPs, pesticidas disruptores endocrinos; EE2, 17 α -etililestradiol; GC, cromatografía de gases; HBCDs, hexabromociclododecanos; HRMS, espectrometría de masas de alta resolución; HS-SPME, microextracción en fase sólida con espacio de cabeza; ICP, plasma acoplado inductivamente; LD, digestión líquida; LLE, extracción líquido-líquido; LOD, límite de detección; LOQ, límite de cuantificación; MASE-LVI-PTV, extracción con disolvente asistida por membrana acoplada a vaporización a temperatura programada por inyección de gran volumen; MeO-BDEs, metabolitos metilizados de éteres de difenilo bromados; MEPS, microextracción con adsorbentes empaquetados; MGK-264, N-octil-bicicloheptano-dicarboximida; MIP, polímero de impresión molecular; MNPs, nanopartículas metálicas; MS, espectrometría de masas; MSD, detección selectiva de masas; MTCS, metil triclosan; 4-NP, 4-nonilfenol; NBFrs, nuevos retardantes de llama bromados; NP, nonilfenol; NPEO1, nonilfenol monoetoxilato; NPEO2, nonilfenol dietoxilato; OCPs, pesticidas organoclorados; OH-BDEs, éteres de difenilo bromados hidroxilados; OH-PBDEs, éteres de difenilo polibromados hidroxilados; OMPs, microcontaminantes orgánicos; OPs, contaminantes orgánicos; OPFRs, retardantes de llama organofosforados; PAHs, hidrocarburos aromáticos policíclicos; PBDEs, éteres de difenilo polibromados; PBs, parabenos; PBO, butóxido de piperonilo; PCBs, bifenilos policlorados; PC-HFME, microextracción de fibra hueca recubierta de polímero; PCPs, productos de cuidado personal; PES, ésteres de ftalato; PES, polietil-sulfona; PCPPs, fármacos y productos de cuidado personal; SBSE, extracción adsorbente con barras de agitación; SPE, extracción en fase sólida; SPME, microextracción en fase sólida; SWNTs-TSO-OH, nanotubos de carbono de pared simple con un aceite de silicona terminado en hidroxilo; TBBP-A, tetrabromobisfenol A; TCEP, Tris(2-carboxietil)fosfina; TCPP, Tris(2-cloropropil)fosfato; TD, digestión térmica; TDCPP, Tris(1,3-dicloro-2-propil)fosfato; TCS, triclosan; ToF, tiempo de vuelo; UABE, re-extracción asistida por ultrasonidos; USAEME, microextracción por emulsificación asistida por ultrasonido.

Tabla II.2. Determinación de contaminantes emergentes en aguas residuales por cromatografía de gases.

Compuestos	Tratamiento de muestra	Rango LOD	Origen de muestra	Rango detectado	Ref.
GC-MS/MS					
PBs, TCS y fenoles relacionados	- Filtrado; USAEME	3-9 – 27.5 pg L ⁻¹	Afluente/efluente de aguas residuales (España)	84 – 2784 pg L ⁻¹	[66]
	- Filtrado; HS-SPME	4 – 21 pg L ⁻¹	Afluente/efluente de aguas residuales (España)	14 – 2640 pg L ⁻¹	[67]
	- Filtrado; DLLME	2 – 5 ng L ⁻¹	Afluente/efluente de aguas residuales (España), 2007	81.7 – 95.5 ng L ⁻¹	[68]
PCPs	- SPME (metal alloy fibre)	0.02 – 20 ng L ⁻¹	Aguas residuales (Portugal), 2008-2009	444 – 471 ng L ⁻¹	[69]
	- Filtrado; Ajustar pH (3); SPME	0.5 – 10 ng L ⁻¹	Afluente/efluente de aguas residuales (España), 2007-2008	13 – 462 ng L ⁻¹	[70]
Filtros UV	- Filtrado; SPE (Strata X)	2 ng L ⁻¹	Aguas residuales (Brasil), 2011-2012	< LOQ	[71]
PAHs, PEs, PCBs, PBDEs, APs, OCPs y BPA	- SPE (HLB)	1 – 75 ng L ⁻¹	Efluentes de aguas residuales (España)	117 – 28437 ng L ⁻¹	[73]
	- SPE	1 – 75 ng L ⁻¹	Efluentes de aguas residuales (España)	0.8 – 116 ng L ⁻¹	[74]
GC-MS					
Fragancias de almizcle, PEs y lindano	- USAEME	7.4 – 133 pg mL ⁻¹	Afluente/efluente de aguas residuales (España)	31 – 2893 pg mL ⁻¹	[78]
	- SPE (Strata X)	5 – 10 pg L ⁻¹	Afluentes de aguas residuales (Italia)	Sin datos	[121]
Aquilbencenos, almizcles nitro y policíclicos, fenol, ftalatos	- Filtrado; SPE (C18 discs)	1 – 2 ng L ⁻¹	Afluente/efluente de aguas residuales (China), 2007	8 – 2300 ng L ⁻¹	[122]
PCPs	DMP, butopironoxil, DEET, icaridina, permetrina, R-326, MGK-264 y PBO	0.5 – 150 ng L ⁻¹	Afluente/efluente de aguas residuales (Alemania), 2007	3 – 3318 ng L ⁻¹	[80]
	Filtros UV	0.2 – 63 ng L ⁻¹ 35 – 87 ng L ⁻¹ 1 – 2 ng L ⁻¹ 0.1 – 3 ng L ⁻¹ 5 – 10 ng L ⁻¹	Afluente/efluente de aguas residuales (Alemania), 2007 Lake Efluentes de aguas residuales (Alemania), 2009 Efluentes de aguas residuales (Taiwán)	3 – 54 ng L ⁻¹ 102 – 461 ng L ⁻¹ 7.7 – 21.4 ng L ⁻¹ 2 – 169 ng L ⁻¹ 4.5 – 6969 ng L ⁻¹	[81] [82] [85] [88] [123]

	- Ajustar pH (3); DLLME	2 – 26 ng L ⁻¹	Efluentes de aguas residuales (Japón), 2008 Efluentes de aguas residuales (Noruega), 2013 Afluente/efluente de aguas residuales (Portugal), 2013	5.4 – 1247 ng L ⁻¹	[124]
PBBs, PCBs	- Filtrado; SPE (C18)	14 – 22 ng L ⁻¹	Aguas residuales (Sur de África)	0.28 – 0.31 ng L ⁻¹	[125]
PAHs, PCBs, OCPs, PBDEs, PEs, BPA y APs	- SPE (HLB) - Clean-up: Florisil	1 – 75 ng L ⁻¹	Efluentes de aguas residuales (España), 2009	16 – 15232 ng L ⁻¹	[91]
OPs	- Filtrado; SPE	LOQ: 0.05 – 580 ng L ⁻¹	Aguas residuales (EEUU), 2010	0.09 – 12500 ng L ⁻¹	[126]
OMPs	- LLE (n-heptano; pentano, DCM); Ajustar pH (3); Ajustar pH (<3) SPE	4.0 x 10 ⁻⁶ – 4.1 µg L ⁻¹	Afluente/efluente de aguas residuales (Austria)	1.1x 10 ⁻⁶ – 2169 µg L ⁻¹	[127]
Compuestos estrogénicos	- Filtrado; SPE (C18)	Sin datos	Afluente/efluente de aguas residuales (España), 2007	0.01 – 280 µg L ⁻¹	[128]
Estrógenos esteroides	- Filtrado; Ajustar pH; SPE (HLB)	0.01 – 0.13 ng L ⁻¹	Efluentes de aguas residuales (China), 2006-2007 Afluente/efluente de aguas residuales (Eslovenia)	0.15 – 2.20 ng L ⁻¹	[95]
Estrógenos	- SPE (HLB); Clean-up: gel de sílice - Filtrado; Ajustar pH (3-4); SPE (HLB) - Filtrado; SPE	0.2 – 2 ng L ⁻¹ 0.1 – 0.5 ng L ⁻¹ 0.4 – 2 ng L ⁻¹	Afluente/efluente de aguas residuales (China), 2006-2007 Afluente/efluente de aguas residuales (Estambul), 2009-2010	1.7 – 107.9 ng L ⁻¹ 1.9 – 260 ng L ⁻¹ 0.4 – 1074 ng L ⁻¹	[129] [130] [131]
EDCs	- Ajustar pH (ácido); Filtrado; SPE	0.01 – 0.15 µg L ⁻¹	Afluente/efluente de aguas residuales (Sur de África)	0.09 – 22 µg L ⁻¹	[132]
APEs y BFRs	- MEPS C18-Sorbents; +MIP - Filtrado; Microextracción por sorción	2.1 – 87 ng L ⁻¹ 6 – 55 ng L ⁻¹	Efluentes de aguas residuales (Alemania), 2010 Efluentes de aguas residuales (España), 2013	18 – 88 ng L ⁻¹ 99 – 88 ng L ⁻¹	[98] [99]
BDE-47-99, TCS y el metabolito PBDE-4-OH-BDE17	- SPE	0.05 – 0.15 ng	Efluentes de aguas residuales (Canadá)	0.05 – 5.86 ng	[133]
BDE-47, -85, -99, -100, -153, -154, -183, -196, -197, -206, -207	- Filtrado SBSE-LD	0.3 – 203.4 ng L ⁻¹	Aguas residuales (Portugal), 2004	Sin datos	[134]
PBDEs	- ORMOSIL-SPME	0.2 – 3.6 pg mL ⁻¹	Aguas residuales (China), 2006-2007	1.1 – 27.4 pg mL ⁻¹	[135]

TBECH, BTBPE, DBDPE, EBTPI, TBBPA AE, y TBBPA DBPE	- Filtrado; SPE disk (ENVI-18) Ajustar pH (3)	LOQs: 0.04 – 1.6 ng L ⁻¹	Afluente/efluente de aguas residuales (Noruega), 2009	0.1 – 440 ng L ⁻¹	[136]
PBDE congéneres y PAHs	- Filtrado; LLE (DCM) Clean-up: columna multicapa	0.008 – 1.2 ng L ⁻¹	Efluentes de aguas residuales (China), 2011	0.023 – 1437 ng L ⁻¹	[110]
PBDE congéneres	- Filtrado; LLE (DCM)	Sin datos	Afluente/efluente de aguas residuales (China), 2010-2011	1.68 – 4.64 ng L ⁻¹	[13]
OH-PBDEs	- Ajustar pH (3) LLE (Hexano-DCM, 1:1, v/v)	3-9 – 22 ng L ⁻¹	Efluentes de aguas residuales (China), 2014	0.109 µg L ⁻¹	[112]
PDBE congéneres	- Filtrado; SBSE-TD	No data	Afluente/efluente de aguas residuales (USA- borde de México), 2008-2009-2010	30.2 – 342 ng L ⁻¹	[135]
PBDEs, OH- y MeO-BDEs, 3 HBCDs y TBBPA	- Filtrado SPE (HLB)	0.002 – 0.3 ng L ⁻¹	Afluente/efluente de aguas residuales (Corea)	3-460 – 13145 ng L ⁻¹	[114]
PBDEs y PFAs	- Soxhlet	0.08 – 0.4 ng L ⁻¹	Efluentes de aguas residuales (Estación Casey, Antártida), 2011-2012	0.1 – 183;76 ng L ⁻¹	[137]
PBDEs y DP	- Filtrado; LLE (DCM)	LOQ: 0.02 ng L ⁻¹	Afluente/efluente de aguas residuales (China), 2010-2011	6.3 – 18.9 ng L ⁻¹	[138]
PBDEs y NBFRs	Filtrado; LLE (DCM)	0.007 – 0.023 ng L ⁻¹	Afluente/efluente de aguas residuales (China), 2012-2013	16.2 – 152 ng L ⁻¹	[139]
BDE-28, -47, -99, -100, -153, -154, -183, -209	- LLE (DCM) - Filtrado; SPE (C18)	1 – 27 ng L ⁻¹ 65 – 83 pg L ⁻¹	Afluente/efluente de aguas residuales (China), 2011-2012 Afluente/efluente de aguas residuales (China), 2011-2013	193;1 – 22000 ng L ⁻¹ 0.1 – 164 ng L ⁻¹	[140] [141]
HFRs	- Filtrado LLE (DCM)	291 – 1628 pg L ⁻¹	Afluente/efluente de aguas residuales (China), 2013	0.8 – 541 ng L ⁻¹	[142]
Estrógenos esteroides sintéticos, EDP, productos farmacéuticos: ácidos	- Filtrado; Ajustar pH (4 or 7); SPE	0.1 – 5 ng L ⁻¹	Arroyos urbanos (China), 2005-2006	2 – 33231 ng L ⁻¹	[50]
PPCPs Productos farmacéuticos: analgésicos, antidepresivos, antiinflamatorios, antibióticos, antiépilépticos, betabloqueantes PCP: agentes de protección solar, almidones sintéticos,	- SPE (HLB)	LOQs: 1 – 160 ng L ⁻¹	Afluente/efluente de aguas residuales (España)	12 – 26722 ng L ⁻¹	[143]

cafeína, nicotina y metabolitos: ácido clorhídrico, cotinina				
GC-ECD				
BDE-209	- ORMOSIL-SPME	0.2 – 3.0 pg mL ⁻¹	Aguas residuales (China), 2006-2007	1.1 – 27.4 pg mL ⁻¹ [135]
PBDES	- LLE (DCM); Clean-up: Columna de sílice multicapa modificada	Sin datos	Afluente/efluente de aguas residuales (Sur de África), 2010-2011	5150 – 15100 ng L ⁻¹ [144]
OMPs	- Filtrado; SPE (C18)	LOQs: 0.1 – 100 ng L ⁻¹	Afluente/efluente de aguas residuales (Suiza), 2011	1 – 40 ng L ⁻¹ [145]
GC-ToF-MS				
PCPs	- SPE (Strata X)	1 – 5 ng L ⁻¹	Afluente/efluente de aguas residuales (Noruega)	1.1 – 7301 ng L ⁻¹ [146]
PDBEs	- Filtrado; MEPS (C18)	0.5 – 9.5 ng L ⁻¹	Aguas residuales (República Checa)	Sin datos [147]
ECS	- LLE (DCM); pH (2 y 11)	Sin datos	Efluentes de aguas residuales (EEUU), 2014	0.0061 – 0.075 ppm [148]
GC-HRMS				
EOCs	- LLE; Clean-up (florisil) - LLE (DCM); Clean-up (florisil)	1 – 529 ng L ⁻¹ 3.2 – 44.2 ng L ⁻¹	BKME y Afluentes/efluentes domésticos (Canadá) Afluente/efluente de aguas residuales (Vancouver)	1 – 41207 ng L ⁻¹ [149] 1.3 – 9522.4 ng mL ⁻¹ [150]
EDCs	- SFE o CLLE con cloruro de metileno - Clean-up con alúmina en capas/columna Florisil si es necesario - Derivatización con BSTFA:TMS	0.1 - 2.0 ng L ⁻¹	Muestras acuosas sin partículas visibles Método 1698 EPA	[118]
Plaguicidas órgano-fosforados, triazina, y piretroides	- SFE o CLLE con cloruro de metileno a pH neutro - Clean-up con columna SPE de	1 - 182 pg L ⁻¹	Muestras acuosas que contienen <1% de sólidos Método 1699 EPA	[119]

	aminopropilo seguida de una columna de microsilíce o GPC								
	- Clean-up de plaguicidas organoclorados o con cromatografía de gel de sílice, Florisil o alumina								
	- LLE (Hexano)	Sin datos	Efluentes de aguas residuales (Australia), 2007	0.014 – 330 ng L ⁻¹	[151]				
	- SPE o SFE o CLLE con cloruro de metileno, retro-extracción con ácido y base	20 – 40 pg L ⁻¹	Muestras acuosas que contienen <1% de sólidos		[120]				
PBDES	- Clean-up: Cromatografía de exclusión molecular		Método 1614A EPA						

Abreviaturas: APEs, etoxilatos de alquifenol; APs, alquifenoles; BDEs, éteres de difenilo bromados; BFRs, retardantes de llama bromados; BPA, bisfenol A; BTBPE, 1,2-bis(2,4,6-tribromofenoxi)etano; DBDPE, decabromodifenil etano; DCM, diclorometano; DEET, N,N-dietyl-m-toluamida; DLLME, microextracción líquido-líquido dispersiva; DMP, dimetil ftalato; DP, declorane plus; EBTPi, etilen-bis(tetrabromo-ftalimida); ECD, detector de captura de electrones; ECs, compuestos estrogénicos; EDCs, disruptores endocrinos químicos; EDPs, plaguicidas disruptores estrogénicos; EOCs, contaminantes orgánicos estrogénicos; GC, cromatografía de gases; HBCDs, hexabromociclododecanos; HFRs, retardantes de llama halogenados; HRMS, espectrometría de masas de alta resolución; HS-SPME, microextracción en fase sólida con espacio de cabeza; LD, digestión líquida; LLE, extracción líquido-líquido; LOD, límite de detección; LOQ, límite de cuantificación; MeO-BDEs, metabolitos metilizados de éteres de difenilo bromados; MEPS, microextracción con adsorbentes empaquetados; MGK-264, N-octil-bicicloheptano-dicarboximida; MIP, polímero de impresión molecular; MS, espectrometría de masas; MTCS, metil triclosan; NBFRs, nuevos retardantes de llama bromados; OCPs, pesticidas organoclorados; OH-BDEs, éteres de difenilo bromados hidroxilados; OH-PBDEs, éteres de difenilo polibromados hidroxilados; OMPs, microcontaminantes orgánicos; OPS, contaminantes orgánicos; ORMOSIL-SPME, microextracción en fase sólida de silicato modificado orgánicamente con imprevista molecular; PAHs, hidrocarburos aromáticos policíclicos; PBBs, fenilos polibromados; PBDEs, éteres de difenilo polibromados; PBO, butóxido de piperonilo; PBs, parabenos; PCBs, bifenilos policlorados; PCNs, Naftalenos policlorados; PCPs, productos de cuidado personal; PEs, ésteres de ftalato; PES, polieter-sulfona; PFA, perfluoroalcoxi alcano; PPCPs, fármacos y productos de cuidado personal; SBSE, extracción adsorbente con barras de agitación; SPE, extracción en fase sólida; SPME, microextracción en fase sólida; TBBP-A, tetrabromobisfenol A; TBBPA-DBPE, tetrabromobisfenol A-bis(2,3-dibromopropil éter); TBECHE, 1,2-dibromo-4-(1,2 dibromoetil)ciclohexano; TCS, triclosan; TD, digestión térmica; ToF, tiempo de vuelo; UA, asistido por ultrasonidos; USAEME, microextracción por emulsificación asistida por ultrasonido.

Tabla II.3. Determinación de contaminantes emergentes en aguas naturales por cromatografía de líquidos.

Compuestos	Tratamiento de muestra	Rango LOD	Origen de muestra	Rango detectado	Ref.	
LC-MS/MS						
PCPs	- SPE (HLB)	7 – 46 ng L ⁻¹	Agua de mar y río (España), 2007	27 – 849 ng L ⁻¹	[152]	
	- Ajustar pH (3); SBSE-LD	2-5 ng L ⁻¹	Agua de río (España)	6 – 28 ng L ⁻¹	[153]	
	- Filtrado; Ajustar pH (6); SBSE-LD	8 – 120 ng L ⁻¹	Agua de mar (Italia), 2010	25 – 101 ng L ⁻¹	[154]	
	- Filtrado on-line SPE	0.5 – 3.5 ng L ⁻¹	Agua de río y subterránea (España), 2011	4.36 – 862 ng L ⁻¹	[155]	
	- Filtrado (celulosa regenerada); In-line-SPE	LOQs: 1.8 – 3.9 ng L ⁻¹	Agua de río y de piscina (República Checa), 2011	3.4 – 500 ng L ⁻¹	[156]	
	- Filtrado; SPE (C18)	0.11 – 63.87 ng L ⁻¹	Agua de océano (Ártico), 2012-2013	2 – 66 ng L ⁻¹	[157]	
	- Filtrado; On-line SPE (PLRP-5)	Sin datos	Agua subterránea (España), 2010	0.38 – 7.9 ng L ⁻¹	[158]	
	- Ajustar pH (2); SPE (HLB)	LOQs: 0.2 – 4 ng L ⁻¹	Agua de río (España), 2008	20 – 416 ng L ⁻¹	[159]	
	Conservantes (MPB; EPB; BPB; PPB); agentes antimicrobianos (TCC y TCS) y Filtros UV	- Ajustar pH (3); Filtrado; SPE (Bond Elut Plexa)	1 – 5 ng L ⁻¹	Agua de río (España)	7 ng L ⁻¹	[160]
	PFCS	- Filtrado; SPE (WAX)	0.11 – 4.5 ng L ⁻¹	Agua de río (Alemania), 2007	7.6 – 26.4 ng L ⁻¹	[161]
- Filtrado		0.3 – 30 ng L ⁻¹	Agua de río (España), 2007	5.6 – 48 ng L ⁻¹	[162]	
- Ajustar pH (7); SPE (HLB)		Sin datos	Subcuencas (EEUU), 2011-2012	1.1 – 49 ng L ⁻¹	[163]	
- Filtrado SPE (HLB)		Sin datos	Agua de grifo y de río (Chile), 2013	Sin datos	[164]	
OPs	EOPs: drogas ilícitas, AINES, antibióticos, reguladores de lípidos en sangre, fármacos antiepilépticos, filtros UV, atenolol y omeprazol	- SPE (HLB)	Agua dulce superficial y marina (Singapur)	Sin datos	[165]	
		- Filtrado; SPE (HLB)	Aguas de costa (Taiwán), 2010	1.47 – 156 ng L ⁻¹	[166]	
	Sucralosa, TCP y TDCPP	- SPE	Agua de río (EEUU), 2013	5.4 – 29000 ng L ⁻¹	[117]	
	PBs, TCS, TCC	- Filtrado; SPE (HLB)	Río y arroyo (España), 2008	1 – 25.5 ng L ⁻¹	[167]	
EDCs	Homonas, plastificantes, herbicidas, TCS y cafeína	- SPE (HLB)	Agua potable (Brasil), 2011-2012	6.5 – 3540 ng L ⁻¹	[168]	
		- Filtrado; On-line EQuan™; On-line TurboFlow™	Agua de río (España), 2010-2011	0.8 – 649 ng L ⁻¹	[169]	

	- UA-DLLME-SFO	10 – 1126 ng L ⁻¹	Agua de río (España), 2015	<LOQ	[170]
	- DLLME	LOQs: 9 – 91 ng L ⁻¹	Agua de río (España), 2011	37 ng L ⁻¹	[171]
	- SBSE	3.6 – 45 ng L ⁻¹	Agua de río (España), 2017	35-153 ng L ⁻¹	[172]
	- Filtrado; High-flow SPE (C18)		Agua de río (Taiwán), 2004	15 – 45 ng L ⁻¹	[173]
	- Filtrado; Ajustar pH (3); SPE (C18)	0.78 – 7.65 ng L ⁻¹ 0.01 – 3.64 ng L ⁻¹	Presa urbana, lago, fuente y agua subterránea (Francia), 2007	0.3 – 11 ng L ⁻¹	[174]
Esteroides estrogénicos, estrógenos, esteroides androgénicos	- Ajustar pH (2); Ajustar pH (7); Filtrado; SPE (HLB)	2 – 30 ng L ⁻¹ 1.2– 28 ng L ⁻¹	Agua de río (España)	No encontrado	[175]
	- Be allowed to settle	LOQs: 0.4 – 1 ng L ⁻¹	Río y agua de vivienda (Noroeste pacífico), 2010	Sin datos	[176]
	- Filtrado; SPE (HLB)	<1 ng L ⁻¹	Agua de río (France)	Sin datos	[177]
	- Filtrado; SPE (HLB) Clean-up (florisil)	0.29 – 0.47 µM Nivel ng L ⁻¹	Agua de río (France), 2007 Agua de río (Alemania)	0.055 µM 0.063 – 0.083 µM	[178] [179]
	- Filtrado; SPE (Strata XL)				
Fármacos, hormonas, antibióticos, PCPs	- Filtrado; SPE (HLB)	1 – 10 ng L ⁻¹	Lagos y ríos (Corea del sur)	1.6 – 134 ng L ⁻¹	[180]
	- Filtrado; SPE (HLB)	0.07 – 51 ng L ⁻¹	Agua de río (Inglaterra)	1.8 – 2318 ng L ⁻¹	[181]
	- SBSE	3.1 – 30 ng L ⁻¹	Agua de río (España), 2017	No encontrado	[172]
	- Filtrado; Sorptive microextracción (PES)-LD	37 – 121 ng L ⁻¹	Agua de estuario (España), 2013	99 – 388 ng L ⁻¹	[99]
BPA, APs y hormones	- On-Line pre-concentración (EQvan technology)	0.01– 748 ng L ⁻¹	Agua de río (España), 2012	2 – 5928 ng L ⁻¹	[182]
	- SPE (HLB)	6.29 – 7.24 ng L ⁻¹	Sistema de suministro de agua (Portugal), 2012	<LOQ	[183]
PBDEs	- Filtrado; SPE (equilibrio hidrófilo-lipófilo); Purificación con cartucho de sílice	0.04 – 3.5 pg L ⁻¹ 10 – 1126 ng L ⁻¹	Agua de río (China), 2011 Agua de río (España), 2015	0.5 – 4.0 pg L ⁻¹ No encontrado	[184] [170]
	- UA-DLLME-SFO	44 ng L ⁻¹	Agua de río (España), 2017	No encontrado	[172]
	- SBSE				
OH-BDEs, TCS	- SPE (HLB); Clean-up: Columna de sílice	0.002 – 0.05 ng L ⁻¹	Aguas costeras y agua dulce (EEUU), 2011-2013	0.04 – 68 ng L ⁻¹	[185]
Fármacos	- Ajustar pH (2 y 10); SPE (HLB)	0.1 - 170 ng L ⁻¹	Muestras acuosas sin partículas visibles, filtradas de muestras con partículas visibles. Método 1694 EPA		[186]
PCPs	- Ajustar pH (2); Filtrado; SPE (XL4)	LOQs: 0.3 – 48 ng L ⁻¹	Agua de río (Gales)	1 – 5970 ng L ⁻¹	[54]

conservantes, desinfectante/antisépticos	- Ajustar pH (2); Filtrado; SPE (MCX)	0.05 – 20 ng L ⁻¹	Agua de río (Gales), 2006-2007	1 – 968 ng L ⁻¹	[187]
	- SPE (HLB)	0.03 – 14.8 ng L ⁻¹	Agua de grifo y de lago (EEUU), 2012-2013	0.10 – 174 ng L ⁻¹	[46]
Fármacos, residuos farmacéuticos	- Filtrado; Ajustar pH (2-3); SPE (HLB)	0.015 – 2.5 ng L ⁻¹	Aguas superficiales urbanas (Singapur), 2012- 2014	0.1 – 1800 ng L ⁻¹	[188]
	- POCIS	Sin datos	Aguas superficiales (EEUU), 2011-2013	0.01 – 85.39 ng L ⁻¹	[189]
	- SPE (HLB)	LOQs: 1.78 – 8.24 ng L ⁻¹	Agua de río (China), 2013	3.4 – 4200 ng L ⁻¹	[190]
	- Filtrado; Ajustar pH (2); SPE (HLB)	0.1 – 9.9 ng L ⁻¹	Agua de río, aluvial, pozo, lago y embalse (EEUU)	1.1 – 224 ng L ⁻¹	[191]
	- Filtrado; SPE (HLB)	0.3 – 2 ng L ⁻¹	Agua de río (Luxemburgo)	1 – 2383 ng L ⁻¹	[192]
	- SPE (HLB)	0.02 – 50 µg L ⁻¹	Agua de río, lago y potable (EEUU)	5 – 1200 ng L ⁻¹	[193]
Fármacos, residuos farmacéuticos	- Filtrado; Ajustar pH (6); SPE (Strata-X)	0.1 – 4.8 ng L ⁻¹	Agua de río (Escocia) 2005-2006	1 – 13 ng L ⁻¹	[194]
	- Filtrado; On-line SPE	LOQs: 1 – 23 ng L ⁻¹	Agua de río (República Checa), 2013	2 – 270 ng L ⁻¹	[195]
	- Filtrado; Ajustar pH (<2); SPE (HLB)	0.3 – 10.0 ng L ⁻¹	Aguas de costa (España), 2013	1 – 117 ng L ⁻¹	[196]
	- Ajustar pH (2); SPE (HLB)	0.02 – 98 ng L ⁻¹	Agua de río (España), 2014	2.9 – 3000 ng L ⁻¹	[197]
	LC-MS				
EDCs	Hormonas esteroides, PPCPs, drogas ilícitas y sus metabolitos, esteroides, herbicidas y sus metabolitos, subproducto plástico y conservante	- Filtrado; SPE (Strata-XC)	Agua de río (Canadá), 2014	Sin datos	[198]
PPCPs	Fármacos	- Ajustar pH (7); Filtrado; SPE (HR-X) SPE (XAD-2) SPE (HLB)	LOQs: 1 – 50 ng L ⁻¹ 1 – 13 ng L ⁻¹ 1.16 – 29.1 ng L ⁻¹	Agua de mar (Bélgica), 2007-2009 Agua de mar (Suecia) Agua de río (Sur de África)	[199] [200] [201]
	LC-DAD				
	PBDEs	BDE-209	- DLLME (Tetracloroetano)	Agua de grifo, lago y río (China)	< 0.2 ng mL ⁻¹
PPCPs	Residuos farmacéuticos	- Filtrado; SPME-MD	Agua de mar y subterránea (España)	Sin datos	[202]
LC-UV					
PCPs	Filtros UV	- Filtrado; Ajustar pH (2.6);	Agua de río, lago y piscina (China)	0.7 – 18.8 ng mL ⁻¹	[203]

	IL-DLLME - SBSDME	1.6 – 2.9 ng mL ⁻¹	Agua de mar, río, lago y piscina (España)	Sin datos	[204]
EDCs	BPA, 4-cumylphenol, 4-terbutylphenol, 4-octylphenol y 4NNP	4 – 39 ng mL ⁻¹ 0.2 – 1.6 ng mL ⁻¹	Agua de mar (España)	<LOQ	[205]
LC-HRMS					
	- Filtrado; Ajustar pH (7); SPE (HLB)	Sin datos	Agua de río y subterránea (Kenia), 2012	7 – 167100 ng L ⁻¹	[206]
PPCPs	Fármacos	Sin datos	Agua de río (África), 2010	10 – 30 µg L ⁻¹	[207]
	- Filtrado; Ajustar pH (2.5); Ajustar pH (7); SPE (HLB)	Sin datos			
LC-QToF-MS					
	- SPE (HLB)	5 – 500 ng L ⁻¹	Agua potable, superficial y subterránea (EEUU)	10 – 455 ng L ⁻¹	[208]
PPCPs	Fármacos	LOQs: 1–125 ng L ⁻¹	Agua de grifo y de río (España), 2007	2 – 18 µg L ⁻¹	[209]
	- Filtrado	0.03 – 8.57 ng L ⁻¹	Agua de río (Macedonia), 2015	0.49 – 448 ng L ⁻¹	[210]
LC-LC-APPI-MS/MS					
	- Filtrado; Ajustar pH (2.4); On-Line SPE	2 – 50 ng L ⁻¹	Aguas de lagos (Canadá), 2007	3 – 9 ng L ⁻¹	[211]
EDCs	Hormonas naturales y compuestos sintéticos relacionados				
	- Filtrado; On-line LC antimicrobianos, PBs, BPA, APs, benzotriazoles, y OPFRs	0.004 – 62 ng L ⁻¹	Agua de río (España), 2010	0.3 – 419 ng L ⁻¹	[212]
	- SPE (OASIS); LLE (n-hexano)	0.1 – 12 ng L ⁻¹	Agua de grifo y de río (Italia)	Sin datos	[213]
PBDES	TBBP-A, PBDEs				
	- Filtrado; Ajustar pH (2.4); On-Line SPE	2 – 50 ng L ⁻¹	Agua de río (Canadá), 2007	4 – 112 ng L ⁻¹	[214]
PPCPs	Fármacos, cafeína				
LC-FLD					
	- Filtrado; SPE (C18)	4 – 56 µg L ⁻¹	Agua de mar (Brasil)	4.9 – 134 ng L ⁻¹	[215]
EDCs	BPA, 4NNP, 4NOP, 4TOP, E3, E1, E2 y EE2				

Abreviaturas: 4NNP, 4-n-nonilfenol; 4NOP, 4-octilfenol; 4TOP, 4-t-octilfenol; APPI, fotoionización a presión atmosférica; APs, alquilfenoles; BDEs, éteres de difenilo bromados; BPA,

bisfenol A; BPB, butil parabeno; DAD, detección por díodos array; DLLME, microextracción líquido-líquido dispersiva; E1, estrona; E2, estradiol; E3, estriol; EDCs, disruptores endocrinos químicos; EE2, 17 α -etil estradiol; EOPs, contaminantes orgánicos emergentes; EPB, etil parabeno; FLD, detector de fluorescencia; HRMS, espectrometría de masas de alta resolución; LC, cromatografía de líquidos; LD, digestión líquida; LLE, extracción líquido-líquido; LOD, límite de detección; LOQ, límite de cuantificación; MPB, metil parabeno; MS, espectrometría de masas; NSAIDs, drogas anti-inflamatorias no esteroideas; OH-BDEs, éteres de difenilo bromados hidroxilados; OH-PBDEs, éteres de difenilo polibromados hidroxilados; OMPs, microcontaminantes orgánicos; OPFRs, retardantes de llama organofosforados; OPs, contaminantes orgánicos; PBDEs, éteres de difenilo polibromados; PBs, parabenos; PCPs, productos de cuidado personal; PES, polietersulfona; PFCs, perfluorocarbonos; PLRPs, columnas poliméricas de fase inversa; POCIS, muestreador integrador químico orgánico polar; PPCPs, fármacos y productos de cuidado personal; PrPB, propil parabeno; QToF, cuadrupolo con analizador de tiempo de vuelo; SBSE, extracción adsorbente con barras de agitación; SPE, extracción en fase sólida; TBBP-A, tetrabromobisfenol A; TCC, triclocarban; TCPP, tris(2-clorisopropil)fosfato; TCS, triclosan; TD, digestión térmica; TDCPP, tris(1,3-dicloro-2-propil)fosfato; UV, ultravioleta.

Tabla II.4. Determinación de contaminantes emergentes en aguas residuales por cromatografía de líquidos.

Compuestos	Tratamiento de muestra	Rango LOD	Origen de muestra	Rango detectado	Ref.
LC-MS/MS					
Filtros UV	<ul style="list-style-type: none"> - SPE (HLB) - Ajustar pH (3); SBSE-LD - Filtrado on-line SPE - Filtrado; SPE (C18) - Filtrado; Ajustar pH (2); SPE (HLB) 	7 – 46 ng L ⁻¹ 5 – 10 ng L ⁻¹ 1 – 10 ng L ⁻¹ 0.11 – 63.87 ng L ⁻¹ LOQs: 0.2 – 4 ng L ⁻¹	Afluyente/Efluente de aguas residuales (España), 2007 Afluyente/Efluente de aguas residuales (España) Afluyente/Efluente de aguas residuales (España), 2011 Afluyente/Efluente de aguas residuales (Japón, China, EEUU), 2012-13 Afluyente/Efluente de aguas residuales (España), 2008	20 – 1481 ng L ⁻¹ 35 – 220 ng L ⁻¹ 7.71 – 1200 ng L ⁻¹ 10 – 1650.4 ng L ⁻¹ 11 – 1596 ng L ⁻¹	[152] [154] [155] [157] [159]
PCPs					
Conservantes (MPB; EPB; BPB; PPB); agentes antimicrobianos (TCC y TCS) y Filtros UV	<ul style="list-style-type: none"> - Ajustar pH (3); Filtrado; SPE (HLB) 	20 – 200 ng L ⁻¹	Afluyente/Efluente de aguas residuales (España)	11 – 1945 ng L ⁻¹	[160]
PFCS	<ul style="list-style-type: none"> - Filtrado; SPE (WAX) 	0.11 – 4.5 ng L ⁻¹	Efluente de aguas residuales (Alemania), 2007	30.5 – 266.3 ng L ⁻¹	[161]
OPs	<ul style="list-style-type: none"> - Filtrado; Ajustar pH (7); SPE (HLB) - Filtrado; SPE (HLB) - SPE (HLB); LLE (n-heptano, pentano, DCM); pH (3) - Ajustar pH (<3); SPE 	0.3 – 30 ng L ⁻¹ Sin datos LOQs: 1 – 160 ng L ⁻¹ 4 × 10 ⁻⁶ – 4.1 µg L ⁻¹	Afluyente/Efluente de aguas residuales (España), 2007 Afluyente/Efluente de aguas residuales (Chile), 2013 Afluyente/Efluente de aguas residuales (España) Afluyente/Efluente de aguas residuales (Austria)	19 – 10449 ng L ⁻¹ Sin datos 12 – 26722 ng L ⁻¹ 1.1 × 10 ⁻⁶ – 2169 µg L ⁻¹	[162] [164] [127]
TOrCs	<ul style="list-style-type: none"> - SPE (HLB) 	0.1 – 1 ng mL ⁻¹	Efluente de aguas residuales (Arabia Saudí)	6 – 16500 ng mL ⁻¹	[216]
PBs, TCS, TCC	<ul style="list-style-type: none"> - Filtrado; SPE (HLB) - SBSE-LD 	LOQs: 0.02 – 50 ng L ⁻¹ LOQs: 0.008 – 20 ng L ⁻¹ LOQs: 10 ng L ⁻¹	Afluyente/Efluente de aguas residuales (España), 2008 Efluente de aguas residuales (EEUU), 2009	1.5 – 5138 ng L ⁻¹ 1.5 – 1302 ng L ⁻¹ 48 – 330 ng L ⁻¹	[167] [217]
EDCs	<ul style="list-style-type: none"> - Filtrado; SPE (C18) - Filtrado; SPE disk (C18); 	Sin datos 1.4 – 28.8 ng L ⁻¹	Afluyente/Efluente de aguas residuales (España), 2007	0.01 – 280 µg L ⁻¹ ≈ 1 – 600 ng L ⁻¹	[128]

	Ajustar pH (3)	0.05 – 0.15 ng	Aguas residuales (Taiwán), 2009 Efluente de aguas residuales (Canadá)	0.05 – 5.86 ng	[218]
Esteroides estrogénicos, estrógenos, esteroides androgénicos	- Filtrado; High-flow SPE (C18)	0.78 – 7.65 ng L ⁻¹	Efluente de aguas residuales (Taiwán), 2004 Afluente/Efluente de aguas residuales (España)	19 – 26 ng L ⁻¹	[173]
	- Ajustar pH (2); Ajustar pH (7); Filtrado; SPE (HLB)	10 – 100 ng L ⁻¹	Afluente/Efluente de aguas residuales (Noroeste pacífico) 2010	35 – 160 ng L ⁻¹	[174]
	- Centrifugación	4.8 – 360 ng L ⁻¹	Afluente/Efluente de aguas residuales (Francia)	Sin datos	[176]
	- Filtrado; SPE (HLB)	LOQs: 0.4 – 3 ng L ⁻¹	Afluente/Efluente de aguas residuales (Francia), 2007	0.1 – 60 ng L ⁻¹	[177]
	- Filtrado; SPE (HLB); florisil	0.1 – 2.4 ng L ⁻¹	Afluente/Efluente de aguas residuales (Francia), 2007	Sin datos	[178]
	- Filtrado; SPE (Strata-XL)	0.29 – 0.47 µM Nivel ng L ⁻¹	Afluente/Efluente de aguas residuales (Alemania)	0.055 µM 0.063 – 0.083 µM	[179]
	- SPE (SDB-XC disk)	0.13–1.3 ng L ⁻¹ (libre) 0.11–1.0 ng L ⁻¹ (conjugado) 0.18–18 ng L ⁻¹ (halogenado)	Efluente de aguas residuales (EEUU), 2012	0.02 – 49 ng L ⁻¹	[219]
	- Filtrado; Ajustar pH (3-4)	0.02 – 29.1 ng L ⁻¹	Efluente de aguas residuales (EEUU), 2011-2012	0.18 – 465 ng L ⁻¹	[220]
	- Filtrado; SPE (HLB)	1 – 10 ng L ⁻¹	Efluente de aguas residuales (Corea del sur)	1.1 – 2630 ng L ⁻¹	[180]
	- Filtrado; SPE (HLB)	0.08 – 945 ng L ⁻¹	Afluente/Efluente de aguas residuales (Inglaterra)	2 – 44204 ng L ⁻¹	[181]
Fármacos, hormonas, antibióticos, PCPs	- Filtrado; Ajustar pH (3); SPE (HLB y C18)	LOQs: 0.02 – 85 ng L ⁻¹	Afluente/Efluente de aguas residuales (Francia), 2007-2008	0.1 – 57 ng L ⁻¹	[221]
	- Filtrado; Sorptive microextracción (PES)-LD	29 – 221 ng L ⁻¹	Efluente de aguas residuales (España), 2013	81 – 92 ng L ⁻¹	[99]
BPA, APs y hormonas	- Filtrado; SPE (equilibrio hidrófilo-lipófilo); Purificación con cartucho de sílice	0.04 – 3.5 pg L ⁻¹	Efluente de aguas residuales (China), 2011	0.62 – 1.3 pg L ⁻¹	[184]
OH-PBDES	- Ajustar pH (<3); Filtrado; SPE Clean-up: multi-etapa sílice	LOQs: 0.1 – 5.6 pg mL ⁻¹	Aguas residuales (Canadá)	≈1 – 50 pg mL ⁻¹	[222]
HFRs					
PBDES					

		y alúmina		
	OPFRs y plastificantes	- LLE (DCM)	0.1 – 5 ng L ⁻¹	Afluyente/Efluente de aguas residuales (Canadá), 2014 [223]
	Fármacos, drogas ilícitas, PCPs: protectores solares, conservantes, desinfectante/antisépticos	- Ajustar pH (2); Filtrado; SPE - SPE (HLB) - Filtrado - Filtrado; SPE (HLB)	LOQs: 2 – 104 ng L ⁻¹ 0.03 – 14.8 ng L ⁻¹ Sin datos 1.7 – 161.1 ng L ⁻¹	Afluyente/Efluente de aguas residuales (Gales) [54] Efluente séptico (EEUU), 2012-2013 [46] Hospital, Afluyente/Efluente de aguas residuales (EEUU) [53] Afluyente/Efluente de aguas residuales (Grecia) [224]
	Fármacos, residuos farmacéuticos	- Filtrado; SPE (HLB) - SPE (HLB) - Filtrado; Ajustar pH (6); SPE (Strata X) - Filtrado; On-line SPE - Filtrado; Ajustar pH (3); SPE - Filtrado; SPE (HLB)	0.3 – 2 ng L ⁻¹ 0.02 – 50 µg L ⁻¹ 0.1 – 10.9 ng L ⁻¹ LOQs: 1– 23 ng L ⁻¹ 1 – 10 ng L ⁻¹ < 2 ng L ⁻¹	Afluyente/Efluente de aguas residuales (Luxemburgo) [192] Aguas residuales (EEUU) [193] Efluente de aguas residuales (Escocia), 2005-2006 [194] Efluente de aguas residuales (República Checa), 2013 [195] Efluentes hospitalarios de aguas residuales (Noruega), 2007 [225] Aguas residuales de hospitales (Australia), 2008 [226]
	Hormonas esteroides; PCPs, drogas ilícitas y metabolitos, esteroides, herbicidas y metabolitos, plásticos y conservante	- Filtrado; SPE (Strata XC)	0.96 – 2.4 ng L ⁻¹	Efluente de aguas residuales (Canadá), 2014 [198]
	Fármacos	- SPE (HLB)	1.16 – 29.1 ng L ⁻¹	Aguas residuales (Sur de África) [201]
	TCS	- Ajustar pH (7); SBSE-LD	0.1 µg L ⁻¹	Afluyente/Efluente de aguas residuales (Portugal), 2007 [227]
	Residuos farmacéuticos	- Filtrado SPME-MD	0.05 – 12 ng L ⁻¹	Aguas residuales (España) [202]

PPCPs	Fármacos	- Filtrado; Ajustar pH (7); SPE (HLB)	Sin datos	Afluente/Efluente de aguas residuales (Kenia), 2012	4 – 60680 ng L ⁻¹	[206]
LC-LC-APPI-MS/MS						
	Hormonas naturales y compuestos sintéticos relacionados	- Filtrado; Ajustar pH (2-4); On-Line SPE	2 – 50 ng L ⁻¹	Efluente de aguas residuales (Canadá), 2007	30 – 90 ng L ⁻¹	[211]
EDCs	Estrógenos naturales/sintéticos y conjugados, PBs, BPA, APs, benzotriazoles, y OPFRs, antimicrobianos	- Filtrado; On-line LC preconcentración	0.08 – 125 ng L ⁻¹	Afluente/Efluente de aguas residuales (España), 2010	0.8 – 82559 ng L ⁻¹	[212]
PBDES	TBBP-A, PBDES	- SPE (OASIS); LLE (n-hexano)	0.2 – 12 ng L ⁻¹	Industrial aguas residuales (Italia)	Sin datos	[213]
	BFRs	- Filtrado; SPE disk (ENVI-18); Ajustar pH (3) - LLE (DCM)	LOQs: 0.04 – 1.6 ng L ⁻¹ Sin datos	Afluente/Efluente de aguas residuales (Noruega), 2009 Afluente/Efluente de aguas residuales (Vancouver), 2011-2012	0.1 – 440 ng L ⁻¹ 4.7 – 1910 ng L ⁻¹	[136] [228]
PPCPs	Fármacos, cafeína	- Filtrado; Ajustar pH (2-4); On-Line SPE	2 – 50 ng L ⁻¹	Efluente de aguas residuales y aguas negras (Canadá), 2007	6 – 32894 ng L ⁻¹	[214]

Abreviaturas: APPI, fotoionización a presión atmosférica; APs, alquilfenoles; BDEs, éteres de difenilo bromados; BFRs, retardantes de llama bromados; BPA, bisfenol A; BPB, butil parabeno; CTDs, derivados clorados de triclosán; DAD, detección por díodos array; DCM, diclorometano; EDCs, disruptores endocrinos químicos; EPB, etil parabeno; HFR, retardantes de llama halogenados; HRMS, espectrometría de masas de alta resolución; LC, cromatografía de líquidos; LD, digestión líquida; LLE, extracción líquido-líquido; LOD, límite de detección; LOQ, límite de cuantificación; MPB, metil parabeno; MS, espectrometría de masas; NP, nonilfenol; NPEO1, monoetoxilato de nonilfenol; NPEO2, dietoxilato de nonilfenol; OH-BDEs, éteres de difenilo bromados hidroxilados; OH-PBDEs, éteres de difenilo polibromados hidroxilados; OPs, contaminantes orgánicos; OPFRs, retardantes de llama organofosforados; PBDES, éteres de difenilo polibromados; PBs, parabenos; PCPs, productos de cuidado personal; PES, polietersulfona; PFCs, perfluorocarbonos; PPB, propil parabeno; PPCPs, fármacos y productos de cuidado personal; SBSE, extracción adsorbente con barras de agitación; SPE, extracción en fase sólida; TBBP-A, tetrabromobisfenol A; TCC, triclocarban; TCS, triclosán; TOCs, trazas de productos químicos orgánicos.

2.3.1. Preparación de muestra

Toma de muestra

Antes de la recolección de la muestra, deben elegirse cuidadosamente los lugares de muestreo para obtener la mayor representatividad posible. La recolección de muestras de aguas residuales debe ocurrir en sitios sujetos a cambios importantes en la composición del agua, localizaciones aguas abajo y aguas arriba de áreas urbanizadas, plantas industriales y plantas de tratamiento de aguas residuales. De acuerdo con las directrices para la calidad del agua potable de la OMS, las muestras de agua natural deben tomarse en la sección media de los ríos, a una profundidad de 20-50 cm [65].

Las muestras de agua natural y residual se almacenan normalmente en botellas de vidrio ámbar de diferentes volúmenes para evitar la degradación biológica y la fotodegradación continua de los compuestos de interés. El volumen de la muestra recolectada puede oscilar entre 50 mL y más de 20 L, dependiendo de la sensibilidad del método y el rango de detección de la técnica utilizada en el análisis posterior. Por lo general, los volúmenes de muestreo óptimos para LC-MS/MS y GC-MS/MS oscilan entre 0.250 L y 1 L.

Previamente a la recogida de muestra, las botellas de vidrio se lavan y se enjuagan con agua ultrapura y un disolvente orgánico, a menudo metanol [134, 150, 157, 174] y/o acetona [74, 80, 81, 152, 162]. Después de la limpieza, cada botella de vidrio se enjuaga con agua de muestreo antes de la recolección. Después del muestreo, las botellas de vidrio se almacenan a 4 °C hasta la extracción de los compuestos, normalmente dentro de las siguientes 48 h. En algunos casos, la recolección de la muestra se realizó al mismo tiempo que la extracción de la muestra, utilizando un dispositivo de "muestreador pasivo" como POCIS (Muestreador Integrativo Químico Orgánico Polar). Cuando la extracción no se realiza simultáneamente en el punto de ubicación, las botellas normalmente se transportan al laboratorio para su posterior extracción.

Para estabilizar los analitos, algunos autores optimizaron la acidificación de las muestras en el análisis de metales, para alcanzar un pH de

aproximadamente 2 mediante la adición de ácido fórmico al 1% (v/v) [212, 218], ácido sulfúrico diluido [180, 192, 220] o ácido clorhídrico diluido [54, 89, 130, 153, 159, 160, 175, 184]. También se han añadido omadina de sodio (agente antimicrobiano) y ácido ascórbico (agente antioxidante) [216]. La acidificación de las muestras de agua permite preservar la mayoría de los metales traza contenidos en la muestra al tiempo que minimiza la precipitación, la actividad microbiana y las pérdidas por adsorción en las paredes del recipiente. Para las muestras de aguas residuales, la acidificación siempre debe realizarse en muestras filtradas, siendo la membrana de celulosa o los filtros de celulosa la opción preferida (ver **Tablas II.1-4**).

Para muestras de agua de grifo, piscinas o áreas de aguas recreativas, el exceso de cloro a menudo se elimina con tiosulfato de sodio [66, 68, 162, 213]. Además, algunos autores recomiendan la adición de ciertas sustancias para preservar la muestra hasta su posterior extracción, entre ellas se ha propuesto el formaldehído (1%, v/v), metanol (0.5%, v/v) [122], ácido sulfúrico diluido [180], ácido fórmico diluido [218] o azida sódica (0.5 g L⁻¹) [50], ya que previenen la actividad bacteriana y conservan las muestras para la siguiente extracción.

Tratamiento de muestra

La complejidad de las muestras ambientales generalmente requiere técnicas de extracción para purificar y aislar los analitos objetivo de la matriz. Además, dado que se ha descubierto que los EDCs, PPCPs y PBDEs tienen impactos acuáticos a concentraciones traza en muestras de agua, es necesario un paso de extracción antes de su detección para concentrar los compuestos a niveles detectables para los instrumentos analíticos. A continuación, se comentan brevemente las técnicas más utilizadas.

Para el análisis de EDCs y PBDEs, existen algunos métodos de la EPA estandarizados para el análisis de esteroides y hormonas [118], así como de plaguicidas [119] y todos los congéneres de BDE [120] con GC-HRMS. En estos métodos, se prefiere una extracción en embudo de decantación (SFE) o una extracción líquido/líquido continua (CLLE), seguida de una limpieza con alúmina estratificada, columna Florisil o columna SPE, dependiendo de los compuestos

de interés. Los LOD y LOQ con estos métodos pueden variar y generalmente dependen del nivel de interferencias. Para los PPCPs también existe un método EPA estandarizado [186]. Está enfocado a la determinación de productos farmacéuticos por HPLC-MS/MS. El tratamiento de la muestra implica la filtración en el caso de muestras acuosas con partículas visibles, ajustando el pH a 2 y 10, y extracción por SPE con un cartucho HLB.

Extracción líquido-líquido (LLE). Esta técnica se ha utilizado clásicamente. Sin embargo, es un procedimiento laborioso, costoso y que requiere mucho tiempo, seguido a menudo de pasos de limpieza y concentración previa. También requiere grandes volúmenes de disolventes orgánicos y es difícil de automatizar. Los PBDEs y los EDCs se han analizado utilizando esta metodología [110, 150].

Los PBDEs son los compuestos más comunes extraídos por LLE, ya que son apolares y volátiles. No obstante, su carácter hidrófobo y su baja concentración en las muestras de agua exigen grandes volúmenes de muestra (se necesita hasta 1 L para el enriquecimiento). Además, el extracto orgánico final debe evaporarse para disminuir el LOD del método y mejorar la sensibilidad. En las muestras de aguas residuales, la formación de emulsión también podría interferir en el proceso de extracción. En cuanto a las muestras de agua natural, los disolventes más utilizados para la extracción de PBDE con LLE son el *n*-hexano (HEX) [74, 205], el diclorometano (DCM) [110, 114] y las mezclas de HEX-DCM (1:1, v/v) [39, 112]. Las muestras de aguas residuales se han tratado con disolventes comparables, como DCM [13, 138-140, 142, 144, 148-150, 223, 228]; Mezclas de HEX-DCM (1:1, v/v) [112]; *n*-heptano, pentano y DCM [127]; DCM y HEX [148] y HEX [151].

Se han analizado retardantes de llama halogenados (HFRs) en muestras de agua residual, con LODs en el rango de 291-1628 pg L⁻¹, empleando DCM como disolvente de extracción y GC-MS [142]. Para varios congéneres de PBDE (desde tri- hasta deca-BDE, incluidos BDE-28, BDE-47, BDE-99, BDE-100, BDE-153, BDE-154, BDE-183 y BDE-209) se obtuvieron LOD incluso más bajos utilizando HEX como disolvente de extracción (2 extracciones) y GC-MS [141]. Además, los

análisis de PBDE en agua natural que utilizaron LLE como método de extracción y GC-MS, lograron LODs en el rango de 0.008-1.2 ng L⁻¹ [110], 0.007-0.023 ng L⁻¹ [139], 1-27 ng L⁻¹ [140], 0.1-5 ng L⁻¹ [223] con DCM como extractante. Usando hexano-DCM (1:1, v/v), los LOD variaron entre 0.0039-0.0220 µg L⁻¹ [112], y los LOQs variaron entre 0.007-0.067 ng L⁻¹ en muestras de aguas naturales y residuales [39].

El uso de LLE para el análisis de otros contaminantes, como compuestos estrogénicos o xenobióticos, no es muy común. No obstante, se han desarrollado algunos procedimientos analíticos en muestras de aguas residuales, obteniendo LODs en el rango 1-529 ng L⁻¹ y 3.2-44.2 ng L⁻¹ [149, 150].

Los compuestos estrogénicos se extrajeron con DCM [149, 150], seguido de una etapa de limpieza con florisil desactivado y derivatización con piridina anhidra y *bis*-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) con el 10% de trimetilclorosilano (TMCS). Estos análisis se realizaron mediante GC-HRMS. Se utilizaron varios disolventes para la extracción de xenobióticos dependiendo del analito. Los compuestos aromáticos clorados se extrajeron utilizando pentano como disolvente de extracción y análisis GC-MS [126]. Por otro lado, herbicidas como atrazina, diurón o simazina fueron extraídos con DCM y analizados por LC-MS/MS [164].

Extracción en fase sólida (SPE). Aunque SPE puede considerarse una técnica clásica, es la técnica más empleada para la extracción de trazas de contaminantes de fuentes de agua. Permite el análisis de residuos múltiples y se puede utilizar off-line u on-line, o acoplado al análisis cromatográfico. SPE se ha utilizado ampliamente para el análisis de EDCs, PBDEs y PPCPs, ya que es muy adecuado para compuestos con una amplia gama de polaridades y propiedades fisicoquímicas. Se han determinado HAPs, filtros UV, pesticidas, productos farmacéuticos y alquilfenoles en muestras de aguas naturales y residuales.

El adsorbente preferido en SPE para el análisis de PPCPs y compuestos disruptores endocrinos es Oasis[®] HLB. Este adsorbente también se ha aplicado con éxito para la extracción de algunos contaminantes orgánicos como BPA,

alquilfenoles, herbicidas y plaguicidas y otros EDCs, como nitrosaminas y drogas de abuso en muestras de agua natural, logrando LODs similares: 0.1-2 ng L⁻¹ [73], 0.09-1.8 y 0.2-2 ng L⁻¹ [75, 97] cuando se analizan por GC-MS. Los LODs observados para filtros UV presentes en muestras de aguas residuales y analizadas por GC-MS estaban en el rango 5-10 ng L⁻¹ [123], mientras que otros PPCPs como antidepressivos, antisépticos, cafeína o nicotina extraídos con SPE (HLB) consiguieron LOQ entre 1-160 ng L⁻¹ [143]. Se logró una sensibilidad moderada para los estrógenos después de la extracción y limpieza con florisil, con LOD en el rango de 0.2-2 ng L⁻¹ [129]. En algunos casos, sin embargo, la sensibilidad mejoró notablemente, logrando LODs 10 veces más bajos, es decir, en el rango de 0.01-0.13 ng L⁻¹ [95].

En comparación con GC, LC es capaz de analizar un grupo más amplio de compuestos polares, que se pueden extraer con SPE. La mayoría de los compuestos extraídos usando SPE (HLB) analizados con LC-MS/MS mostraron una sensibilidad de moderada a buena. Los productos farmacéuticos y los PCPs mostraron rangos similares de LOD: 0.1-9.9 ng L⁻¹ [191], 0.3-2 ng L⁻¹ [192], 0.02-50 µg L⁻¹ [193], 0.3-10.0 ng L⁻¹ [196], 0.02-98 ng L⁻¹ [197], 1.16-29.1 ng L⁻¹ [201]. Los filtros UV analizados ofrecieron LODs de 7-46 ng L⁻¹ [152] y LOQ de 0.2-4 ng L⁻¹ [159]. Los conservantes, desinfectantes y antisépticos se analizaron con mayor sensibilidad, logrando LODs aproximadamente 10 veces más bajos si se comparan con otros PPCPs: 0.03-14.8 ng L⁻¹ [46] y 0.015-2.5 ng L⁻¹ [188]; LOQs: 1.78-8.24 ng L⁻¹ [190]. Por el contrario, otros compuestos disruptores endocrinos como parabenos (PBs), triclosán (TCS) y triclocarbán (TCC) mostraron LOQ más bajos en el rango de 0.008-20 ng L⁻¹ después de la extracción con SPE (HLB) [174]. El BPA, los alquilfenoles y hormonas como los esteroides estrogénicos o androgénicos presentaron LOD de 6.29-7.24 ng L⁻¹ [189] y 2-30 ng L⁻¹ [175] y LOQs en el rango de 0.4-1 ng L⁻¹ y <1 ng L⁻¹ [178]. No obstante, la mayor sensibilidad se obtuvo cuando los éteres difenílicos bromados hidroxilados (OH-BDEs) y el TCS se analizaron por LC-MS/MS después de la extracción con SPE (HLB), seguido de limpieza con una columna de sílice, alcanzando LODs en el rango de 0.002-0.05 ng L⁻¹ [185].

Aunque se usa con menos frecuencia, otro adsorbente empleado para el análisis de contaminantes emergentes en muestras de aguas residuales y naturales es el octadecil sílice (C18). Algunos PPCPs se analizaron en muestras de agua natural mediante GC, como filtros UV y pesticidas [88], herbicidas y productos farmacéuticos [146], con LOD tan bajos como 0.1-3 ng L⁻¹ y 0.02-1 ng L⁻¹, respectivamente, y 1 ng L⁻¹ para almizcles sintéticos en muestras de aguas residuales [122]. El análisis de disruptores endocrinos como PBBs y PCBs utilizando SPE (C18) y GC en muestras de aguas residuales mostró LODs en el rango de 0.014-0.022 µg L⁻¹ para PBBs [125] y 0.1-100 ng L⁻¹ para PCBs [145]. Los valores más bajos de LOD (65-83 pg L⁻¹) se obtuvieron para los congéneres de PBDE BDE-28, -47, -99, -100, -153, -154, -183 y -209 en muestras de aguas residuales utilizando SPE (C18) y GC [141]. Entre los PPCPs extraídos con SPE (C18) y analizados por LC, se determinaron filtros UV en muestras de agua natural con valores de LOD que oscilaban entre 0.11 y 63.87 ng L⁻¹ [157]. En muestras de agua residual, se observaron LOQs en el rango de 0.02-85 ng L⁻¹ para productos farmacéuticos y otros PCPs después de la extracción por SPE (HLB) [221]. En muestras de agua natural, el análisis de diferentes EDCs alcanzó una sensibilidad apreciable utilizando LC-MS/MS con LODs en el rango de 0.78-7.65 ng L⁻¹ [173] y 0.01-3.64 ng L⁻¹ [174]. Sin embargo, para los EDCs analizados por cromatografía de líquidos con fluorescencia (LC-FLD), la sensibilidad disminuyó y, como resultado, los LODs variaron de 4 a 56 µg L⁻¹ [215].

Otro adsorbente polimérico que contiene grupos N-vinilpirrolidona es Phenomenex[®] Strata X, que se ha utilizado en la extracción principalmente de PPCPs y hormonas estrogénicas. En la mayoría de los casos, la sensibilidad lograda con SPE (Strata X) usando GC y LC en muestras de aguas naturales y de aguas residuales fue notablemente buena, alcanzando LODs entre 5-10 pg L⁻¹ [121], 0.03-23.5 ng L⁻¹ [72] y 0.1-4.8 ng L⁻¹ [194]. En otros casos, los LODs fueron más altos: 0.96-2.4 ng L⁻¹ [198], 1-5 ng L⁻¹ [146] y 10-186 ng L⁻¹ [89].

SPE acoplado on-line a LC-MS/MS también es una opción adecuada y demandada para la extracción de compuestos polares como PPCPs y EDCs, ya que es automatizable y requiere pocos pasos de preparación. Esta técnica se ha utilizado para determinar filtros UV [155], productos farmacéuticos [195, 214] y

hormonas [211] en muestras de agua natural y aguas residuales con sensibilidades que oscilan entre 1 y 50 ng L⁻¹.

Dado que existe la necesidad de métodos alternativos que permitan una detección más rápida, sensible y selectiva de analitos en muestras ambientales a niveles de trazas, los procedimientos clásicos como LLE o SPE están siendo reemplazados progresivamente por técnicas más modernas de preparación de muestras sin disolventes. Algunas de estas nuevas técnicas de microextracción se describen brevemente a continuación.

Microextracción en fase sólida (SPME). Es una técnica simple, rápida, libre de disolventes y eficiente. Integra la preconcentración e introducción de la muestra en un solo procedimiento cuando se combina con técnicas cromatográficas. Ofrece la posibilidad de lograr una determinación sensible de trazas de compuestos orgánicos, aunque el volumen de la fase PDMS (polidimetilsiloxano) en las fibras SPME es bajo. El SPME se ha aplicado con éxito para determinar filtros UV en muestras de aguas naturales y residuales [70], así como fragancias y olores almizclados [69] utilizando GC-MS y una fibra de aleación metálica como material de extracción. Se utilizó microextracción en fase sólida de espacio de cabeza (HS-SPME) para determinar PBs, TCs y fenoles relacionados en muestras de aguas naturales y residuales mediante GC-MS/MS, logrando una gran sensibilidad con LODs en el rango de 4 a 21 pg L⁻¹. Sin embargo, la fibra de extracción en este método es costosa, frágil y tiene una vida útil limitada [67].

Extracción con barras agitadoras adsorbentes (SBSE). Se ha aplicado para compuestos orgánicos semivolátiles a partir de muestras líquidas o extractos líquidos. Para el análisis, los compuestos se desorben química o térmicamente. Proporciona tasas de recuperación mejoradas, mayor capacidad de trabajo y sensibilidad, lo que permite la detección a niveles sub-ppt. Esta sensibilidad se mejora gracias a un mayor volumen de PDMS en comparación con SPME. La mayoría de los compuestos analizados con GC y extraídos con SBSE fueron desorbidos térmicamente. Entre los compuestos determinados en muestras de aguas residuales y naturales hay varios PPCPs como fragancias de almizcle [79],

repelentes de insectos [80] y filtros UV [81]. En estos trabajos se obtuvieron RSDs por debajo del 20%, 16% y 23.5%, respectivamente. SBSE permite la detección de analitos a niveles de concentración de ultratrazas con un pequeño volumen de muestra, obteniendo LODs que oscilan entre 0.2-63 ng L⁻¹ [81] y 0.5-30 ng L⁻¹ para repelentes de insectos [80]. Otros compuestos extraídos con SBSE con desorción térmica son los PBDEs, con tasas de recuperación del 65.6-116.9% tras ajustar el tiempo de extracción, la velocidad de agitación, el contenido de MeOH al 40% y las condiciones de desorción [134]. Se obtuvieron LODs de 0.03 a 20.4 ng L⁻¹ con una precisión de 80 a 120% para la extracción de contaminantes orgánicos como PAHs, PCBs, PEs y NPs [90]. Para los compuestos analizados con LC en aguas, se optó por la desorción química con disolventes en la determinación de filtros UV [153, 154] y EDCs como PBs, TCs y TCCs [217, 227]. Para los filtros UV la recuperación osciló entre el 25 y el 89% y se alcanzaron LODs de 8 a 31 ng L⁻¹ [154], dependiendo de la naturaleza de la muestra y el disolvente de desorción utilizado [153]; para la extracción de TC en aguas residuales se alcanzaron tasas de aproximadamente el 92% [217], y buena sensibilidad con LODs de 0.1 µg L⁻¹ para otros EDCs [227]. Además, algunos autores han probado recubrimientos de PDMS (no polar) y EG-silicona (alta polaridad) en la barra de agitación en un gran grupo de compuestos (como PBs, BPA, hormonas, compuestos farmacéuticos, etc.) en muestras de agua, seguido de análisis LC-MS/MS, obteniendo buenas recuperaciones de contaminantes polares y apolares con el recubrimiento de silicona EG [172].

Microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME). Se basa en la dispersión de gotitas del disolvente (de alta densidad con baja solubilidad en agua) dentro de la solución acuosa en la que se desarrolla el proceso. A pesar de que es difícil de automatizar y requiere un dosificador de disolvente, es un método rápido y de bajo costo, que asegura altos rendimientos de extracción de compuestos orgánicos en muestras de agua. Se ha empleado para la determinación por GC-MS de varios compuestos en agua natural, tales como TCs y MTCs [68] y filtros UV [85, 86, 124]. Además, DLLME también se ha utilizado para la determinación de BPA, sus fenoles relacionados [203] y PBDEs [139], logrando LODs en el rango de 0.2-1.6 ng mL⁻¹ y 0.05-239 ng mL⁻¹ por LC-UV y LC acoplada a detección con diodos Array, respectivamente. Mediante esta

técnica, se ha realizado la determinación de algunos EDCs (hormonas, conservantes, BPA, nonilfenol y sus derivados) y un retardante de llama mediante esta técnica seguida de análisis LC-MS/MS [170, 171].

Microextracción por emulsificación asistida por ultrasonido (USAEME). USAEME fue desarrollado por primera vez por Regueiro y col. [78] y se basa en la emulsificación de un pequeño volumen de un disolvente orgánico que actúa como extractante en una muestra acuosa, mediante la aplicación de radiación ultrasónica, seguida de la separación de ambas fases líquidas por centrifugación. La radiación ultrasónica aumenta la eficiencia de la extracción en un tiempo más corto, ya que acelera el proceso de transferencia de masa entre las dos fases inmiscibles. El mecanismo de la energía ultrasónica se basa en el efecto de cavitación, que genera diminutas burbujas en el medio acuoso y erosión mecánica de los sólidos y ruptura de las partículas [66]. Por lo tanto, USAEME es una técnica útil para determinar analitos en muestras de agua a nivel traza, ya que es una técnica de extracción y preconcentración eficiente, simple y económica para el análisis posterior mediante GC. Este método de extracción se aplicó por primera vez a la determinación de fragancias de almizcle sintético, ésteres de ftalato y lindano a partir de muestras de agua natural, obteniendo una gran sensibilidad con LODs en el rango de 7.4-133 pg mL⁻¹ [78]. También se ha aplicado en la determinación de varios congéneres de PBDE (BDE-47, BDE-99, BDE-100 y BDE-153) con LOD bajos en el rango de 1-2 pg mL⁻¹ [108]. Para la determinación de parabenos, triclosán y fenoles relacionados en muestras de agua ambiental por GC-MS, se llevó a cabo un paso previo de derivatización con anhídrido acético debido a las propiedades relativamente polares de estos compuestos; se obtuvieron LODs de 3.9 a 27.5 pg L⁻¹ [66].

Microextracción con absorbentes empaquetados (MEPS). Es una nueva técnica de microextracción, similar a micro-SPE. Es automatizable, necesita pequeños volúmenes de muestra y disolvente y tiene un tiempo de extracción corto. Los MEPS se han utilizado en la determinación de una amplia gama de drogas ilícitas y productos farmacéuticos, incluidos los antidepresivos [229]. MEPS proporciona una precisión comparable a SBSE. Aunque MEPS se ha utilizado más comúnmente para la determinación de compuestos en matrices

biológicas como plasma humano u orina, también se puede aplicar a muestras de agua. Se ha aplicado MEPS seguido de análisis mediante GC-MS para la determinación de filtros UV con LODs que oscilan entre 35 y 87 ng L⁻¹ [82].

2.3.2. Técnicas instrumentales

Para lograr una determinación selectiva y sensible de los compuestos diana en muestras de agua, se debe seleccionar una técnica de separación analítica adecuada, preferiblemente después del enriquecimiento y aislamiento de los analitos encontrados en niveles traza en la matriz compleja. Las técnicas más habituales utilizadas para el análisis de estos compuestos son la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía de líquidos (LC) acoplada a espectrometría de masas (MS o MS/MS), como se recoge en las **Tablas II.1-4**. La selección de uno u otro suele depender de las propiedades fisicoquímicas de los analitos. Los compuestos menos volátiles y polares se detectan con LC normalmente, mientras que GC se usa para compuestos volátiles.

Debido a la débil polaridad y volatilidad de los congéneres, los PBDEs presentes en muestras ambientales se han analizado normalmente mediante GC. Dado que el análisis requiere límites de detección bajos y alta selectividad, GC-MS, GC-ECD, GC-HRMS o GC-ToF han sido las más empleadas. Aunque el GC-ECD se ha utilizado para la cuantificación de varios PBDE en muestras de aguas residuales [35, 135, 144] debido a su alta sensibilidad para moléculas que contienen grupos electronegativos, carece de selectividad. Este último solo se basa en el tiempo de retención observado. Por lo tanto, la presencia de especies interferentes puede dar lugar a resultados erróneos en la detección, por ejemplo, en matrices complejas que contienen moléculas de bromo o cloro. Por el contrario, con la ionización negativa por captura de electrones (ECNI-MS) [109, 114, 139], la respuesta de los PBDEs es más selectiva que en GC-ECD, debido a los iones bromuro. La mayoría de los PBDEs en muestras de agua se identifican y cuantifican mediante GC-MS [13, 92, 104-107, 110-115, 116, 134-138, 141-143, 230]. La espectrometría de masas como detector ofrece una gran selectividad y sensibilidad dependiendo del tipo de modo de ionización elegido. La ionización química negativa (NCI) [13, 110, 134, 138, 140, 141] es el modo más

común, ya que proporciona mayor sensibilidad que la ionización por impacto de electrones (EI) [104, 107, 110-112, 137, 138, 230], aunque es menos selectivo. Los espectrómetros de masas de alta resolución (HRMS) utilizados en el modo EI son más sensibles y específicos para los PBDEs [77, 106, 151], aunque estos instrumentos son costosos y requieren usuarios experimentados. Por tanto, la opción preferida sigue siendo GC-NCI-MS. La espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) también representa un enfoque igualmente adecuado para la detección de PBDEs, ya que proporciona mejores LODs que GC-NCI-MS, lo que permite la detección a niveles de ultra-traza [39]. Se han determinado algunos EDCS mediante cromatografía de gases bidimensional acoplada al tiempo de vuelo (GC × GC-ToFMS). GC × GC es una técnica que mejora la separación de compuestos. Consta de dos columnas alineadas ortogonalmente que están compuestas por dos fases estacionarias químicamente diferentes que aumentan la capacidad de separación [148].

ICP-MS se ha empleado típicamente para la detección de nanopartículas (NPs) en muestras de agua natural [231], ya que proporciona alta sensibilidad, amplio rango lineal dinámico y capacidad de múltiples elementos para el análisis. No obstante, no puede diferenciar entre las NPs metálicas y sus iones correspondientes en matrices complejas cuando su concentración es muy baja, lo que afecta la precisión de los resultados. La aplicación de ICP-MS ha sido una técnica instrumental importante en el análisis de (ultra) trazas elementales. El acoplamiento entre LC o GC a ICP-MS se ha convertido en una poderosa herramienta analítica en ciencias ambientales para estudios de especiación [232]. Una de las principales ventajas de combinar LC con ICP-MS es que solo se requiere una interfaz simple y directa, aunque pueden surgir problemas debido a la composición de la fase móvil. LC-ICP-MS permite detectar NPs modificadas en muestras ambientales [233], ya que separa las partículas en función de sus coeficientes de difusión, lo que conduce a una preparación mínima de la muestra. GC-ICP-MS proporciona un mayor poder de resolución y una eficiencia de introducción del 100% en el ICP, pero para el acoplamiento, se deben implementar varios requisitos [232].

La GC-MS se ha utilizado en el análisis de EDCs no polares semivolátiles y volátiles durante años [94-104, 128-133]. Si bien algunos EDCs pueden analizarse directamente, muchos requieren un paso de derivatización para modificar su estructura para adecuarse a esta técnica. A pesar de la mejora en la sensibilidad y selectividad en la detección de MS, la derivatización aumenta la complejidad del proceso, junto con las posibilidades de error y el tiempo total de análisis. Por lo tanto, LC ha reemplazado rápidamente a GC-MS para la detección de EDCs en muestras ambientales, como se observa en las **Tablas II.3-4** [99, 128, 168-183, 217-219]. LC-MS permite la detección de compuestos en muestras de agua con polaridades extremas (compuestos ácidos), térmicamente lábiles (esteroides) o de gran masa molecular (antibióticos) con gran sensibilidad y selectividad. La ionización por electropulverización (ESI) [168, 169, 173, 175-183] y la ionización química a presión atmosférica (APCI) [180] son las interfaces LC-MS más utilizadas en la detección de EDCs en muestras de agua. Si bien ESI es susceptible a la supresión iónica por la matriz, APCI proporciona más opciones de ionización para compuestos con baja polaridad y, hasta cierto punto, suprime los efectos de la matriz. Sin embargo, el triple cuadrupolo (QqQ) es la herramienta más sensible, selectiva y, por tanto, útil para la detección de EDCs en muestras de agua. Al operar el QqQ en modo MRM, el tiempo de análisis, el costo y la complejidad experimental se reducen significativamente. LC-FLD no se usa a menudo en la detección de EDCs, ya que la mayoría de los EDCs no exhiben fluorescencia nativa. No obstante, LC-FLD se ha aplicado con éxito para la determinación de bisfenol A (BPA), 4-n-nonilfenol (4-NNP), 4-n-octilfenol (4-NOP), 4-t-octilfenol (4-TOP), estriol (E₃), estrona (E₁), 17β-estradiol (E₂) y 17α-etinilestradiol (EE₂) en agua de mar [215].

Los PPCPs que se encuentran en muestras de agua, como los EDCs, han sido analizados por GC durante mucho tiempo; siendo el detector de ionización de llama (GC-FID), la captura de electrones (GC-ECD) [149] o la espectrometría de masas (GC-MS) [50, 78-88, 121-124, 143] los detectores más comunes. En cualquier caso, estas técnicas han sido rápidamente reemplazadas por LC, que permite la detección de la mayoría de las PPCPs, ya que son compuestos polares. La cromatografía de líquidos a de ultra alta resolución (UHPLC) ofrece alta sensibilidad, selectividad y fiabilidad, proporcionando los mismos LODs que

la técnica de GC, pero sin requerir un paso de derivatización. Se basan principalmente en el uso de detección por espectrometría de masas en tándem (MS/MS) [46, 53, 54, 152-160, 187-197, 224-226]. El modo de ionización ESI es el más utilizado para la detección de PPCPs en muestras ambientales (**Tablas II.1-4**). Para fines de cuantificación, el modo de iones selectivos (SIM) de MS logra una alta sensibilidad, mientras que la MS de triple cuadrupolo (QqQ) aumenta la selectividad en la determinación de analitos diana en matrices complejas. UHPLC acorta drásticamente el tiempo de análisis y asegura una alta eficiencia cuando se acopla a MS (**Tablas II.1-4**).

2.4. Conclusiones y perspectivas futuras

Esta investigación proporciona una visión general de los métodos desarrollados en los últimos 10 años para la determinación de contaminantes emergentes en medios acuáticos, muestras de aguas naturales y aguas residuales de diferentes fuentes como ríos, lagos, agua corriente, mares, piscinas, estuarios subterráneos o cuerpos de agua de embalse, afluentes y efluentes provenientes de EDAR. Las técnicas de extracción clásicas como LLE o SPE se han utilizado ampliamente durante años. Tienen varias ventajas relacionadas con la simplicidad del tratamiento de muestra, la facilidad de manipulación y la ausencia de equipos sofisticados. Sin embargo, las técnicas clásicas presentan desventajas que generalmente superan a sus ventajas, ya que requieren mucho tiempo, son costosas y requieren grandes volúmenes de disolventes orgánicos sin ser particularmente selectivas, especialmente LLE. La necesidad de nuevas técnicas alternativas capaces de solucionar las deficiencias de las técnicas clásicas ha despertado el interés en el desarrollo y uso de técnicas de microextracción como SPME, SBSE o DLLME.

En cuanto a las técnicas instrumentales seleccionadas para el análisis de aguas han sido generalmente las cromatografías de líquidos y gases acopladas a espectrometría de masas (MS) principalmente en tándem (MS/MS). Para la determinación de PPCPs, la opción más común para muchos autores ha sido SPE seguido de LC-MS/MS. Sin embargo, SPE implica un tratamiento relativamente caro no asequible para algunos laboratorios. Un enfoque

alternativo implicaría la extracción por técnicas de microextracción como SBSE o SPME y análisis por GC. Con respecto a la determinación de EDCs, SPE sigue siendo la técnica de extracción más utilizada antes del análisis por GC o LC. Se han propuesto otros métodos de microextracción como SPME, DLLME o MEPS, aunque es importante destacar que el número de trabajos publicados centrados en la microextracción de EDCs en muestras de agua es escaso. Se han utilizado básicamente técnicas de extracción clásicas (SPE y LLE). Recientemente, técnicas de microextracción como SPME, MEPS o SBSE se han convertido en algunas de las alternativas propuestas.

La amplia diversidad de propiedades químicas de los contaminantes emergentes, y las bajas concentraciones en las que están presentes en los medios acuáticos, hace que el análisis de este tipo de compuestos sea un desafío analítico. Sin embargo, debido a su presencia cada vez mayor en el medio ambiente y sus posibles efectos ecotoxicológicos, se están realizando esfuerzos para mejorar y desarrollar nuevos métodos para la detección a nivel traza de estos compuestos. Como conclusión final, se puede afirmar que se han desarrollado un número creciente de métodos analíticos durante los últimos 10 años para determinar los contaminantes emergentes en muestras de aguas residuales y naturales provenientes de diferentes fuentes.

2.5. Referencias

- [1]. Kourgialas, N. N.; Karatzas, G. P.; Dokou, Z.; Kokorogiannis, A. Groundwater footprint methodology as policy tool for balancing water needs (agriculture & tourism) in water scarce islands - the case of crete, Greece. *Sci. Total Environ.* **2018**, *615*, 381-389.
- [2]. Dokou, Z.; Kourgialas, N. N.; Karatzas, G. P. Assessing groundwater quality in Greece based on spatial and temporal analysis. *Environ. Monit. Assess.* **2015**, *187*, 774-792.
- [3]. Munthe, J.; Brorstrom-Lunden, E.; Rahmberg, M.; Posthuma, L.; Altenburger, R.; Brack, W.; Bunke, D.; Engelen, G.; Gawlik, B. M.; van Gils, J.; et al. An expanded conceptual framework for solution-focused

- management of chemical pollution in European waters. *Environ. Sci. Eur.* **2017**, 29, 13-29.
- [4]. Busch, W.; Schmidt, S.; Kühne, R.; Schulze, T.; Krauss, M.; Altenburger, R. Micropollutants in European rivers: A mode of action survey to support the development of effect-based tools for water monitoring. *Environ. Toxicol. Chem.* **2016**, 35, 1887-1899.
- [5]. Malaj, E.; von der Ohe, P. C.; Grote, M.; Kühne, R.; Mondy, C. P.; Usseglio-Polatera, P.; Brack, W.; Schäfer, R. B. Organic chemicals jeopardize the health of freshwater ecosystems on the continental scale. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2014**, 111, 9549-9554.
- [6]. Stehle, S.; Schulz, R. Agricultural insecticides threaten surface waters at the global scale. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2015**, 112, 5750-5755.
- [7]. Loos, R.; Gawlik, B. M.; Locoro, G.; Rimaviciute, E.; Contini, E. S.; Bidoglio, G. EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environ. Pollut.* **2009**, 157, 561-568.
- [8]. Moschet, C.; Wittmer, I.; Simovic, J.; Junghans, M.; Piazzoli, A.; Singer, H.; Stamm, C.; Leu, C.; Hollender, J. How a complete pesticide screening changes the assessment of surface water quality. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, 48, 5423-5432.
- [9]. Kolpin, D. W.; Furlong, E. T.; Meyer, M. T.; Thurman, E. M.; Zaugg, S. D.; Barber, L. B.; Buxton, H. T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, 36, 1202-1211.
- [10]. Matamoros, V.; Sala, L.; Salvadó, V. Evaluation of a biologically-based filtration water reclamation plant for removing emerging contaminants: A pilot plant study. *Bioresour. Technol.* **2012**, 104, 243-249.
- [11]. Tahar, A.; Tiedeken, E. J.; Clifford, E.; Cummins, E.; Rowan, N. Development of a semi-quantitative risk assessment model for evaluating environmental threat posed by the three first EU watch-list pharmaceuticals to Urban wastewater treatment plants: An Irish case study. *Sci. Total Environ.* **2017**, 603-604, 627-638.

- [12]. Zhang, Y.; Wang, W.; Song, J.; Ren, Z.; Yuan, H.; Yan, H.; Zhang, J.; Pei, Z.; He, Z. Environmental characteristics of poly- brominated diphenyl ethers in marine system, with emphasis on marine organisms and sediments. *Biomed Res. Int.* **2016**, 2016, 1–16.
- [13]. Xiang, N.; Zhao, X.; Meng, X. Z.; Chen, L. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in a conventional wastewater treatment plant (WWTP) from Shanghai, the Yangtze River Delta: Implication for input source and mass loading. *Sci. Total Environ.* **2013**, 461–462, 391–396.
- [14]. Darnerud, P. O. Toxic effects of brominated flame retardants in man and in wildlife. *Environ. Int.* **2003**, 29, 841–853.
- [15]. Costa, L. G.; Giordano, G.; Tagliaferri, S.; Caglieri, A.; Mutti, A. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants: Environmental contamination, human body burden and potential adverse health effects. *Acta Biomed.* **2009**, 79, 172–183.
- [16]. Gore, A. C.; Chappell, V. A.; Fenton, S. E.; Flaws, J. A.; Nadal, A.; Prins, G. S.; Toppari, J.; Zoeller, R. T. EDC-2: The endocrine Society’s second scientific statement on endocrine disrupting chemicals. *Endocr. Rev.* **2015**, 36, E1–E150.
- [17]. Jiménez-Díaz, I.; Vela-Soria, F.; Rodríguez-Gómez, R.; Zafra-Gómez, A.; Ballesteros, O.; Navalón, A. Analytical methods for the assessment of endocrine disrupting chemical exposure during human fetal and lactation stages: A review. *Anal. Chim. Acta* **2015**, 892, 27–48.
- [18]. El-Say, K. M.; El-Sawy, H. S. Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. *Int. J. Pharm.* **2017**, 528, 675–691.
- [19]. Mohanraj, V. J.; Chen, Y. Nanoparticles – A review. *Trop. J. Pharm. Res.* **2007**, 5, 561–573.
- [20]. Duhan, J. S.; Kumar, R.; Kumar, N.; Kaur, P.; Nehra, K.; Duhan, S. Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. *Biotechnol. Rep.* **2017**, 15, 11–23.

- [21]. Crosera, M.; Bovenzi, M.; Maina, G.; Adami, G.; Zanette, C.; Florio, C.; Filon Larese, F. Nanoparticle dermal absorption and toxicity: A review of the literature. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **2009**, *82*, 1043–1055.
- [22]. Schaeublin, N. M.; Braydich-Stolle, L. K.; Maurer, E. I.; Park, K.; Mac Cuspie, R. I.; Afrooz, A. R. M. N.; Vaia, R. A.; Saleh, N. B.; Hussain, S. M. Does shape matter? Bioeffects of gold nanomaterials in a human skin cell model. *Langmuir* **2012**, *28*, 3248–3258.
- [23]. Choi, S. Y.; Jeong, S.; Jang, S. H.; Park, J.; Park, J. H.; Ock, K. S.; Lee, S. Y.; Joo, S. W. In Vitro toxicity of serum protein-adsorbed citrate-reduced gold nanoparticles in human lung adenocarcinoma cells. *Toxicol. In Vitro* **2012**, *26*, 229–237.
- [24]. Li, W. T.; Fan, J. H.; Hung, W. I.; Chen, C. P.; Yeh, J. M. Cytotoxicity and differentiation effects of gold nanoparticles to human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomed. Eng. Appl. Basis Commun.* **2011**, *23*, 141–152.
- [25]. Navarro, E.; Piccapietra, F.; Wagner, B.; Marconi, F.; Kaegi, R.; Odzak, N.; Sigg, L.; Behra, R. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 8959–8964.
- [26]. Asharani, P. V.; Lian, W. Y.; Gong, Z.; Valiyaveetil, S. Toxicity of silver nanoparticles in Zebrafish models. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 255102.
- [27]. Speranza, A.; Leopold, K.; Maier, M.; Taddei, A. R.; Scoccianti, V. Pd-nanoparticles cause increased toxicity to kiwifruit pollen compared to soluble Pd(II). *Environ. Pollut.* **2010**, *158*, 873–882.
- [28]. Ternes, T. A.; Joss, A.; Siegrist, H. Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*, 392A–339A.
- [29]. Muñoz, I.; López-Doval, J. C.; Ricart, M.; Villagrasa, M.; Brix, R.; Geiszinger, A.; Ginebreda, A.; Guasch, H.; de Alda, M. J. L.; Romaní, A. M.; et al. Bridging levels of pharmaceuticals in river water with biological community structure in the Llobregat River (Northeast Spain). *Environ. Toxicol. Chem.* **2009**, *28*, 2706–2714.,

- [30]. Henry, T. B.; Black, M. C. Acute and chronic toxicity of fluoxetine (selective serotonin reuptake inhibitor) in Western mosquitofish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2008**, *54*, 325-330.
- [31]. European Union. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 Establishing a Framework for Community Action in the Field of Water Policy. *Off. J. Eur. Commun.* **2000**, *L327*, 1-70.
- [32]. Posthuma, L.; Dyer, S. D.; de Zwart, D.; Kapo, K.; Holmes, C. M.; Burton, G. A. Jr. Eco-epidemiology of aquatic ecosystems: Separating chemicals from multiple stressors. *Sci. Total Environ.* **2016**, *573*, 1303-1319.
- [33]. European Commission. Living well within the limits of our planet. General Union Environment Action Programme 2014, 2020, doi: 10.2779/57220. Available at: <http://ec.europa.eu/environment/pubs/pdf/factsheets/7eap/en.pdf> (visited 31/01/2018).
- [34]. Vonderheide, A. P.; Mueller, K. E.; Meija, J.; Welsh, G. L. Polybrominated diphenyl ethers: Causes for concern and knowledge gaps regarding environmental distribution, fate and toxicity. *Sci. Total Environ.* **2008**, *400*, 425-436.
- [35]. Zhang, W.; Sun, Y.; Wu, C.; Xing, J.; Li, J. Polymer-functionalized single-walled carbon nanotubes as a novel sol-gel solid-phase micro-extraction coated fiber for determination of poly-brominated diphenyl ethers in water samples with gas chromatography-electron capture detection. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 2912-2920.
- [36]. Costa, L. G.; Giordano, G. Developmental neurotoxicity of polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants. *Neurotoxicology* **2007**, *28*, 1047-1067.
- [37]. Gaylor, M.; Mears, G.; Harvey, E.; La Guardia, M. J.; Hale, R. C. Polybrominated diphenyl ether accumulation in an agricultural soil ecosystem receiving wastewater sludge amendments. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 7034-7043.

- [38]. Huang, H.; Zhang, S.; Christie, P. Plant uptake and dissipation of PBDEs in the soils of electronic waste recycling sites. *Environ. Pollut.* **2011**, *159*, 238-243.
- [39]. González-Gago, A.; Pröfrock, D.; Prange, A. Optimizing GC-ICP-MS for ultra-trace quantification of PBDEs in natural water samples using species-specific isotope dilution. *J. Anal. At. Spectrom.* **2015**, *30*, 180-190.
- [40]. McDonald, T. A. A perspective on the potential health risks of PBDEs. *Chemosphere* **2002**, *46*, 745-755.
- [41]. Kaw, H. Y.; Kannan, N. A review on polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in South Asia with a focus on Malaysia. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **2017**, *242*, 153-181.
- [42]. Lyche, J. L.; Rosseland, C.; Berge, G.; Polder, A. Human health risk associated with brominated flame-retardants (BFRs). *Environ. Int.* **2015**, *74*, 170-180.
- [43]. Daughton, C. G.; Ternes, T. A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environ. Health Perspect.* **1999**, *107*, 907-938.
- [44]. Daughton, C. G. Non-regulated water contaminants: Emerging research. *Environ. Impact. Asses. Rev.* **2004**, *24*, 711-732.
- [45]. Liu, J. L.; Wong, M. H. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): A review on environmental contamination in China. *Environ. Int.* **2013**, *59*, 208-224.
- [46]. Subedi, B.; Codru, N.; Dziewulski, D. M.; Wilson, L. R.; Xue, J.; Yun, S.; Braun-Howland, E.; Minihane, C.; Kannan, K. A pilot study on the assessment of trace organic contaminants including pharmaceuticals and personal care products from on-site wastewater treatment systems along Skaneateles Lake in New York State, USA. *Water Res.* **2015**, *72*, 28-39.

- [47]. Brausch, J. M.; Rand, G. M. A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere* **2011**, *82*, 1518-1532.
- [48]. Fent, K.; Weston, A. A.; Caminada, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* **2006**, *76*, 122-159.
- [49]. Lai, K. M.; Scrimshaw, M. D.; Lester, J. N. The effects of natural and synthetic steroid estrogens in relation to their environmental occurrence. *Crit. Rev. Toxicol.* **2002**, *32*, 113-132.
- [50]. Peng, X.; Yu, Y.; Tang, C.; Tan, J.; Huang, Q.; Wang, Z. Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in Urban riverine water of the Pearl River Delta, South China. *Sci. Total Environ.* **2008**, *397*, 158-166.
- [51]. Roepke, T. A.; Snyder, M. J.; Cherr, G. N. Estradiol and endocrine disrupting compounds adversely affect development of sea urchin embryos at environmentally relevant concentrations. *Aquat. Toxicol.* **2005**, *71*, 155-173.
- [52]. Guardabassi, L.; Petersen, A.; Olsen, J. E.; Dalsgaard, A. Antibiotic resistance in *Acinetobacter* Spp. isolated from sewers receiving waste effluent from a hospital and a pharmaceutical plant. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 3499-3502.
- [53]. Oliveira, T. S.; Murphy, M.; Mendola, N.; Wong, V.; Carlson, D.; Waring, L. Characterization of pharmaceuticals and personal care products in hospital effluent and waste water influent/effluent by direct-injection LC-MS-MS. *Sci. Total Environ.* **2015**, *518-519*, 459-478.
- [54]. Kasprzyk-Hordern, B.; Dinsdale, R. M.; Guwy, A. J. Multiresidue methods for the analysis of pharmaceuticals, personal care products and illicit drugs in surface water and wastewater by solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1293-1308.
- [55]. Nohynek, G. J.; Borgert, C. J.; Dietrich, D.; Rozman, K. K. Endocrine disruption: Fact or Urban legend? *Toxicol. Lett.* **2013**, *223*, 295-305.

- [56]. Rattan, S.; Zhou, C.; Chiang, C.; Mahalingam, S.; Brehm, E.; Flaws, J. A. Exposure to endocrine disruptors during adulthood: Consequences for female fertility. *J. Endocrinol.* **2017**, *233*, R109-R129.
- [57]. Chapman, P. M. Emerging substances-emerging problems? *Environ. Toxicol. Chem.* **2006**, *25*, 1445-1447.
- [58]. Masuo, Y.; Ishido, M. Neurotoxicity of endocrine disruptors: Possible involvement in brain development and neurodegeneration. *J. Toxicol. Environ. Health B* **2011**, *14*, 346-369.
- [59]. Dalgaard, M.; Hossaini, A.; Hougaard, K. S.; Hass, U.; Ladefoged, O. Development toxicity of toluene in male rats: Effects on semen quality, testis morphology, and apoptotic neurodegeneration. *Arch. Toxicol.* **2001**, *75*, 103-109.
- [60]. Oh, S. M.; Ryu, B. T.; Chung, K. H. Identification of estrogenic and antiestrogenic activities of respirable diesel exhaust particles by bioassay-directed fractionation. *Arch. Pharm. Res.* **2008**, *31*, 75-82.
- [61]. Mehta, R. V. Synthesis of magnetic nanoparticles and their dispersions with special reference to applications in biomedicine and biotechnology. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *79*, 901-916.
- [62]. Farkas, J.; Christian, P.; Gallego-Urrea, J. A.; Roos, N.; Hassellöv, M.; Tollefsen, K. E.; Thomas, K. V. Uptake and effects of manufactured silver nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill cells. *Aquat. Toxicol.* **2011**, *101*, 117-125.
- [63]. Khlebtsov, N.; Dykman, L. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: A review of in vitro and in vivo studies. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1647-1671.
- [64]. Murphy, C. J.; Gole, A. M.; Stone, J. W.; Sisco, P. N.; Alkilany, A. M.; Goldsmith, E. C.; Baxter, S. C. Gold nanoparticles in biology: Beyond toxicity to cellular imaging. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1721-1730.
- [65]. WHO. *Guidelines for Drinking-Water Quality.* **2004**, *1*, 1-564.

- [66]. Regueiro, J.; Llompart, M.; Psillakis, E.; Garcia-Monteagudo, J. C.; Garcia-Jares, C. Ultrasound-assisted emulsification–microextraction of phenolic preservatives in water. *Talanta* **2009**, *79*, 1387–1397.
- [67]. Regueiro, J.; Becerril, E.; Garcia-Jares, C.; Llompart, M. Trace analysis of parabens, triclosan and related chlorophenols in water by headspace solid-phase microextraction with in situ derivatization and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 4693–4702.
- [68]. Montes, R.; Rodríguez, I.; Rubí, E.; Cela, R. Dispersive liquid–liquid microextraction applied to the simultaneous derivatization and concentration of triclosan and methyltriclosan in water samples. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 205–210.
- [69]. Machado, S.; Gonçalves, C.; Cunha, E.; Guimaraes, A.; Alpendurada, M. F. New developments in the analysis of fragrances and earthy–musty compounds in water by solid-phase microextraction (metal alloy fiber) coupled with gas chromatography–(tandem) mass spectrometry. *Talanta* **2011**, *84*, 1133–1140.
- [70]. Negreira, N.; Rodríguez, I.; Ramil, M.; Rubí, E.; Cela, R. Sensitive determination of salicylate and benzophenone type UV filters in water samples using solid-phase microextraction, derivatization and gas chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *638*, 36–44.
- [71]. da Silva, C. P.; Emídio, E. S.; de Marchi, M. R. R. UV filters in water samples: Experimental design on the SPE optimization followed by GC-MS/MS analysis. *J. Braz. Chem. Soc.* **2013**, *24*, 1433–1441.
- [72]. da Silva, C. P.; Emídio, E. S.; de Marchi, M. R. R. Method validation using weighted linear regression models for quantification of UV filters in water samples. *Talanta* **2015**, *131*, 221–227.
- [73]. Sánchez-Avila, J.; Fernandez-Sanjuan, M.; Vicente, J.; Lacorte, S. Development of a multi-residue method for the determination of organic micropollutants in water, sediment and mussels using gas

- chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218, 6799–6811.
- [74]. Sánchez-Avila, J.; Tauler, R.; Lacorte, S. Organic micropollutants in coastal waters from NW Mediterranean Sea: Sources distribution and potential risk. *Environ. Int.* **2012**, 46, 50–62.
- [75]. Robles-Molina, J.; Gilbert-Lopez, B.; García-Reyes, J. F.; Molina-Díaz, A. Monitoring of selected priority and emerging contaminants in the Guadalquivir river and other related surface waters in the Province of Jaen, South East Spain. *Sci. Total Environ.* **2014**, 479–480, 247–257.
- [76]. Park, M.; Reckhow, D.; Lavine, M.; Rosenfeld, E.; Stanford, B.; Park, M.-H. Multivariate analyses for monitoring EDCs and PPCPs in a lake water. *Water Environ. Res.* **2014**, 86, 2233–2241.
- [77]. Levison, J.; Novakowski, K.; Reiner, E. J.; Kolic, T. Potential of groundwater contamination by polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in a sensitive bedrock aquifer (Canada). *Hydrogeol. J.* **2012**, 20, 401–412.
- [78]. Regueiro, J.; Llompарт, M.; Garcia-Jares, C.; Garcia- Monteagudo, J. C.; Cela, R. Ultrasound-assisted emulsification–microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1190, 27–38.
- [79]. Arbulu, M.; Sampedro, M.C.; Unceta, N.; Gómez-Caballero, A.; Goicolea, M. A.; Barrio, R. J. A retention time locked gas chromatography–mass spectrometry method based on stir-bar sorptive extraction and thermal desorption for automated determination of synthetic musk fragrances in natural and wastewaters. *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218, 3048–3055.
- [80]. Rodil, R.; Moeder, M. Stir bar sorptive extraction coupled to thermodesorption–gas chromatography–mass spectrometry for the determination of insect repelling substances in water samples. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1178, 9–16.
- [81]. Rodil, R.; Moeder, M. Development of a method for the determination of UV filters in water samples using stir bar sorptive extraction and thermal

- desorption–gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1179*, 81–88.
- [82]. Moeder, M.; Schrader, S.; Winkler, U.; Rodil, R. At-line microextraction by packed sorbent-gas chromatography-mass spectrometry for the determination of UV filter and polycyclic musk compounds in water samples. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 2925–2932.
- [83]. Román, I.P.; Chisvert, A.; Canals, A. Dispersive solid-phase extraction based on oleic acid-coated magnetic nanoparticles followed by gas chromatography–mass spectrometry for UV-filter determination in water samples. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 2467–2475.
- [84]. Zhang, H.; Lee, H. K. Simultaneous determination of ultraviolet filters in aqueous samples by plunger-in-needle solid-phase microextraction with graphene-based sol–gel coating as sorbent coupled with gas chromatography–mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *742*, 67–73.
- [85]. Wu, J. W.; Chen, H. C.; Ding, W. H. Ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction plus simultaneous silylation for rapid determination of salicylate and benzophenone-type ultraviolet filters in aqueous samples. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1302*, 20–27.
- [86]. Benedé, J. L.; Chisvert, A.; Salvador, A.; Sánchez-Quiles, D.; Tovar-Sanchez, A. Determination of UV filters in both soluble and particulate fractions of seawaters by dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *812*, 50–58.
- [87]. Kotnik, K.; Kosjek, T.; Krajnc, U.; Heath, E. Trace analysis of benzophenone-derived compounds in surface waters and sediments using solid-phase extraction and microwave-assisted extraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 3179–3190.
- [88]. Kameda, Y.; Kimura, K.; Miyazaki, M. Occurrence and profiles of organic sun-blocking agents in surface waters and sediments in Japanese rivers and lakes. *Environ. Pollut.* **2011**, *159*, 1570–1576.

- [89]. Cuderman, P.; Heath, E. Determination of UV filters and antimicrobial agents in environmental water samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 1343–1350.
- [90]. Prieto, A.; Telleria, O.; Etxebarria, N.; Fernandez, L. A.; Usobiaga, A.; Zuloaga, O. Simultaneous preconcentration of a wide variety of organic pollutants in water samples, comparison of stir bar sorptive extraction and membrane-assisted solvent extraction. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1214*, 1–10.
- [91]. Sánchez-Avila, J.; Vicente, J.; Echavarri-Erasun, B.; Porte, C.; Tauler, R.; Lacorte, S. Sources, fluxes and risk of organic micropollutants to the Cantabrian Sea (Spain). *Mar. Pollut. Bull.* **2013**, *72*, 119–132.
- [92]. Manamsa, K.; Crane, E.; Stuart, M.; Talbot, J.; Lapworth, D.; Hart, A. A national-scale assessment of micro-organic contaminants in groundwater of England and Wales. *Sci. Total Environ.* **2016**, *568*, 712–726.
- [93]. Portolés, T.; Pitarch, E.; López, F.; Hernández, J. F. Development and validation of a rapid and wide-scope qualitative screening method for detection and identification of organic pollutants in natural water and wastewater by gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 303–315.
- [94]. Nevado, J. J. B.; Cabanillas, C. G.; Llerena, M. J. V.; Robledo, V. R. Sensitive SPE GC-MS-SIM screening of endocrine- disrupting herbicides and related degradation products in natural surface waters and robustness study. *Microchem. J.* **2007**, *87*, 62–71.
- [95]. Zhou, Y.; Zho, J.; Xu, Y.; Zha, J.; Ma, M.; Wang, Z. An alternative method for the determination of estrogens in surface water and wastewater treatment plant effluent using pre-column trimethylsilyl derivatization and gas chromatography/ mass spectrometry. *Environ. Monit. Assess.* **2009**, *158*, 35–49.
- [96]. 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.

- [97]. Zhao, J. L.; Ying, G. G.; Wang, L.; Yang, J. F.; Yang, X. B.; Yang, L. H.; Li, X. Determination of phenolic endocrine disrupting chemicals and acidic pharmaceuticals in surface water of the Pearl Rivers in South China by gas chromatography–negative chemical ionization–mass spectrometry. *Sci. Total Environ.* **2009**, *407*, 962–974.
- [98]. Prieto, A.; Vallejo, A.; Zuloaga, O.; Paschke, A.; Sellergen, B.; Schillinger, E.; Schrader, S.; Moder, M. Selective determination of estrogenic compounds in water by microextraction by packed sorbents and a molecularly imprinted polymer coupled with large volume injection-in-port-derivatization gas chromatography–mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *703*, 41–51.
- [99]. Ros, O.; Vallejo, A.; Blanco-Zubiaguirre, L.; Olivares, M.; Delgado, A.; Etxebarria, N.; Prieto, A. Microextraction with polyethersulfone for bisphenol-a, alkylphenols and hormones determination in water samples by means of gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis. *Talanta* **2015**, *134*, 247–255.
- [100]. Arditsoglou, A.; Voutsas, D. Occurrence and partitioning of endocrine-disrupting compounds in the marine environment of Thermaikos Gulf, Northern Aegean Sea, Greece. *Mar. Pollut. Bull.* **2012**, *64*, 2443–2452.
- [101]. Zhang, Z.; Ren, N.; Kannan, K.; Nan, J.; Liu, L.; Ma, W.; Qi, H.; Li, Y. Occurrence of endocrine-disrupting phenols and estrogens in water and sediment of the Songhua River, Northeastern China. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2014**, *66*, 361–369.
- [102]. Feng, L.; Yang, G.; Zhu, L.; Xu, J.; Xu, X.; Chen, Y. Distribution and risk assessment of endocrine-disrupting pesticides in drinking water sources from agricultural watershed. *Water. Air. Soil Pollut.* **2016**, *227*, 23–32.
- [103]. Rocha, M. J.; Cruzeiro, C.; Reis, M.; Pardal, M. A.; Rocha, E. Pollution by oestrogenic endocrine disruptors and β -sitosterol in a South-Western European River (Mira, Portugal). *Environ. Monit. Assess.* **2016**, *188*, 240–254.

- [104]. Ribeiro, A. R.; Maia, A.; Santos, M.; Tiritan, M. E.; Rosa Ribeiro, C. M. Occurrence of natural contaminants of emerging concern in the Douro River Estuary, Portugal. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2016**, *70*, 361–371.
- [105]. Basheer, C.; Vetrichelvan, M.; Valiyaveetil, S.; Kee Lee, H. On-site polymer-coated hollow fiber membrane microextraction and gas chromatography–mass spectrometry of poly-chlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1139*, 157–164.
- [106]. Gottschall, N.; Topp, E.; Edwards, M.; Payne, M.; Kleywegt, S.; Lapen, D. R. Brominated flame retardants and perfluoroalkyl acids in groundwater, tile drainage, soil, and crop grain following a high application of municipal biosolids to a field. *Sci. Total Environ.* **2017**, *574*, 1345–1359.
- [107]. Fontana, A. R.; Silva, M. F.; Martinez, L. D.; Wuilloud, R. G.; Altamirano, J. C. Determination of polybrominated diphenyl ethers in water and soil samples by cloud point extraction-ultrasound-assisted back-extraction-gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 4339–4346.
- [108]. Fontana, A. R.; Wuilloud, R. G.; Martinez, L. D.; Altamirano, J. C. Simple approach based on ultrasound-assisted emulsification-microextraction for determination of polibrominated flame retardants in water samples by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 147–153.
- [109]. Qiu, X.; Zhu, T.; Hu, J. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and other flame retardants in the atmosphere and water from Taihu Lake, East China. *Chemosphere* **2010**, *80*, 1207–1212.
- [110]. Wang, X.; Xi, B.; Huo, S.; Sun, W.; Pan, H.; Zhang, J.; Ren, Y.; Liu, H. Characterization, treatment and releases of PBDEs and PAHs in a typical municipal sewage treatment plant situated beside an Urban River, East China. *J. Environ. Sci.* **2013**, *25*, 1281–1290.
- [111]. Cristale, J.; García Vazquez, A.; Barata, C.; Lacorte, S. Priority and emerging flame retardants in rivers: Occurrence in water and sediment,

- Daphnia magna toxicity and risk assessment. *Environ. Int.* **2013**, *59*, 232–243.
- [112]. Yu, B.; Zhang, R.; Liu, P.; Zhang, Y.; Zhang, Y.; Bai, Y. Determination of nine hydroxylated polybrominated diphenyl ethers in water by precolumn derivatization-gas chromatography mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1419*, 19–25.
- [113]. Chokwe, T. B.; Okonkwo, J. O.; Sibali, L. L.; Ncube, E. J. Alkylphenol ethoxylates and brominated flame retardants in water, fish (Carp) and sediment samples from the Vaal River, South Africa. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 11922–11929.
- [114]. Usman Khan, M.; Li, J.; Zhang, G.; Naseem, R. Malik first insight into the levels and distribution of flame retardants in potable water in Pakistan: An underestimated problem with an associated health risk diagnosis. *Sci. Total Environ.* **2016**, *565*, 346–359.
- [115]. Kim, U. J.; Lee, I. S.; Oh, J. E. Occurrence, removal and release characteristics of dissolved brominated flame retardants and their potential metabolites in various kinds of wastewater. *Environ. Pollut.* **2016**, *218*, 551–557.
- [116]. Sengupta, A.; Lyons, J. M.; Smith, D. J.; Drewes, J. E.; Snyder, S. A.; Heil, A.; Maruya, K. A. The occurrence and fate of chemicals of emerging concern in coastal Urban Rivers receiving discharge of treated municipal wastewater effluent. *Environ. Toxicol. Chem.* **2014**, *33*, 350–358.
- [117]. Maruya, K. A.; Dodder, N. G.; Sengupta, A.; Smith, D. J.; Lyons, J. M.; Heil, A. T.; Drewes, J. E. Multimedia screening of contaminants of emerging concern (CECS) in Coastal Urban Watersheds in Southern California (USA). *Environ. Toxicol. Chem.* **2016**, *35*, 1986–1994.
- [118]. EPA Method 1698. Steroids and Hormones in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HRGC/HRMS. **2007**.
- [119]. EPA Method 1699. Pesticides in Water, Soil, Sediment, Biosolids, and Tissue by HRGC/HRMS. **2007**.

- [120]. EPA Method 1614A. Brominated Diphenyl Ethers in Water, Soil, Sediment, and Tissue by HRGC/HRMS. **2010**.
- [121]. Pietrogrande, M. C.; Basaglia, G.; Dondi, F. Signal processing to evaluate parameters affecting SPE for multi-residue analysis of personal care products. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 1249–1261.
- [122]. Zhang, X.; Yao, Y.; Zeng, X.; Qian, G.; Guo, Y.; Wu, M.; Sheng, G.; Fu, J. Synthetic musks in the aquatic environment and personal care products in Shanghai, China. *Chemosphere* **2008**, *72*, 1553–1558.
- [123]. Langford, K. H.; Reid, M. J.; Fjeld, E.; Øxnevad, S.; Thomas, K. V. Environmental occurrence and risk of organic UV filters and stabilizers in multiple matrices in Norway. *Environ. Int.* **2015**, *80*, 1–7.
- [124]. Cunha, S. C.; Pena, A.; Fernandes, J. O. Dispersive liquid–liquid microextraction followed by microwave-assisted silylation and gas chromatography-mass spectrometry analysis for simultaneous trace quantification of bisphenol a and 13 ultraviolet filters in wastewaters. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1414*, 10–21.
- [125]. Nomngongo, P. N.; Ngila, J. C.; Msagati, T. A. M.; Gumbi, B. P.; Iwuoha, E. I. Determination of selected persistent organic pollutants in wastewater from landfill leachates, using an amperometric biosensor. *Phys. Chem. Earth* **2012**, *50–52*, 252–261.
- [126]. Hope, B. K.; Pillsbury, L.; Boling, B. A state-wide survey in Oregon (USA) of trace metals and organic chemicals in municipal effluent. *Sci. Total Environ.* **2012**, *417–418*, 263–272.
- [127]. Clara, M.; Windhofer, G.; Weilgony, P.; Gans, O.; Denner, M.; Chovanec, A.; Zessner, M. Identification of relevant micropollutants in Austrian municipal wastewater and their behaviour during wastewater treatment. *Chemosphere* **2012**, *87*, 1265–1272.
- [128]. Fernandez, M. P.; Noguero, T. N.; Lacorte, S.; Buchanan, I.; Piña, B. 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.* **2009**, *393*, 957–968.
- [129]. Avberšek, M.; Žegura, B.; Filipič, M.; Heath, E. Integration of GC-MSD and ER-Calux® Assay into a single protocol for determining steroid estrogens in environmental samples. *Sci. Total Environ.* **2011**, *409*, 5069–5075.
- [130]. Zhou, Y.; Zha, J.; Wang, Z. Occurrence and fate of steroid estrogens in the largest wastewater treatment plant in Beijing, China. *Environ. Monit. Assess.* **2012**, *184*, 6799–6813.
- [131]. Semra Can, Z.; Fırlak, M.; Kerç, A.; Evcimen, S. Evaluation of different wastewater treatment techniques in three WWTPs in Istanbul for the removal of selected EDCs in liquid phase. *Environ. Monit. Assess.* **2014**, *186*, 525–539.
- [132]. Chokwe, T. B.; Okonkwo, J. O.; Sibali, L. L.; Ncube, E. J. Optimization and simultaneous determination of alkyl phenol ethoxylates and brominated flame retardants in water after SPE and heptafluorobutyric anhydride derivatization followed by GC/MS. *Chromatogr* **2012**, *75*, 1165–1176.
- [133]. Metcalfe, C. D.; Kleywegt, S.; Letcher, R. J.; Topp, E.; Wagh, P.; Trudeau, V. L.; Moon, T. W. A multi-assay screening approach for assessment of endocrine-active contaminants in wastewater effluent samples. *Sci. Total Environ.* **2013**, *454–455*, 132–140.
- [134]. Serôdio, P.; Salomé Cabral, M.; Nogueira, J. M. F. Use of experimental design in the optimization of stir bar sorptive extraction for the determination of polybrominated diphenyl ethers in environmental matrices. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1141*, 259–270.
- [135]. Ka-Yi Li, M.; Lei, N. Y.; Gong, C.; Yu, Y.; Lam, K. H.; Hon-Wah Lam, M.; Yu, H.; Kwan-Sing Lam, P. An organically modified silicate molecularly imprinted solid-phase microextraction device for the determination of polybrominated diphenyl ethers. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *633*, 197–203.
- [136]. Rattfelt Nyholm, J.; Grabic, R.; Arp, H. P. H.; Moskeland, T.; Andersson, P. L. Environmental occurrence of emerging and legacy brominated flame

- retardants near suspected sources in Norway. *Sci. Total Environ.* **2013**, *443*, 307–314.
- [137]. Wild, S.; McLagan, D.; Schlabach, M.; Bossi, R.; Hawker, D.; Cropp, R.; King, C. K.; Stark, J. S.; Mondon, J.; Bengtson Nash, S. An antarctic research station as a source of brominated and perfluorinated persistent organic pollutants to the local environment. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, 103–112.
- [138]. Xiang, N.; Chen, L.; Meng, X. Z.; Li, Y. L.; Liu, Z.; Wu, B.; Dai, L.; Dai, X. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and dechlorane plus (DP) in a conventional wastewater treatment plant (WWTP) in Shanghai: Seasonal variations and potential sources. *Sci. Total Environ.* **2014**, *487*, 342–349.
- [139]. Li, B.; Sun, S. J.; Huo, C. Y.; Li, W. L.; Zhu, N. Z.; Qi, H.; Kong, L. J.; Li, Y. F.; Ma, W. L. Occurrence and fate of PBDEs and novel brominated flame retardants in a wastewater treatment plant in Harbin, China. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23*, 19246–19256.
- [140]. Deng, C.; Chen, Y.; Li, J.; Li, Y.; Li, H. Environmental pollution of polybrominated diphenyl ethers from industrial plants in China: A preliminary investigation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23*, 7012–7021.
- [141]. Deng, D.; Chen, H.; Tam, N. F. Y. Temporal and spatial contamination of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in wastewater treatment plants in Hong Kong. *Sci. Total Environ.* **2015**, *502*, 133–142.
- [142]. Hong, W. J.; Jia, H.; Ding, Y.; Li, W. L.; Li, Y. F. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and halogenated flame retardants (HFRs) in multi-matrices from an electronic waste (e-Waste) recycling site in Northern China. *J. Mater. Cycles Waste Manag.* **2018**, *20*, 80–90.
- [143]. Rosal, R.; Rodríguez, A.; Perdigón-Melón, J. A.; Petre, A.; García-Calvo, E.; Gómez, M. J.; Agüera, A.; Fernández-Alba, A. R. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Res.* **2010**, *44*, 578–588.
- [144]. Daso, A. P.; Fatoki, O. S.; Odendaal, J. P.; Olujimi, O. O. Occurrence of selected polybrominated diphenyl ethers and 2,2',4,4',5,5'-

- hexabromobiphenyl (BB-153) in sewage sludge and effluent samples of a wastewater-treatment plant in Cape Town, South Africa. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2012**, *62*, 391–402.
- [145]. Dimitriou-Christidis, P.; Bonvin, A.; Samanipour, S.; Hollender, J.; Rutler, R.; Westphale, J.; Gros, J.; Arey, J. S. GC x GC quantification of priority and emerging nonpolar halogenated micropollutants in all types of wastewater matrices: Analysis methodology, chemical occurrence, and partitioning. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, 7914–7925.
- [146]. Langford, K. H.; Thomas, K. V. Inputs of chemicals from recreational activities into the Norwegian coastal zone. *J. Environ. Monit.* **2008**, *10*, 894–898.
- [147]. Schurek, J.; Pulkrabova, J.; Hajslova, J.; Nazafarin, L.; Kovalczuk, T. Application potential of microextraction in packed syringe coupled with gas chromatography time-of-flight mass spectrometry in analysis of brominated flame retardants in waste water. Part 2. *J. Anal. Chem.* **2010**, *65*, 1545–1548.
- [148]. Prebihalo, S.; Brockman, A.; Cochran, J.; Dorman, F. L. Determination of emerging contaminants in wastewater utilizing comprehensive two-dimensional gas-chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1419*, 109–115.
- [149]. Fernandez, M. P.; Ikonomou, M. G.; Buchanan, I. An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters. *Sci. Total Environ.* **2007**, *373*, 250–269.
- [150]. Nelson, J.; Bishay, F.; van Roodselaar, A.; Ikonomou, M.; Law, F. C. P. The use of in vitro bioassays to quantify endocrine disrupting chemicals in municipal wastewater treatment plant effluents. *Sci. Total Environ.* **2007**, *374*, 80–90.
- [151]. Clarke, B. O.; Porter, N. A.; Symons, R. K.; Marriott, P. J.; Stevenson, G. J.; Blackbeard, J. R. Investigating the distribution of polybrominated diphenyl ethers through an Australian wastewater treatment plant. *Sci. Total Environ.* **2010**, *408*, 1604–1611.

- [152]. Rodil, R.; Benito Quintana, J.; López-Mahía, P.; Muniategui-Lorenzo, S.; Prada-Rodríguez, D. Multiclass determination of sunscreen chemicals in water samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1307–1315.
- [153]. Pedrouzo, M.; Borrull, F.; Marcé, R. M.; Pocurull, E. Stir-bar-sorptive extraction and ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for simultaneous analysis of UV filters and antimicrobial agents in water samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 2833–2839.
- [154]. Nguyen, K. T. N.; Scapolla, C.; Di Carro, M.; Magi, E. Rapid and selective determination of UV filters in seawater by liquid chromatography–tandem mass spectrometry combined with stir bar sorptive extraction. *Talanta* **2011**, *85*, 2375–2384.
- [155]. Gago-Ferrero, P.; Mastroianni, N.; Díaz-Cruz, M. S.; Barcelo, D. Fully automated determination of nine ultraviolet filters and transformation products in natural waters and waste- waters by on-line solid phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1294*, 106–116.
- [156]. Grabicova, K.; Fedorova, G.; Burkina, V.; Steinbach, C.; Schmidt-Posthaus, H.; Zlabek, V.; Kocour Kroupova, H.; Grabic, R.; Randak, T. Presence of UV filters in surface water and the effects of phenylbenzimidazole sulfonic acid on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following a chronic toxicity test. *Ecotox. Environ. Safety* **2013**, *96*, 41–47.
- [157]. Tsui, M. M. P.; Leung, H. W.; Wai, T.-C.; Yamashita, N.; Taniyasu, S.; Liu, W.; Lam, P. K. S.; Murphy, M. B. Occurrence, distribution and ecological risk assessment of multiple classes of UV filters in surface waters from different countries. *Water Res.* **2014**, *67*, 55–65.
- [158]. Jurado, A.; Gago-Ferrero, P.; Vázquez-Suñé, E.; Carrera, J.; Pujades, E.; Díaz-Cruz, M. S.; Barceló, D. Urban ground water contamination by residues of UV filters. *J. Hazard. Mater.* **2014**, *271*, 141–149.

- [159]. Negreira, N.; Rodríguez, I.; Ramil, M.; Rubí, E.; Cela, R. Solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of hydroxylated benzophenone UV absorbers in environmental water samples. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *654*, 162–170.
- [160]. Pedrouzo, M.; Borrull, F.; Marcé, R. M.; Pocurull, E. Ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for determining the presence of eleven personal care products in surface and wastewaters. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 6994–7000.
- [161]. Ahrens, L.; Felizeter, S.; Sturm, R.; Xie, Z.; Ebinghaus, R. Polyfluorinated compounds in waste water treatment plant effluents and surface waters along the River Elbe, Germany. *Mar. Pollut. Bull.* **2009**, *58*, 1326–1333.
- [162]. Rodil, R.; Benito Quintana, J.; López-Mahía, P.; Muniategui-Lorenzo, S.; Prada-Rodríguez, D. Multi-residue analytical method for the determination of emerging pollutants in water by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 2958–2969.
- [163]. Fairbairn, D. J.; Ekrem Karpuzcu, M.; Arnold, W. A.; Barber, B. L.; Kaufenberg, E. F.; Koskinen, W. C.; Novak, P. J.; Rice, P. J.; Swackhamer, D. L. Sediment–water distribution of contaminants of emerging concern in a mixed-use watershed. *Sci. Total Environ.* **2015**, *505*, 896–904.
- [164]. Rozas, O.; Vidal, C.; Baeza, C.; Jardim, W. F.; Rossner, A.; Mansilla, H. D. Organic micropollutants (OMPs) in natural waters: Oxidation by UV/H₂O₂ treatment and toxicity assessment. *Water Res.* **2016**, *98*, 109–118.
- [165]. Bayen, S.; Yi, X.; Segovia, E.; Zhou, Z.; Kelly, B. C. Analysis of selected antibiotics in surface freshwater and seawater using direct injection in liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1338*, 38–43.
- [166]. Jiang, J. J.; Lee, C. L.; Fang, M. D. Emerging organic contaminants in coastal waters: Anthropogenic impact, environmental release and ecological risk. *Mar. Pollut. Bull.* **2014**, *85*, 391–399.

- [167]. González-Mariño, I.; Quintana, J. B.; Rodríguez, I.; Cela, R. Simultaneous determination of parabens, triclosan and triclocarban in water by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 1756–1766.
- [168]. Machado, K. C.; Grassi, M. T.; Vidal, C.; Pescara, I. C.; Jardim, W. F.; Fernandes, A. N.; Sodre, F. F.; Almeida, F. V.; Santana, J. S.; Canela, M. C.; et al. A preliminary nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source waters in Brazil. *Sci. Total Environ.* **2016**, *572*, 138–146.
- [169]. Gorga, M.; Insa, S.; Petrovic, M.; Barcelo, D. Occurrence and spatial distribution of EDCs and related compounds in waters and sediments of Iberian rivers. *Sci. Total Environ.* **2015**, *503–504*, 69–86.
- [170]. Martín, J.; Santos, J. L.; Aparicio, I.; Alonso, E. Determination of hormones, a plasticizer, preservatives, per-fluoroalkylated compounds, and a flame retardant in water samples by ultra- sound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction based on the solidification of a floating organic drop. *Talanta* **2015**, *143*, 335–343.
- [171]. Martín, J.; Camacho-Muñoz, D.; Santos, J. L.; Aparicio, I.; Alonso, E. Determination of priority pollutants in aqueous samples by dispersive liquid–liquid microextraction. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *773*, 60–67.
- [172]. Aparicio, I.; Martín, J.; Santos, J. L.; Malvar, J. L.; Alonso, E. 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* **2017**, *1500*, 43–52.
- [173]. Chen, C. Y.; Wen, T. Y.; Wang, G. S.; Cheng, H. W.; Lin, Y. H.; Lien, G. W. 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.* **2007**, *378*, 352–365.

- [174]. Vulliet, E.; Wiest, L.; Baudot, R.; Grenier-Loustalot, M. F. Multi-residue analysis of steroids at sub-Ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr A* **2008**, *1210*, 84–91.
- [175]. Pedrouzo, M.; Borrull, F.; Pocurull, E.; Marce, R. M. Estrogens and their conjugates: Determination in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta* **2009**, *78*, 1327–1331.
- [176]. Backe, W. J.; Ort, C.; Brewer, A. J.; Field, J. A. Analysis of androgenic steroids in environmental waters by large-volume injection liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 2622–2630.
- [177]. Miège, C.; Karolak, S.; Gabet, V.; Jugan, M.-L.; Oziol, L.; Chevreuil, M.; Levi, Y.; Coquery, M. Evaluation of estrogenic disrupting potency in aquatic environments and Urban waste-waters by combining chemical and biological analysis. *Trends Anal. Chem.* **2009**, *28*, 186–195.
- [178]. Miège, C.; Bados, P.; Brosse, C.; Coquery, M. Method validation for the analysis of estrogens (including conjugated compounds) in aqueous matrices. *Trends Anal. Chem.* **2009**, *28*, 237–244.
- [179]. Minh Pham, H. T.; Chamas, A.; Nieter, A.; Giersberg, M.; Rutten, T.; Gehrmann, L.; Hettwer, K.; Tuerk, J.; Uhlig, S.; Simon, K.; et al. Determination of glucocorticoids using photometric (A-YGS) and spectrofluorometric (A-YGFS) bio-assays based on modified *Arxula adenivorans* cells: Applications in environmental analysis. *Sens. Actuat. B* **2016**, *223*, 540–549.
- [180]. Kim, S. D.; Cho, J.; Kim, I. S.; Vanderford, B. J.; Snyder, S. A. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water Res.* **2007**, *41*, 1013–1021.
- [181]. Petrie, B.; Youdan, J.; Barden, R.; Kasprzyk-Hordern, B. 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* **2016**, 1431, 64–78.
- [182]. Esteban, S.; Gorga, M.; Petrovic, M.; González-Alonso, S.; Barceló, D.; Valcárcel, Y. Analysis and occurrence of endocrine-disrupting compounds and estrogenic activity in the surface waters of Central Spain. *Sci. Total Environ.* **2014**, 466–467, 939–951.
- [183]. Carvalho, A. R. M.; Cardoso, V. V.; Rodrigues, A.; Ferreira, E.; Benoliel, M. J.; Duarte, E. A. Occurrence and analysis of endocrine-disrupting compounds in a water supply system. *Environ. Monit. Assess.* **2015**, 187, 139–147.
- [184]. Chang, H.; Wu, F.; Jin, F.; Feng, C.; Zhao, X.; Liao, H. Picogram per liter level determination of hydroxylated poly- brominated diphenyl ethers in water by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2012**, 1223, 131–135.
- [185]. Kerrigan, J. F.; Engstrom, D. R.; Yee, D.; Sueper, C.; Erickson, P. R.; Grandbois, M.; McNeill, K.; Arnold, W. A. Quantification of hydroxylated polybrominated diphenyl ethers (OH-BDEs), triclosan, and related compounds in freshwater and coastal systems. *PLOS One* **2015**, 10, e0138805.
- [186]. EPA Method 1694. Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/ MS/MS. **2007**.
- [187]. Kasprzyk-Hordern, B.; Dinsdale, R. M.; Guwy, A. J. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Res.* **2008**, 42, 3498–3518.
- [188]. You, L.; Tung Nguyen, V.; Pal, A.; Che, H.; He, Y.; Reinhard, M.; Gin, K. Y. H. Investigation of pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting chemicals in a tropical Urban catchment and the influence of environmental factor. *Sci. Total Environ.* **2015**, 536, 955–963.
- [189]. Zenobio, J. E.; Sanchez, B. C.; Leet, J. K.; Archuleta, L. C.; Sepulveda, M. S. Presence and effects of pharmaceutical and personal care products on

- the Baca National Wildlife Refuge, Colorado. *Chemosphere* **2015**, *120*, 750–755.
- [190]. Dai, G.; Wang, B.; Huang, J.; Dong, R.; Deng, S.; Yu, G. Occurrence and source apportionment of pharmaceuticals and personal care products in the Beiyun River of Beijing, China. *Chemosphere* **2015**, *119*, 1033–1039.
- [191]. Wang, C.; Shi, H.; Adams, C. D.; Gamagedara, S.; Stayton, I.; Timmons, T.; Ma, Y. Investigation of pharmaceuticals in Missouri natural and drinking water using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Water Res.* **2011**, *45*, 1818–1828.
- [192]. Pailler, J. Y.; Krein, A.; Pfister, L.; Hoffmann, L.; Guignard, C. Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg. *Sci. Total Environ.* **2009**, *407*, 4736–4743.
- [193]. Ferrer, I.; Zweigenbaum, J. A.; Thurman, E. M. Analysis of 70 environmental protection agency priority pharmaceuticals in water by EPA Method 1694. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 5674–5686.
- [194]. Nebot, C.; Falcon, R.; Boyd, K. G.; Gibb, S. W. Introduction of human pharmaceuticals from wastewater treatment plants into the aquatic environment: A rural perspective. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 10559–10568.
- [195]. Grabicova, K.; Grabic, R.; Blaha, M.; Kumar, V.; Cerveny, D.; Fedorova, G.; Randak, T. Presence of pharmaceuticals in Benthic Fauna living in a small stream affected by effluent from a municipal sewage treatment plant. *Water Res.* **2015**, *72*, 145–153.
- [196]. Andreu, V.; Gimeno-García, E.; Pascual, J. A.; Vazquez-Roig, P.; Pico, Y. Presence of pharmaceuticals and heavy metals in the waters of a Mediterranean Coastal Wetland: Potential interactions and the influence of the environment. *Sci. Total Environ.* **2016**, *540*, 278–286.
- [197]. Garrido, E.; Camacho-Muñoz, D.; Martín, J.; Santos, A.; Luis Santos, J.; Aparicio, I.; Alonso, E. Monitoring of emerging pollutants in Guadiamar

- River Basin (South of Spain): Analytical method, spatial distribution and environmental risk assessment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23*, 25127–25144.
- [198]. Comtois-Marotte, S.; Chappuis, T.; Vo Duy, S.; Gilbert, N.; Lajeunesse, A.; Taktek, S.; Desrosiers, M.; Veilleux, E.; Sauv, S. Analysis of emerging contaminants in water and solid samples using high resolution mass spectrometry with a Q exactive orbital ion trap and estrogenic activity with YES-assay. *Chemosphere* **2017**, *166*, 400–411.
- [199]. Wille, K.; Noppe, H.; Verheyden, K.; Vanden Bussche, J.; De Wulf, E.; Van Caeter, P.; Janssen, C. R.; De Brabander, H. F.; Vanhaecke, L. Validation and application of an LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 13 pharmaceuticals in seawater. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 1797–1808.
- [200]. Magnér, J.; Filipovic, M.; Alsberg, T. Application of a novel solid-phase-extraction sampler and ultra-performance liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry for determination of pharmaceutical residues in surface sea water. *Chemosphere* **2010**, *80*, 1255–1260.
- [201]. Agunbiade, F. O.; Moodley, B. Occurrence and distribution pattern of acidic pharmaceuticals in surface water, wastewater, and sediment of the Msunduzi River, Kwazulu-Natal, South Africa. *Environ. Toxicol. Chem.* **2016**, *35*, 36–46.
- [202]. Torres Padrón, M. E.; Sosa Ferrera, Z.; Santana Rodríguez, J. J. Coupling of solid-phase microextraction with micellar desorption and high performance liquid chromatography for the determination of pharmaceutical residues in environmental liquid samples. *Biomed. Chromatogr.* **2009**, *23*, 1175–1185.
- [203]. Ye, L.; Liu, J.; Yang, X.; Peng, Y.; Xu, L. Orthogonal array design for the optimization of ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction of benzophenone-type UV filters. *J. Sep. Sci.* **2011**, *34*, 700–706.

- [204]. Benedé, J. L.; Chisvert, A.; Giokas, D. L.; Salvador, A. Stir bar sorptive-dispersive microextraction mediated by magnetic nanoparticles nylon 6 composite for the extraction of hydrophilic organic compounds in aqueous media. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *926*, 63–71.
- [205]. López-Darias, J.; Germán-Hernández, M.; Pino, V.; Afonso, A. M. Dispersive liquid–liquid microextraction versus single-drop microextraction for the determination of several endocrine-disrupting phenols from seawaters. *Talanta* **2010**, *80*, 1611–1618.
- [206]. K'oreje, K. O.; Vergeynst, L.; Ombaka, D.; De Wispelaere, P.; Okoth, M.; Van Langenhove, H.; Demeestere, K. Occurrence patterns of pharmaceutical residues in wastewater, surface water and groundwater of Nairobi and Kisumu City, Kenya. *Chemosphere* **2016**, *149*, 238–244.
- [207]. Otieno K'oreje, K.; Demeestere, K.; De Wispelaere, P.; Vergeynst, L.; Dewulf, J.; Van Langenhove, H. From multi-residue screening to target analysis of pharmaceuticals in water: development of a new approach based on magnetic sector mass spectrometry and application in the Nairobi River Basin, Kenya. *Sci. Total Environ.* **2012**, *437*, 153–164.
- [208]. Ferrer, I.; Thurman, E. M. Analysis of 100 pharmaceuticals and their degradates in water samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1259*, 148–157.
- [209]. Valcárcel, Y.; Gonzalez Alonso, S.; Rodríguez-Gil, J. L.; Maroto, R. R.; Gil, A.; Catalá, M. Analysis of the presence of cardiovascular and analgesic/anti-inflammatory/antipyretic pharmaceuticals in river- and drinking-water of the Madrid Region in Spain. *Chemosphere* **2011**, *82*, 1062–1071.
- [210]. Stipaničev, D.; Dragun, Z.; Repec, S.; Rebok, K.; Jordanova, M. Broad spectrum screening of 463 organic contaminants in rivers in Macedonia. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **2017**, *135*, 48–59.
- [211]. Viglino, L.; Aboulfadl, K.; Prévost, M.; Sauve, S. Analysis of natural and synthetic estrogenic endocrine disruptors in environmental waters using

- online preconcentration coupled with LC-APPI-MS/MS. *Talanta* **2008**, *76*, 1088–1096.
- [212]. 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.
- [213]. Bacaloni, A.; Callipo, L.; Corradini, E.; Giansanti, P.; Gubbiotti, R.; Samperi, R.; Lagana, A. Liquid chromatography–negative ion atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometry for the determination of brominated flame retardants in environmental water and industrial effluents. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 6400–6409.
- [214]. Daneshvar, A.; Aboulfadl, K.; Viglino, L.; Broséus, R.; Sauvé, S.; Madoux-Humery, A. S.; Weyhenmeyer, G. A.; Prévost, M. Evaluating pharmaceuticals and caffeine as indicators of fecal contamination in drinking water sources of the Greater Montreal Region. *Chemosphere* **2012**, *88*, 131–139.
- [215]. Lisboa, N. S.; Fahning, C. S.; Cotrim, G.; dos Anjos, J. P.; de Andrade, J. B.; Hatje, V.; da Rocha, G. O. A simple and sensitive UFLC-fluorescence method for endocrine disruptors determination in marine waters. *Talanta* **2013**, *117*, 168–175.
- [216]. Alidina, M.; Hoppe-Jones, C.; Yoon, M.; Hamadeh, A. F.; Li, D.; Drewes, J. E. The occurrence of emerging trace organic chemicals in wastewater effluents in Saudi Arabia. *Sci. Total Environ.* **2014**, *478*, 152–162.
- [217]. Klein, D. R.; Flannelly, D. F.; Schultz, M. M. Quantitative determination of triclocarban in wastewater effluent by stir bar sorptive extraction and liquid desorption–liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 1742–1747.
- [218]. Chen, H. W.; Liang, C. H.; Wu, Z. M.; Chang, E. E.; Lin, T. F.; Chiang, P. C.; Wang, G. S. Occurrence and assessment of treatment efficiency of

- nonylphenol, octylphenol and bisphenol-a in drinking water in Taiwan. *Sci. Total Environ.* **2013**, *449*, 20–28.
- [219]. Griffith, D. R.; Kido Soule, M. C.; Matsufuji, H.; Eglinton, T. I.; Kujawinski, E. B.; Gschwend, P. M. Measuring free, conjugated, and halogenated estrogens in secondary treated waste-water effluent. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 2569–2578.
- [220]. Hensley, R. N.; Kerrigan, J. F.; Pang, H.; Erickson, P. R.; Grandbois, M.; McNeill, K.; Arnold, W. A. Triclosan, chlorinated triclosan derivatives, and hydroxylated polybrominated diphenyl ethers (OH-BDEs) in wastewater effluents. *Environ. Sci: Water Res. Technol.* **2015**, *1*, 316–325.
- [221]. Vulliet, E.; Cren-Olivé, C.; Grenier-Loustalot, M. F. Occurrence of pharmaceuticals and hormones in drinking water treated from surface waters. *Environ. Chem. Lett.* **2011**, *9*, 103–114.
- [222]. Ningsun Zhou, S.; Reiner, E. J.; Marvin, C.; Helm, P.; Riddell, N.; Dorman, F.; Misselwitz, M.; Shen, L.; Crozier, P.; MacPherson, K.; et al. Development of liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry for analysis of halogenated flame retardants in waste-water. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *396*, 1311–1320.
- [223]. Woudneh, M. B.; Benskin, J. P.; Wang, G.; Grace, R.; Coreen Hamilton, M.; Cosgrove, J. R. 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* **2015**, *1400*, 149–155.
- [224]. Papageorgiou, M.; Kosma, C.; Lambropoulou, D. Seasonal occurrence, removal, mass loading and environmental risk assessment of 55 pharmaceuticals and personal care products in a municipal wastewater treatment plant in Central Greece. *Sci. Total Environ.* **2016**, *543*, 547–569.
- [225]. Langford, K. H.; Thomas, K. V. Determination of pharmaceutical compounds in hospital effluents and their contribution to wastewater treatment works. *Environ. Int.* **2009**, *35*, 766–770.

- [226]. Ort, C.; Lawrence, M. G.; Reungoat, J.; Eaglesham, G.; Carter, S.; Keller, J. Determining the fraction of pharmaceutical residues in wastewater originating from a hospital. *Water Res.* **2010**, *44*, 605–615.
- [227]. Silva, A. R. M.; Nogueira, J. M. F. New approach on trace analysis of triclosan in personal care products, biological and environmental matrices. *Talanta* **2008**, *74*, 1498–1504.
- [228]. Schreder, E. D.; La Guardia, M. J. Flame retardant transfers from U.S. households (dust and laundry wastewater) to the aquatic environment. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 11575–11583.
- [229]. Chaves, A. R.; Leandro, F. Z.; Carris, J. A.; Queiroz, M. E. C. Microextraction in packed sorbent for analysis of antidepressants in human plasma by liquid chromatography and spectrophotometric detection. *J. Chromatogr. B* **2010**, *878*, 2123–2129.
- [230]. Rocha-Gutierrez, B.; Lee, W. Y. Investigation of polybrominated diphenyl ethers in wastewater treatment plants along the U.S. and Mexico border: A trans-boundary study. *Water, Air, Soil Pollut.* **2013**, *224*, 1398–1411.
- [231]. Su, S.; Chen, B.; He, M.; Xiao, Z.; Hu, B. A novel strategy for sequential analysis of gold nanoparticles and gold ions in water samples by combining magnetic solid phase extraction with inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. Atom. Spectrom.* **2014**, *29*, 444–453.
- [232]. Popp, M.; Hann, S.; Koellensperger, G. Environmental application of elemental speciation analysis based on liquid or gas chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry – A review. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *668*, 114–129.
- [233]. Proulx, K.; Wilkinson, K. J. Separation, detection and characterization of engineered nanoparticles in natural waters using hydrodynamic chromatography and multi-method detection (light scattering, analytical ultracentrifugation and single particle ICP-MS). *Environ. Chem.* **2014**, *11*, 392–401.

3. DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES EN LODOS DE DEPURADORA. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS

3.1. Introducción

En los últimos años, el continuo desarrollo industrial ha propiciado la generación de una amplia variedad de nuevas sustancias químicas empleadas en las prácticas antropogénicas cotidianas. Estas sustancias, que van desde compuestos orgánicos e inorgánicos hasta nanopartículas, se consideran contaminantes y representan un motivo de preocupación para la sociedad [101]. Varias familias de compuestos, como los productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs), los retardantes de llama, las nanopartículas o los disruptores endocrinos (EDCs), entre muchas sustancias, forman este grupo heterogéneo, a menudo denominado "contaminantes emergentes". Estas sustancias son ubicuas y presentan riesgos potenciales para la salud humana y el medio ambiente, aunque sus efectos toxicológicos aún no se conocen completamente en muchos casos [134]. Sin embargo, la investigación ha determinado que la exposición prolongada a los EDCs, incluidos los alquilfenoles (APs), los ftalatos, los parabenos (PBs) o el bisfenol A (BPA) provoca trastornos en el desarrollo normal y el sistema reproductivo de la vida silvestre y los seres humanos [14, 72, 103]. Éteres de difenilo polibromados (PBDEs) utilizados en espumas, resinas y adhesivos entre otros materiales; o PPCPs causan neurotoxicidad y alteran la función normal del sistema endocrino [21, 76, 91, 105]. Las nanopartículas (NPs) contenidas en muchos productos industriales y de consumo, especialmente las nanopartículas de metal como las nanopartículas de plata (AgNPs) o las nanopartículas de óxido de zinc (ZnONPs), causan citotoxicidad y potencialmente daño celular [16, 143].

La mejora en la calidad de vida, la modernización y la expansión urbana han causado un notable aumento en la generación de residuos globales derivados de actividades cotidianas, turísticas, residenciales e industriales [101]. Las plantas de tratamiento de aguas (EDAR) no están debidamente dimensionadas ni equipadas para eliminar la multitud de contaminantes emergentes con propiedades químicas muy diferentes, contenidos en las aguas

residuales domésticas e industriales a niveles traza (rango de $\mu\text{g L}^{-1}$ e inferior). Además, la eliminación insuficiente de estas sustancias conduce a la descarga al efluente acuoso, lo que da como resultado la contaminación de los medios acuáticos; o adsorción al lodo [65]. Los lodos de depuradora son el subproducto resultante de los procesos de tratamiento que se producen en las EDAR. Puede contener microorganismos separados de la fase líquida, así como un amplio espectro de sustancias orgánicas e inorgánicas [31]. Si bien existen varias rutas de disposición de los lodos de depuradora (incineración, vertedero, compostaje, etc.), la mayoría de ellas dan como resultado la deposición de los lodos tratados o no tratados en el medio ambiente, con los consiguientes riesgos ecotoxicológicos potenciales [101, 171]. La deposición de lodos en tierras agrícolas está asociada con efectos peligrosos para el medio ambiente y la salud humana. La contaminación del agua subterránea por lixiviación o escorrentías terrestres genera indirectamente un riesgo para la salud humana a través de la cadena alimentaria debido al agua de consumo humano o a la ingesta de cultivos contaminados [65].

La aplicación al suelo de lodos de depuradora con fines agrícolas es el método más extendido para su eliminación, debido a su bajo costo económico y ventajas biológicas para el suelo [34]. La producción total de lodos EDAR municipales en la Unión Europea en 2015 fue de 9.4 millones de toneladas, de las cuales el 39.6% se recicló con fines agrícolas, mientras que el 60.4% restante se depositó en vertederos o se utilizó para compost y otras aplicaciones. Estas cifras han disminuido ligeramente desde 2010, año en el que la producción total de lodos alcanzó los 9.7 millones de toneladas en la UE, de las cuales el 45.2% se aplicó a la tierra. Los mayores productores de lodos siguen siendo Alemania, España, Reino Unido y Francia [131]. Las Directivas Europeas [38] fomentan la reutilización de los lodos de depuradora para evitar una mayor contaminación del medio acuático y fomentar una gestión eficiente de los lodos. Para este objetivo, los límites en la concentración de metales y nutrientes presentes en los lodos han sido establecidos por la legislación de la UE [37] y la legislación española [124]. Algunos contaminantes emergentes se han detectado y medido en lodos de depuradora digeridos durante varios años [61, 151, 153]. Actualmente, no existen regulaciones para la presencia de estos contaminantes

en los lodos de depuradora, aunque un documento de trabajo en curso que contiene valores límite para las concentraciones de siete grupos de contaminantes orgánicos (11 hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs); sulfonatos de alquilbenceno lineales (LAS); bis(2-etilhexil) ftalato (DEHP); etoxilatos de nonilfenol (NPEs); compuestos orgánicos halogenados (AOX); y 7 bifenilos policlorados (PCBs), así como dibenzofuranos (PCDD/F) y dibenzodioxinas policloradas, es decir, dioxinas cloradas y furanos) se encuentra bajo revisión por la Comisión Europea [49, 70].

Analizar contaminantes emergentes en lodos de depuradora es una tarea difícil. El lodo es una matriz altamente compleja en la que los contaminantes se encuentran a menudo en niveles traza y fuertemente adsorbidos, razón por la cual no han estado biodisponibles y han resistido los procesos de biodegradación a los que han sido sometidos. La intensidad de la señal del instrumento analítico puede suprimirse en la interfaz del sistema cuando varios componentes de la matriz coeluyen, lo que daría lugar a una estimación errónea de las concentraciones reales, especialmente con LC-MS/MS [129]. Asimismo, las bajas concentraciones a las que se encuentran los compuestos en el lodo hacen que el desarrollo de un método de pretratamiento eficiente para extraer los contaminantes sea extremadamente difícil [86, 87, 113]. Como resultado, es necesario desarrollar métodos sensibles y sólidos para la determinación de una amplia variedad de contaminantes emergentes en los lodos de depuradora.

En los últimos años se han publicado varios trabajos sobre contaminantes emergentes y su presencia en lodos de depuradora [22, 43, 64, 121, 151, 157, 163, 171]. La mayor parte de la literatura se centra en un número seleccionado de compuestos o familias de compuestos. Zuloaga y col. [171] revisaron exhaustivamente con minucioso detalle las principales técnicas de extracción, procedimientos de limpieza y técnicas instrumentales para el análisis de contaminantes emergentes hasta 2012. Sin embargo, no se brinda información sobre el análisis de nanopartículas en lodos de depuradora. El objetivo de esta revisión es proporcionar una actualización sobre los procedimientos de extracción, limpieza y técnicas instrumentales de contaminantes emergentes

en muestras sólidas (biosólidos y lodos de depuradora) recolectadas de diferentes EDAR o alrededores desde 2012 en adelante. Debido a la falta de información analítica previa sobre nanopartículas en este tipo de matriz, se seleccionaron 10 años de literatura para estos compuestos. En este estudio se presenta en primer lugar una introducción de los compuestos de interés, así como una visión general del proceso de recogida de las muestras (muestreo, transferencia de muestras, conservación de muestras) y los principales procedimientos seguidos para el pretratamiento de las muestras de lodos. El enfoque del estudio se coloca en las técnicas actuales de preparación de muestras, los procedimientos de limpieza y las técnicas instrumentales empleadas para múltiples clases de contaminantes emergentes.

3.2. Compuestos de interés

Los compuestos seleccionados para la revisión fueron elegidos en base a sus riesgos potenciales y su frecuencia de aparición cada vez mayor en los lodos de depuradora.

3.2.1. Retardantes de llama

Los retardantes de llama bromados (BFRs) son sustancias químicas organobromados que reducen la inflamabilidad de los productos [84]. Entre las diversas clases de BFRs, los compuestos más difundidos en la producción industrial son los PBDEs. Esos son retardantes de llama aditivos que se pueden encontrar en una gran variedad de bienes de consumo, incluidos ordenadores, plásticos o textiles [80, 161].

Los PBDEs son sustancias hidrófobas que tienen una alta persistencia. Por lo tanto, son propensos a bioacumularse en todos los campos ambientales, presentando riesgos para los ecosistemas y la salud humana [58, 105, 146]. Se han comercializado tres mezclas comerciales de PBDE: pentabromodifeniléter (pentaBDE), octabromodifeniléter (octaBDE) y decabromodifeniléter (decaBDE) [2]. Sin embargo, debido a sus propiedades peligrosas, el pentaBDE y el octaBDE han sido catalogados como contaminantes orgánicos persistentes (COP) en el Convenio de Estocolmo en 2009 y desde entonces su producción y

uso han sido eliminados en la Unión Europea (UE) y América del Norte [135]. En 2013, las empresas estadounidenses eliminaron gradualmente la producción de decaBDEs [146]. Además, el decaBDE se ha incluido recientemente en el anexo XVII del Reglamento REACH, donde se especifica que la producción, el uso o la comercialización de decaBDE se restringirá después del 2 de marzo de 2019 [50].

Los PBDEs ingresan a las plantas de tratamiento de aguas residuales a través de la eliminación de aguas residuales humanas debido al lavado de mantas, alfombras o aguas grises; lixiviados de productos que contienen PBDE depositados en vertederos y agua de descarga de material industrial que contiene PBDEs [80, 146]. Los procesos de tratamiento de aguas residuales a menudo no están diseñados de manera eficaz para eliminar los PBDE del agua [80]. Estos compuestos tienen baja solubilidad en agua y biodegradabilidad limitada, con coeficientes de partición octanol-agua ($\log K_{ow}$) y coeficientes de carbono orgánico-agua del suelo ($\log K_{oc}$) más altos que otros contaminantes emergentes clásicos. Por ejemplo, los $\log K_{ow}$ y $\log K_{oc}$ para PBDEs varían de 5 a 7 [48], mientras que los valores de EDCs como estradiol o BPA son significativamente más bajos (3-4 para estos ejemplos). Por consiguiente, los PBDEs se absorben rápidamente a materia orgánica y particulada, siendo más probable que se encuentren y se dividan en los lodos de depuradora en las EDAR [36]. Por lo tanto, los PBDEs se introducen en el medio ambiente mediante la aplicación de biosólidos al suelo [34, 60]. Los PBDEs también podrían difundirse a los ambientes acuáticos a través de la escorrentía de suelos contaminados [112]. Sin embargo, los lodos de depuradora y los biosólidos son matrices complejas en las que los niveles de sustancias químicas orgánicas como los PBDEs pueden variar según las diferentes fuentes geográficas de descarga de aguas residuales [80]. La exposición humana a los PBDEs ocurre normalmente debido a la inhalación o transferencia trófica, principalmente a través del pescado y el marisco contaminado a través de lodos de aguas residuales [106]. Los posibles efectos adversos para la salud de estos productos químicos incluyen trastornos de la hormona tiroidea o problemas del desarrollo neurológico. Además, los grupos sensibles de la población, como las mujeres embarazadas o los lactantes, son más susceptibles a estos efectos [76,

105]. Debido a sus propiedades peligrosas y sus posibles impactos negativos en la salud humana, los PBDE se consideran contaminantes emergentes y se han convertido en una preocupación creciente en los últimos años.

3.2.2. Fármacos y productos de cuidado personal

Los PPCPs consisten en un grupo grande y único de sustancias orgánicas que incluyen productos de cuidado personal diario (PCPs), medicamentos farmacéuticos, medicamentos veterinarios y más. Los PCPs incluyen fragancias (por ejemplo, almizcles policíclicos), protectores solares (filtros UV), repelentes de insectos o productos cosméticos; mientras que entre los fármacos considerados se encuentran antibióticos, hormonas, β -bloqueadores o reguladores de lípidos en sangre entre muchos otros [39].

Los PPCPs involucran una amplia variedad de productos químicos con propiedades químicas significativamente diversas. Una gran cantidad de estos compuestos tienen alta polaridad y baja volatilidad y se pueden encontrar en medios acuáticos, por lo tanto, una de las principales vías de contaminación ambiental por los PPCPs es a través del efluente de aguas residuales de las EDAR. Su uso generalizado ha llevado a que estas sustancias se vuelvan omnipresentes en el medio ambiente [125]. Además, las plantas de tratamiento de aguas residuales convencionales a menudo son incapaces de eliminar los PPCPs [91, 155]. Algunos PPCPs no se disocian en el agua de manera significativa, teniendo valores de K_{ow} superiores a 3 para naproxeno o ibuprofeno, por ejemplo, y valores de K_{oc} superiores a 2 para otros compuestos como tiamulina o indometacina [122, 152]. Por lo tanto, la eliminación incompleta de estos compuestos produce eficiencias de eliminación variables que, en última instancia, dan como resultado la detección de varias clases de PPCPs en concentraciones de $\mu\text{g kg}^{-1}$ o mg kg^{-1} en el lodo [56].

La introducción de los PPCPs en el medio ambiente se produce a través de vías directas e indirectas [111]. La descarga directa de aguas residuales procedente de hospitales, industrias y hogares contiene con frecuencia altas concentraciones de PPCPs [39]. Estos compuestos luego se procesan de manera ineficaz en EDAR y pueden adsorberse en el lodo, que contaminará la

tierra agrícola por ejemplo. Los PPCPs también pueden pasar al suelo mediante el riego con aguas residuales tratadas o no tratadas. Además, los PPCPs pueden llegar a las aguas subterráneas mediante lixiviación, filtración en bancos o deposición atmosférica húmeda [91, 125, 155].

Los compuestos fenólicos farmacéuticamente activos o los estrógenos esteroides (naturales o sintéticos) pueden interferir con el sistema endocrino en concentraciones bajas y causar anomalías en el desarrollo o disminución de la fecundidad, entre otros efectos [21]. Otro efecto peligroso provocado por la exposición persistente a los PPCPs es la posible aparición de bacterias resistentes. Igualmente, la acción combinada de varios productos químicos podría producir más efectos sinérgicos no deseados [42]. Dada la presencia constante de PPCPs en la vida diaria y sus riesgos potenciales para la vida silvestre y los seres humanos, estos compuestos se han considerado contaminantes emergentes.

3.2.3. *Disruptores endocrinos químicos*

Los EDCs son un grupo de sustancias químicas estructuralmente diversas que pueden afectar el sistema endocrino de los seres humanos y la vida silvestre al alterar la función normal de las hormonas [24, 42]. En el Programa Internacional de Seguridad Química, la Organización Mundial de la Salud describió un compuesto disruptor endocrino como "*una sustancia o mezcla exógena que altera la función o funciones del sistema endocrino y, en consecuencia, causa efectos adversos para la salud en un organismo intacto o en su progenie, o (sub) poblaciones*" [71]. Los EDCs interfieren con la unión del receptor y el metabolismo de las hormonas a través de los receptores de hormonas nucleares, los receptores no esteroides, las vías metabólicas y biosintéticas de los esteroides y los receptores [42, 123, 128].

Este grupo de productos químicos es muy heterogéneo e incluye compuestos naturales como lignanos, cumestanos, isoflavonas o micotoxinas y sustancias que se encuentran en la alimentación humana y animal, como fitoestrógenos. Otros EDCs sintéticos consisten en PCBs, bifenilos polibromados (PBBs), diclorodifeniltricloroetano (DDT), dioxinas, alquilfenoles,

ftalatos, BPA o dioxinas [24, 42, 57]. Todos estos compuestos se han utilizado como disolventes o lubricantes industriales, pesticidas, plastificantes o plásticos en envases de alimentos, electrónicos o botellas de agua [42, 115].

Los EDCs normalmente se bioacumulan en organismos acuáticos y especialmente en aguas subterráneas, ríos y lagos [12]; debido a su estabilidad y persistencia. Los EDCs se introducen principalmente en el medio ambiente a través de las escorrentías de las tierras agrícolas y los efluentes de las EDAR. En consecuencia, los EDCs se encuentran con frecuencia en sedimentos y lodos a niveles traza ($\mu\text{g Kg}^{-1}$). Por tanto, la detección de estos compuestos en lodos requiere un pretratamiento eficiente de la muestra y métodos altamente sensibles [14, 26, 59].

3.2.4. Nanopartículas

El término nanopartícula (NP) se refiere a partículas sólidas diseñadas con al menos una dimensión cuya longitud es inferior a 100 nm [47, 95]. La producción y el uso de nanopartículas han aumentado enormemente en los últimos años debido a su versatilidad y a sus propiedades únicas. Las NPs se pueden encontrar en múltiples bienes de consumo, desde productos médicos y antimicrobianos y textiles (AgNPs), equipos electrónicos que contienen nanopartículas de oro (AuNPs), pastas dentales, recipientes para el almacenamiento de alimentos, materiales de recubrimiento, suavizantes de telas líquidos que contienen nanopartículas de dióxido de titanio (TiONPs) hasta plásticos o embalajes (ZiONPs) [16, 77].

La presencia generalizada de nanopartículas en productos industriales y de consumo ha aumentado la preocupación por su potencial efecto tóxico o dañino para el medio ambiente [73]. Las nanopartículas artificiales se liberan al medio ambiente indirectamente a partir de productos durante su producción y su uso cada vez más común (cosméticos, formulaciones de protección solar, medicamentos, pinturas, etc.) a través de la descarga de aguas residuales [63]. Durante el proceso de tratamiento, las nanopartículas no se eliminan por completo y se incorporan a la matriz de lodos de depuradora mediante reacciones de agregación o adsorción y, con el tiempo, se concentran [54, 77,

95]. Después de la aplicación de lodos en tierras agrícolas, los posibles efectos peligrosos que presentan las nanopartículas podrían afectar a las comunidades biológicas del suelo, así como a las especies acuáticas a través de la lixiviación, las tierras de escorrentía o la erosión [104]. Sin embargo, la evaluación de la presencia y el comportamiento de las nanopartículas una vez que vuelven a ingresar al medio ambiente a través de la eliminación de lodos en el suelo agrícola, la incineración o el vertedero sigue siendo difícil [77, 78, 143].

La exposición humana a las nanopartículas se produce principalmente durante la fabricación del nanomaterial, a través de la absorción de los sistemas de fármacos o posiblemente también a través de la inhalación de nanopartículas liberadas a la atmósfera. Las NPs difieren en propiedades físicas y químicas según su origen, tamaño o composición, algunos de los cuales pueden resultar en riesgos ambientales y para la salud a largo plazo [143]. Bajo ciertas condiciones ambientales y biológicas, las NPs que contienen metales pueden reaccionar con otros contaminantes y causar citotoxicidad [78]. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden generarse inducidas por partículas en combinación con la luz ultravioleta, lo que podría causar daño celular [16, 54]. Además, las nanopartículas pueden servir como portadores de otras toxinas que pueden liberarse al medio ambiente y alterar los ecosistemas acuáticos [78, 143].

3.3. Métodos y aplicaciones

El número de publicaciones sobre la determinación de contaminantes emergentes en lodos de depuradora ha aumentado notablemente en los últimos 10 años. Las **Tablas II.5-7** resumen algunas de las publicaciones más relevantes desde un punto de vista analítico durante 5 años para contaminantes emergentes y 10 años para NPs.

Tabla II.5. Determinación de sustancias emergentes de interés en muestras de residuos/lodos de depuradora mediante cromatografía de gases.

Compuestos	Preparación de muestra (muestra)	LODs	Recuperaciones de analitos	Origen de residuos	Cantidades detectadas	Ref.
GC-MS (EI)						
Compuestos estrogénicos	<ul style="list-style-type: none"> - UAE (EtAc) - Tratamiento con H₂SO₄ - SPE (HLB) - Clean-up (neutral Al₂O₃ columna de gel de sílice) - Derivatización (BSTFA-piridina, (1:1, v/v)) 	LOQs: 1.2 – 5.5 ng L ⁻¹	80 – 98,5% (eficiencia de eliminación)	Lodos activados (Túnez)	2.52 – 3.55 L kg ⁻¹ (K _d : coeficientes de distribución entre agua y lodos activados)	[17]
	Compuestos estrogénicos	<ul style="list-style-type: none"> - UAE (EtAc-MeOH) - SPE (Cartuchos Oasis HLB) - Clean-up (neutral Al₂O₃-sílica gel columna) - Derivatización (BSTFA-piridina, (1:1, v/v)) 	LOQs: 0.9 – 1.4 ng g ⁻¹ dw	87 – 101%	Lodos de depuradora (Túnez), 2013	8.3 – 935 µg kg ⁻¹ dw
EDCS						
E1, E2, E3, EE2; 4OP, 4-CP, NP1EO, NP2EO; BPA	<ul style="list-style-type: none"> - Liofilizados, molidos y extraídos en recipientes de teflón - MAE - Clean-up by GPC (Columna Bio-Beads S-X3, ciclohexano-EcAt (1:1, v/v)) - Filtrado con Millipore 0.45 µm GF/F, filtros de fibra de vidrio. - Ajustar pH a 4.0–4.5 con ácido clorhídrico - SPE (Supelco) - Derivatización con BSTFA (1% TMCS) plus 40 µL piridina (estrógenos y fenoles) - Derivatización con MSTFA-TMIS-DTE, (1000:2:5, v/v/w) (progestágenos y andrógenos) 	LOQs: 0.2 – 9.5 ng g ⁻¹ dw	74.8 – 101.6%	Lodos (Lago Dianchi, China), 2012	1.1 – 4386.0 ng g ⁻¹ dw (fenoles) 0.6 – 13.4 ng g ⁻¹ dw (estrógenos) 0.8 – 43.3 ng g ⁻¹ dw (andrógenos) 1.3 – 3.8 ng g ⁻¹ dw (progestágeno) 14.7 – 557.5 ng g ⁻¹ dw (BPA)	[68]

	<ul style="list-style-type: none"> - Secado y triturado - UAE (hexano-acetona, (3:2, v/v)) - Filtrado (papel de filtro Whatman) 	Sin datos	92 – 98%	Biosólidos (Argentina)	<LOD (Esteroides) <LOD (PAHs, PCBs) DBP, DEHP detectado. Sin datos de cuantificación.	[142]
	<ul style="list-style-type: none"> - Liofilizado - MAE (MeOH, 350W, 3min), UAE (MeOH) o extracción Soxhlet (anhidro Na₂SO₄, MeOH) - SPE continua (PTFE columna, LiChrolut EN sorbente) - Derivatización con BSTFA con 1 % TMCS 	0.5 – 4.5 ng kg ⁻¹	93 – 99% (MAE) 81 – 95% (UAE) 70 – 89% (Soxhlet)	Lodos de depuradora (España)	36 – 164 ng kg ⁻¹ (MAE-SPE)	[14]
	<ul style="list-style-type: none"> - Liofilizado - LSE (tampón fosfato, pH2 y ACN, dos veces; ACN, una vez) - Evaporación rotatoria y diluida con agua - SPE (HLB) 	MLQs: 0.5 – 20 µg kg ⁻¹	40.2 – 89.4 %	Lodos y sólidos suspendidos (China), 2016	<LOD (E3, E1, EE2, OP) <LOD – 122 µg kg ⁻¹ (NP) 120 – 180 µg kg ⁻¹ (E2) 130 – 380 µg kg ⁻¹ (MeTCS)	[11]
APs	<ul style="list-style-type: none"> - LLE (Ciclohexano, por agitación manual) (lodos lixiviados) 	0.0002 – 0.05 mg kg ⁻¹	88 – 112%	Lodos de depuradora secos y frescos, lodos lixiviados (España)	0.01 – 1.9 mg kg ⁻¹ (lodos secos) 0.006 – 19.3 mg kg ⁻¹ (lodos frescos)	[109]
EDCs, PPCPs	<ul style="list-style-type: none"> - UAE (MeOH 1% (v/v) ácido fórmico) - SPE (Envi-carb) - Derivatización con MTBSTFA 	0.1 – 25 ng g ⁻¹	83 – 107%	Lodos de depuradora (California), 2010	1502 – 5327 ng g ⁻¹ dw	[164]
PPCPs	<ul style="list-style-type: none"> - MAE (MeOH-H₂O, (3:2, v/v), 500W, 6min) - SPE (Oasis HLB) - Derivatización con BSTFA con 1% TMCS 	0.8 – 5.1 ng kg ⁻¹	91-101%	Lodos de depuradora (España),	6.5 – 3100 ng kg ⁻¹	[13]
PCPs	<ul style="list-style-type: none"> - HS-SPME (Fibras PDMS/DVB 65) 	MDLs: 5.0 – 25.0 pg g ⁻¹	-	Lodos de depuradora	<LOD – 0.89 ng g ⁻¹ dw	[148]

macrocíclico	µm)	dw	(España)
PCPs (EI, NCI, PCl)	- UAE (Acetona-DCM) - SPE (ENV+)	Sin datos	Lodos de depuradora (Suecia), 2013 Sedimentos de lagos (Suecia, Noruega), 2009, 2012
M3TPh		54% (lodos) 78% (sedimentos)	470 – 530 ng g ⁻¹ dw (lodos) 0.015 – 1.7 ng g ⁻¹ dw (sedimentos)
APEs, BFRs	- UAE (Hexano-acetona, (4:1, v/v)) - Clean-up con columna de sílica ácida - Derivatización con HFBA+trietilamina	0.12 – 5.0 ng g ⁻¹	2.009 – 642.07 ng g ⁻¹ 38.58 ng g ⁻¹ (alquifenoles) <LOQ – 642 ng g ⁻¹ (APEs) <LOQ – 161 ng g ⁻¹ (BFRs)
PBDEs, OPEs, NPs, TBBPA, HBOD		39 – 79%	[33]
BFR	- PLE (ASE 300, DCM-hexano (50:50, v/v), 100°C, 3 ciclos) - Filtrado con jeringa (0.45 µm PTFE) - Clean-up con columna GPC - Tratamiento con H ₂ SO ₄ concentrado - LLE (hexano)	Sin datos	Biosólidos/lodos de depuradora (Carolina del Norte), 2006-2010
HBB, BDE-99		63 – 97%	<2 – <10 ng g ⁻¹ dw (HBB) 274 – 810 ng g ⁻¹ dw (BDE-99)
[40]			
GC-MS/MS (EI)			
PBDEs	- Mezclar con Forisil y Na ₂ SO ₄ - PLE (ASE 200, hexano-DCM, (50:50, v/v), 40°C, un ciclo) - MEPS (C18, Acetona-H ₂ O)	0.01 – 0.04 ng g ⁻¹	Lodos de depuradora (España)
BDEs congéneres		92 – 102%	16.2 – 45.6 ng g ⁻¹ dw (ΣBDEs)
[97]			
PCPs	- LSE (acetona-hexano, (1:1, v/v) con agitación orbital) - Clean-up con columna de- activada de gel de sílica y sulfato de sodio	LOQs: 0.1 – 0.5 ng mL ⁻¹	Lodos de depuradora (China)
BTRs Filtros UV		72.94 – 103.19%	0.34 – 408.32 ng g ⁻¹ dw
[169]			
FRs	- UAE (EtAc-ciclohexano, (5:2, v/v)) - SPE (Florisil)	4.8 – 25 µg kg ⁻¹ (PBDEs) 3.7 – 375 µg kg ⁻¹ (NBFRs) 28 – 575 µg kg ⁻¹	Lodos (España)
PBDEs, NBFRs, OPFRs		64 – 131%	3.2 – 2971 µg kg ⁻¹
[35]			

		(OPFRs)			
	Compuestos estrogénicos naturales y sintéticos	- MSPD - Derivatización (BSTFA-piridine)	0.01 – 0.3 ng g ⁻¹	80 – 110%	Suelos modificados con lodos (España) [4]
EDCs	Esteroides de hormonas naturales y sintéticas: compuestos estrogénicos, t-YR, Y1, TEST y PROG	- UAE (H ₂ O-ACN, 2:3, v/v) - MgSO ₄ y NaOAc añadido - QueChERS (MgSO ₄ , PSA y C18) - SPE (Evolute ABN) - Derivatización (MSTFA-TMIS-DTE, (1000:2:5, v/v/w))	0.5 – 2.1 ng g ⁻¹	76 – 124%	Lodos de depuradora pelletizados (España) [5]
PCPs	PBs	- MSPD (filtro con dos círculos de papel de 2 cm de diámetro y clean-up con Florisil) - Derivatización (BSTFA-TMCS, (99:1, v/v))	0.1 – 2.0 ng g ⁻¹ dw	85 – 125%	Lodos de depuradora (España), 2010 [3]
EDCs	N-nitrosaminas	- PHWE: ASE200, agua a pH 7.5, 125°C, 1500psi, dos veces - HS-SPME (fibra DVB/CAR/PDMS)	0.03 – 0.15 µg kg ⁻¹ dw	-	Lodos de depuradora (España) [94]
GC-NICI-MS					
BFRs PBDES	PBDEs congéneres y compuestos emergentes (HBB, PBEB, DBDPE)	- PLE (ASE 200, hexano-DCM, (1:1, v/v), 100°C, twice) - Tratamiento con H ₂ SO ₄ concentrado - Purificación con SPE (dos cartuchos distintos: sílica y alumina).	0.19 – 0.67 ng g ⁻¹ dw (PBDEs) 0.17 – 0.56 ng g ⁻¹ dw (PBEB y HBB) 3.63 – 12.1 ng g ⁻¹ dw (DBDPE)	31 – 81% (PBDEs) 23 – 29% (PBEB, HBB) 44% (DBDPE) 39 – 120% (HBCDs, TBBPA)	20.7 - 2326 ng g ⁻¹ dw (PBDEs) 5.71 ng g ⁻¹ dw (HBB) 2.33 ng g ⁻¹ dw (PBEB) 257 ng g ⁻¹ dw (DBDPE) [58]
GC-NCI-MS					
PBDES	PBDEs congéneres	- Extracción Soxhlet con DCM - Clean-up con columna de gel de sílice multi-capas	Sin datos	77.3 – 97.3%	Lodos de depuradora (Italia) [32]
PBDES	PBDEs	- UAE (MeOH 1% hidróxido de	Sin datos	59 – 100 %	Biosólidos de EDAR [52]

	<ul style="list-style-type: none"> amonio, v/v; DCM-hexano (2:1, v/v) - Tratamiento con H₂SO₄ - SPE (Florisil) - MAE y acetilación in situ (Acetona-hexano, (20:80, v/v) en presencia de anhídrido acético) - Filtrado a través de Celite - NaOH para quitar ácido acético - Clean-up con columna de gel de sílice 	(Australia)	
PCPs	<p>TCS y derivados de cloro y bromo</p> <p>MDLs: 300.0 ng g⁻¹ (TCS) 5.0 ng g⁻¹ (TCSs halogenados)</p>	Biosólidos (lodos digeridos) (Canadá), 2011-2012	3-9 – 273.6 ng g ⁻¹ [83]
GC-ECNI-MS			
HFRs	<ul style="list-style-type: none"> - Homogenización (sulfato de sodio) - Extracción Soxhlet (acetona-hexano) - Polvo de cobre activado para eliminar el azufre - H₂SO₄ concentrado para eliminar lípidos - Clean-up con columna alumina/silica 	Lodos de depuradora (China), 2013-2014	19 – 72.1 ng g ⁻¹ (ΣPBDEs) 7.2 – 16.0 ng g ⁻¹ (DP) 2.4 – 6.8 ng g ⁻¹ (BTBPE) 676.6 – 27438.6 ng g ⁻¹ (DBDPE) [159]
BFR (ECNI, EI)	<ul style="list-style-type: none"> - PLE (ASE 300, DCM-hexano (50:50, v/v), 100°C, 3 ciclos) - Filtrado con jeringa (0.45 μm PTFE) - Clean-up con columna GPC - Tratamiento con H₂SO₄ concentrado - LLE (hexano) 	Biosólidos/lodos de depuradora (Carolina del Norte), 2006-2010	1750 – 6358 ng g ⁻¹ dw (Σ PBDEs) 2 – 29 ng g ⁻¹ dw (DP) [40]
SPME-GC-MS (EI)			
EDCS	<ul style="list-style-type: none"> - UAE (MeOH) - SPE (gel de sílice con sulfato de sodio) 	Lodos activados (biosólidos) (Grecia)	54.9 – 786.7 ng g ⁻¹ dw (hormonas esteroideas) N.D – 634.4 ng g ⁻¹ dw [147]

andosterona, DHT; NE; TCS, BPA	- SPME acoplada (fibra de poliacrilate, Supelco)	(clorofenoles) 13,3 – 412,36 ng g ⁻¹ dw (TCS) 1,71 – 4,53 ng g ⁻¹ dw (BPA)
GC-ICP-MS		
	- Seco, molido y tamizado - Esterilizado con radiación γ (para eliminar cualquier actividad bacteriana) - LSE (0,1 mol L ⁻¹ HCl in MeOH con agitación mecánica) or MAE (0,1 mol L ⁻¹ HCl in MeOH, 1200W) - Adición de tampón Tris-citrato (pH 6) e iso-octano, agitación mecánica	
PBDEs congéneres	0,182 – 0,302 ng g ⁻¹ dw (LSE)	95 – 104%
PBDEs		<0,209 – 66,6 ng g ⁻¹ dw 1,12 – 38,6 ng g ⁻¹ dw 1,40 – 20,1 ng g ⁻¹ dw
		[116]
	Lodos de depuradora (Eslovenia), 1998, 2000, 2014	
HRGC/HRMS (EI)		
	- Extracción Soxhlet con dichlorometano - Clean-up con GPC, sílica gel, y cromatografía con Florisil o alumina.	
PBDEs congéneres	0,80 – 290000 pg g ⁻¹	-
		230 – 82000 ng g ⁻¹ (PS) 530 – 8800 ng g ⁻¹ (WBS) 420 – 6000 ng g ⁻¹ (Biosólidos tratados) (Canadá)
		[79]
		Lodos primarios (PS) Residuos de lodos biológicos (WBS) Biosólidos tratados (Canadá)
HRGC/LRMS (ECNI)		
	- Mezclado con Na ₂ SO ₄ - PLE (ASE 350, DCM-Hexano, (1:1, v/v), 100°C, 3 ciclos) - Sílice ácida para eliminar lípidos - Clean-up: columna de sílice multi-capa	
HFRS	0,01 – 0,5 ng g ⁻¹	92,6%
BFRs, CFRs		0,09 – 298 ng g ⁻¹ dw
		[167]
		Lodos de depuradora (China), 2010-2013
HRGC-TQMS-MS (EI)		
	- PLE (ASE 100, Hexano-DCM, (1:1, v/v), 100°C, 10,3MPa) - Mezclado con sulfato sódico anhidro y polvo de cobre	
BFR	0,3 pg g ⁻¹ dw	63%
BDE-209, DBDPE		5,45 – 843 ng g ⁻¹ (BDE-209) 3,25 – 125 ng g ⁻¹ (DBDPE)
		[41]
		Lodos de depuradora (España), 2006

- activado para eliminar el sulfuro
- Disolvente intercambiado con hexano y extracción líquida con H₂SO₄ concentrado
 - Clean-up con Power Prep System (FMS Inc, USA), y columnas de gel de sílice ácido, alúmina y carbón

Abreviaturas ACN, acetónitrilo; ANDT, 4-androsteno-3:17-diona; APs, alquilfenoles; APes, etoxilatos de alquilfenol; ASE, extracción acelerada con disolventes; BFRs, retardantes de llama bromados; BDEs, éteres de difenilo bromados; BPA, bisfenol A; BSTFA, N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida; BTRs, benzotriazoles; BTBPE, 1,2-bis(2,4,6-tribromofenoxi)etano; 4-CP, 4-cumilfenol; CFRs, retardantes de llama clorados; DBDPE, decabromodifenilmetano; DCM, diclorometano; DHT, 5 α -androstano-17 β -ol-3-one; DP, Declorane Plus; DTE, 1,4-Ditioeritritol; dw, peso seco; E1, estrona; E2, 17 β -estradiol; E3, estriol; ECNI, captura de electrones-aniones; EDCs, disruptores endocrinos químicos; EE2, 17 α -etilmetradiol; EI, ionización de electrones; EtAc, acetato de etilo; FRs, retardantes de llama; GC-MS, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas; GPC, cromatografía de permeación en gel; HBB, hexabromobenzeno; HBCD, hexabromociclododecano; HFBA, anhídrido heptafluorobutírico; HFRs, retardantes de llama halogenados; HRGC/HRMS, cromatografía de gases de alta resolución; HRGC/LRMS, cromatografía de gases de alta resolución/espectrometría de masas de baja resolución; HS-SPME, microextracción en fase sólida con espacio de cabeza; ICP-MS, espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente; LLE, extracción líquido-líquido; LOD, límite de detección; LOQ, límite de cuantificación; LSE, extracción líquido-sólido; M3TPh, fenil-tris(trimetilsiloxi)silano; MAE, extracción asistida por microondas; MDL, límite de detección de método; MeOH, metanol; MEPS, microextracción con adsorbentes empaquetados; MSPD, dispersión de matriz en fase sólida; MSTFA, N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida; MTBSTFA, N-tert-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida; NBFRs, nuevos retardantes de llama bromados; NCl, ionización química negativa; NE, 19-noretindrona; NiCl, ionización química de iones negativos; NP, nonilfenol; NP1EO, nonilfenol monoetoxilato; NP2EO, nonilfenol dietoxilato; OP, octilfenol; OPEs, etoxilatos de octilfenol; OPFRs, retardantes de llama organoclorados; PAHs, hidrocarburos aromáticos policíclicos; PBs, parabenos; PBEB, pentabromoetilbenzeno; PBDEs, polibromodifenil éteres; PCBs, bifenilos policlorados; PCPs, productos de cuidado personal; PHWE, extracción con agua caliente presurizada; PLE, extracción con líquido presurizado; PPB, propil parabeno; PROG, progesterona; PTFE, politetrafluoroetileno; SPE, extracción en fase sólida; SPME, microextracción en fase sólida; t-ANDR, trans-androstero; TBBPA, tetrabromobisfenol A; TCS, triclosan; TEST, testosterona; TMCS, trimetilclorosilano; TMS, iodotrimetilsilano; 4tOP, 4-tert-octilfenol; TQMS-MS, espectrometría de masas de triple cuadrupolo; UAE, extracción asistida por ultrasonidos; WWTPs, plantas de tratamiento de aguas residuales.

Tabla II.6. Determinación de sustancias de interés en muestras de residuos/lodos de depuradora mediante cromatografía de líquidos.

Compuestos	Preparación de muestra (muestra)	LODs	Recuperaciones de analitos	Origen de residuos	Cantidades detectadas	Ref.
HPLC-MS/MS (ESI-)						
FRs	<ul style="list-style-type: none"> - UAE (MeOH 1% hidróxido amónico, v/v; DCM-hexano (2:1 v/v)) - Tratamiento con H₂SO₄ - SPE (Florisil) - SPE (fraccionado LC-Si sílica) 	Sin datos	32 – 126% (rango) 80 – 86% (media)	Biosólidos de EDAR (Australia)	<LOD – 129 ng g ⁻¹ dw (ΣHBCDDs)	[52]
Compuestos estrogénicos, BPA	<ul style="list-style-type: none"> - PLE (ASE 350, DCM-Hexano, (3:1, v/v), 80 °C, dos veces) - 4 pasos de clean-up: LLE, Florisil, extracción de alcañ acuoso y enriquecimiento del equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) 	0.05 – 0.1 ng g ⁻¹	88 – 97%	Lodos de depuradora (China)	0.7 – 7.1 ng g ⁻¹ (estrógenos) 92.9 ng g ⁻¹ (BPA)	[29]
BPs análogos	<ul style="list-style-type: none"> - Liofilizado - UAE (tampón fosfato-ACN, (3:4, v/v), ACN) - SPE (Oasis HLB) 	MQLS: 0.188 – 7.28 µg kg ⁻¹	40.1 – 12.8%	Lodos de depuradora (China), 2016	0.804 – 1980 µg kg ⁻¹ dw	[140]
EDCs	<ul style="list-style-type: none"> - Mezclado con Na₂SO₄ - PLE (ASE350, DCM-Hexano, (3:1, v/v), 90 °C, 3 ciclos) - SPE (columna de sílica) 	MQLS: 0.1 – 15.0 ng g ⁻¹	65 – 103% 63 – 106%	Lodos de depuradora (China), 2010-2011 Lodos de depuradora (China), 2013	0.07 – 30300 ng g ⁻¹ (SPAs) 51.7 – 30300 ng g ⁻¹ (BHT) 1.1 – 2325 ng g ⁻¹ (SPAs) 1325 – 2325 ng g ⁻¹ (BHT)	[92] [93]
BPs análogos	<ul style="list-style-type: none"> - Liofilizado - LSE (MeOH-H₂O, (5:3, v/v) por agitación orbital, dos veces) - SPE (Oasis MCX) 	LOQ: 1.79 ng g ⁻¹ dw	78 – 101%	Lodos de depuradora (Estados Unidos), 2006-2007	<1.79 – 4700 ng g ⁻¹ 12.8–4730 ng g ⁻¹ (ΣBPs)	[165]
BPs análogos	<ul style="list-style-type: none"> - LSE (MeOH por agitación, 3 veces) - SPE (ENVI-Carb) - SPE (Sep-Pak C18) 	MQLS: 0.08 – 12.8 ng g ⁻¹	62 – 108% Medias: 81% (10 ng dopado) 88% (100 ng dopado)	Lodos de depuradora (China), 2010-2011	0.06 – 259 ng g ⁻¹ 5.37 – 599 ng g ⁻¹ (ΣBPs)	[133]

HIS	<ul style="list-style-type: none"> - PLE (ASE 2000, MeOH:H₂O₂ (1:1, v/v), 40°C, un ciclo) - SPE (Oasis HLB) 	5.0 – 10.0 µg kg ⁻¹	>61%	Lodos de depuradora (España)	<LOQ – 591 µg kg ⁻¹ dw	[9]
NSAIDs	<ul style="list-style-type: none"> - QuEChERS (ACN, NaCl y MgSO₄) - On-line SPE (Strata-X) 	0.33 – 36 ng L ⁻¹ MDLs: 0.065 – 6.7 ng g ⁻¹	36 – 55% 50 – 76% (ASA, SAL, KET)	Lodos de depuradora (Italia), 2015	<0.39 – 57 ng g ⁻¹	[127]
PBS	<ul style="list-style-type: none"> - Secado en homo - UAE (MeOH-acetona, (1:1, v/v) con ácido acético 10 mM) - SPE (Oasis MCX) 	0.2 – 0.5 ng L ⁻¹ MDLs: 0.28 – 0.97 ng g ⁻¹	78 – 113% 65 – 72% (Media absoluta de recuperaciones)	Lodos de depuradora (Estados Unidos), 2009-2010	21.2 – 213.2 ng g ⁻¹ dw (ΣPBS)	[30]
TCS	<ul style="list-style-type: none"> - Homogenización (sulfato sódico) - PLE (ASE 300, DCM-Hexano, (50:50, v/v), 100°C, 3 ciclos) - Purificación con H₂SO₄ concentrado - LLE (DCM-hexano, (50:50, v/v)) - SPE (Sep-Pak Plus Silica) 	Sin datos	53%	Biosólidos municipales/Lodos domésticos (Carolina del Norte), 2006-2010	490 – 13,866 ng g ⁻¹ dw	[40]
TCS, TCC y sus metabolitos	<ul style="list-style-type: none"> - Liofilizado - LLE (tampón fosfato, pH (2) y ACN, dos veces; ACN, una vez) - Evaporación giratoria 	MDLs: 0.2 – 0.5 µg kg ⁻¹	56.1 – 92.2%	Lodos y sólidos suspendidos (China), 2016	229 – 1170 µg kg ⁻¹ (TCC) 515 – 1120 µg kg ⁻¹ (TCS) 0.876 – 33.6 µg kg ⁻¹ (metabolitos)	[11]
PBS y metabolitos	<ul style="list-style-type: none"> - Liofilizado, molido y tamizado - PLE (ASE 350, MeOH, 70°C, dos veces) - SPE (Oasis HLB) 	MDLs: 0.1 – 0.8 µg kg ⁻¹	87.8 – 112% 81.5 – 113% (PLE) 86.8 – 103% (SPE)	Lodos de depuradora (China), 2013-2014	0.28 – 1940 µg kg ⁻¹ 273 – 556 µg kg ⁻¹ (MPB)	[85]
PBS y sus metabolitos	<ul style="list-style-type: none"> - Liofilizado - LSE (MeOH:H₂O, 5:3 v/v; por agitación orbital, dos veces) - SPE (Oasis MCX 3 cm³) 	0.01 – 10.0 ng g ⁻¹ dw	52 – 109% (PBS) 87 – 105% (ácido benzolco)	Lodos activados (Albania, Estados Unidos), 2011	27.0 – 107 ng g ⁻¹ dw (ΣPBS) 331.0 – 4120 ng g ⁻¹ dw (Σmetabolitos)	[154]
PBS	<ul style="list-style-type: none"> - Homogenizado, liofilizado - LSE (MeOH:H₂O, (5:3, v/v) por agitación orbital) - SPE (Oasis MCX) 	LOQs: 0.05 – 0.1 ng g ⁻¹ dw	81 – 119% (muestras dopadas)	Lodos de depuradora (Corea), 2011	4.65–545 ng g ⁻¹ dw (ΣPBS)	[89]

	<ul style="list-style-type: none"> - Liofilizar - LSE (MeOH:H₂O, (5:3 v/v)) por agitación orbital, dos veces - SPE (Oasis MCX 6 cm³) 	0.01– 5 ng L ⁻¹ dw	76.8 – 91%	Lodos de depuradora (India)	104 – 1090 ng g ⁻¹ dw (ΣPBs) 1220 – 35,900 ng g ⁻¹ dw (Σmetabolitos)	[75]
HPLC-MS/MS (ESI+)						
	<ul style="list-style-type: none"> - Secado con sulfato de sodio anhidro - Extracción Soxhlet (DCM-EtAc, (1:1, v/v)) - SPE (aminopropil y columna sílica neutra) 	0.01– 0.5 ng g ⁻¹ dw	83.1 – 124%	Biosólidos/Lodos activados y primarios (Canadá), 2014	4.5 – 2236 ng g ⁻¹ dw	[158]
FRs	<ul style="list-style-type: none"> - PLE (ASE 300, ACN-agua, (25:75, v/v), 50°C, 3 ciclos) - SPE (Oasis HLB) 	0.03 – 2.23 ng g ⁻¹	60 – 130%	Lodos de depuradora (España), 2009	0.22 – 301.92 ng g ⁻¹	[53]
SAs antibióticos	<ul style="list-style-type: none"> - pH ajustado a 3.0 - Filtrado con 0.22 µm de membrana de celulosa - On-line SPE (Oasis HLB) 	MDLs: 0.800 – 600 ng L ⁻¹		Aguas residuales domésticas y efluentes de biorreactores (Brasil)	0.018 – 1097 µg L ⁻¹ (aguas residuales) 0.023 – 308 µg L ⁻¹ (efluente)	[90]
PPCPs	<ul style="list-style-type: none"> - PLE (ASE200, Ácido cítrico (pH 3)-MeOH, (1:1, v/v), RT, 2 ciclos) - SPE (Oasis HLB) 	0.006 – 0.043 µg L ⁻¹ (SAs), 0.129 µg L ⁻¹ (TCs) MDLs: 0.6 – 4.2 ng g ⁻¹ (SAs) 3.2 – 13 ng g ⁻¹ (TCs)	86.4 – 100.3%	Lodos de depuradora (España), 2011	<MDL – 103.8 ng g ⁻¹	[117]
Derivados de antibióticos de quinolonas	<ul style="list-style-type: none"> - UAE (MeOH-McIlvaine buffer, (50:50, v/v)) - MAE (MeOH-McIlvaine buffer, (50:50, v/v), 100W, 17 min) - PLE (MeOH-McIlvaine buffer, (50:50, v/v)) 	2 – 5 ng g ⁻¹	97.9 – 104%	Lodos de depuradora (España))	12 – 834 ng g ⁻¹	[45]
ECs	<ul style="list-style-type: none"> - Liofilizado - LSE (MeOH:H₂O, (5:3, v/v) en agitado orbital, dos veces) - SPE (Oasis MCX 6 cm³) 	0.5 – 2 ng mL ⁻¹ (BTRs) 0.33 – 2 ng mL ⁻¹ (BTHs) 0.1 – 0.8 ng mL ⁻¹ (BzPs) 0.2 – 1.8 ng/mL (BPs)	52 – 102%	Lodos de depuradora (India), 2012	<LOQ – 58.4 ng g ⁻¹ dw (BTRs) <LOQ – 85700 ng g ⁻¹ dw (BTHs) <LOQ – 231 ng g ⁻¹ dw (BzPs) 0.7 – 185.7 ng g ⁻¹ (BPs)	[74]

HPLC-MS/MS (ESI+/-)	
Fármacos antibióticos y antiinflamatorios	- UAE (H ₂ O-MeOH) - Fase acuosa: SPE (Oasis HLB) - Fase sólida: UAE (MeOH-H ₂ O, (50:50, v/v), 0.5% HCOOH)
EDCs	MDLs: 2 – 12 ng g ⁻¹ dw 76 – 131% 0.1 – 238 ng g ⁻¹ dw (hormonas) 10 – 19743 ng g ⁻¹ dw (APEOs y BPA) 0.3 – 37016 ng g ⁻¹ dw (PAEs)
Fármacos y fungicidas	LOQs: 0.2 – 22.0 µg L ⁻¹ (Fase acuosa) 1.2 – 46 µg kg ⁻¹ (Fase sólida)
EDCs	70 – 120% <40% (4-AA) Sin datos [20]
Fármacos, TCS, TCC, BPA, PBs y Filtros UV	Muestras de aguas residuales (China), 2011-2013
Fármacos: analgésicos, estimulantes, anticonvulsivos , NSAIDs y antibióticos	2270 µg kg ⁻¹ (ofloxacina) 1440 µg kg ⁻¹ (TCC) [86] [87]
Fármacos, BPA, TCS, TCC	LOQs: 0.001 – 0.122 µg g ⁻¹ 2.622 – 422.8 mg kg ⁻¹ [46]
PPCPs	<LOD – 4020 µg kg ⁻¹ (PPCPs) <LOD–1830 µg kg ⁻¹ (BPA) 354 – 608 µg kg ⁻¹ (TCS) 1130 – 2180 µg kg ⁻¹ (TCC) 2.0 – 970 ng g ⁻¹ dw (fármacos) 10,000 – 28000 ng g ⁻¹ dw (TCS) <LOQ – 36 ng g ⁻¹ dw (Filtro UV) [199]
Fármacos, TCS, Filtro UV	LOQs: 0.5 – 50.0 ng L ⁻¹ 75 – 100% Lodos activados (India), 2013
Fármacos	90 – 131% <56% (ketoprofeno) Lodos digeridos (Corea del Sur), 2011
PPCPs	88 – 112% (PLE) 2.8 – 18.9 µg kg ⁻¹ dw [8]

	<ul style="list-style-type: none"> - PLE (ASE 200, MeOH, 100°C, un ciclo) - Filtrado 0.22 µm nylon - LSE (ACN % ácido acético, por agitación manual y vortex) - MgSO₄ y NaCl para fraccionar la fase orgánica - d-SPE, QuEChERS (C18, PSA, PSA + C18, quitina y/o GCB añadiendo MgSO₄) 	41 – 122%	(España)		
barbitúricos y benzodiazepinas					
NSAIDs, PBs, TCC, BPA, herbicidas, un antidepresivo y un fungicida		0.3 – 15 µg kg ⁻¹	Lodos (Brasil)	Sin datos	[28]
HPLC-MS/MS (APCI)					
EDCs	- PLE (ASE200, Acetato de etilo, 100°C, 3 ciclos)	4 – 8 ng g ⁻¹	Lodos de depuradora (España)	23.5 – 680 ng g ⁻¹ (BPA) Cl-BPAs no detectado	[44]
HPLC-DAD-FLD					
PPCPs	<ul style="list-style-type: none"> - UAE (MeOH-acetona) - pH ajustado a 2.0 - SPE (Oasis HLB) 	1.22 – 360 µg kg ⁻¹ dw	Lodos primarios, secundarios y digeridos (España), 2008-2009	2.18 – 3237 µg kg ⁻¹ dw 524 – 3237 µg kg ⁻¹ dw (IBF) 19.8 – 160 µg kg ⁻¹ dw (EEz) 7.69 – 836 µg kg ⁻¹ dw (Ez)	[98]
	<ul style="list-style-type: none"> - UAE (MeOH-acetona) - pH ajustado a 2.0 - SPE (Oasis HLB) 	0.45 – 126 µg kg ⁻¹ dw (DAD) 0.13 – 12.8 µg kg ⁻¹ dw (F)	Lodos primarios, secundarios y digeridos y compost (España)	3.29 – 4105 µg kg ⁻¹ dw (Lodos) 9.19 – 974 µg kg ⁻¹ dw (Compost)	[99]
HPLC-UV					
Antibióticos	- LSE (MeOH, por agitación orbital, una vez) - SPE (Phenomenex C18)	LOQ: 50 ng g ⁻¹		Lodos (Kenia), 2014-2015	50 – 276 ng g ⁻¹ [81]
UHPLC-MS/MS (ESI-)					

<p>Hormonas esteroideas: glucocorticoides</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Liofilizado - PLE (ASE 200, hexano; MeOH-acetona, (80:20, v/v), 45°C, un ciclo) - SPE (Cartuchos Bond Elut Plexa) 	<p>0.5 – 1.0 µg kg⁻¹</p>	<p>8 – 20% (alta polaridad) 28 – 43% (polaridad media) 73% (baja polaridad)</p>	<p>Lodos de depuradora (España)</p>	<p><LOQ – 6.1 µg kg⁻¹ dw</p>	<p>[66]</p>
<p>EDCS</p>						
<p>PFCA, PFSA</p>	<ul style="list-style-type: none"> - UAE (1% ácido acético en MeOH; MeOH-ACN, (50:50, v/v)) - SPE (Oasis WAX) 	<p>MDLs: 3 – 4 pg g⁻¹</p>	<p>50 – 104%</p>	<p>Lodos de depuradora (Nigeria), 2012</p>	<p>10.8 – 596.5 pg g⁻¹</p>	<p>[132]</p>
<p>BP's análogos</p>	<ul style="list-style-type: none"> - UAE (MeOH-acetona, (50:50, v/v)) - SPE (HLB y MAX) 	<p>0.02 – 0.2 ng g⁻¹ dw (sedimentos) 0.03 – 0.86 ng g⁻¹ dw (lodos)</p>	<p>57.1 – 103.2%</p>	<p>Sedimentos y lodos activados (China)</p>	<p>0.07 – 2009.80 ng g⁻¹ dw (sedimentos) 1.37 – 20.56 ng g⁻¹ dw (BPA) Sin datos para lodos</p>	<p>[162]</p>
<p>PCPs</p>	<ul style="list-style-type: none"> - PLE (ASE 300 H₂O- isopropil alcohol, (20:80, v/v), 120°C, one cycle) - SPE (Oasis HLB) - pH ajustado a 2.0 - SPE (HyperSep™ Retain PEP u Oasis HLB) 	<p>MDLs: 8.5 – 112.9 ng L⁻¹ 0.0024 – 0.006 µg g⁻¹</p>	<p>62.3 – 91.1% 105.7 – 117.4% (TCS) 33.1 – 36.1% (TCC)</p>	<p>Sólidos de aguas residuales/biosólidos (Atlántico medio-UE), 2005-2015 Biosólidos (Irlanda), 2015</p>	<p>13008 – 16839 ng g⁻¹ dw (TCS) 102 – 3006 ng g⁻¹ dw (TCC) 0.08 – 4.9 µg g⁻¹</p>	<p>[10] [12]</p>
<p>PBS</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Liofilizado - UAE (MeOH) or PLE (MeOH) 	<p>3 – 7 ng g⁻¹ (UAE) 3 – 4 ng g⁻¹ (PLE)</p>	<p>94.0 – 105.9%</p>	<p>Compost (España)</p>	<p>Sin datos</p>	<p>[19]</p>
<p>UHPLC-MS/MS (ESI+)</p>						
<p>Resaltantes de llama: OPEs</p>	<ul style="list-style-type: none"> - PLE (ASE 350, ACN, 170°C, dos ciclos) - Filtrado (GF/C membrana) - SPE (Oasis HLB) 	<p>0.02 – 3.00 µg kg⁻¹</p>	<p>56 – 119%</p>	<p>Lodos de depuradora (China), 2016</p>	<p>- Dopado con paja de trigo: 7.22 – 29.9 µg kg⁻¹ - Mazorca: 0 – 29.9 µg kg⁻¹ - Serrín: 3.33–23.0 µg kg⁻¹</p>	<p>[118]</p>
<p>FRS</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Liofilizado - UAE (ACN) - SPE (Florisiil) 	<p>MDLs: 0.13 – 0.16 ng g⁻¹ dw 0.14 – 2.1 ng g⁻¹ dw</p>	<p>74.1 – 98.5% (recuperación absoluta) 104 – 136% (recuperación relativa)</p>	<p>Partículas sólidas suspendidas y lodos (China), 2014</p>	<p>0.40 – 5.82 ng g⁻¹ dw (OOPes) 1.0 – 90.5 ng g⁻¹ dw (MOPEs)</p>	<p>[88]</p>
<p>PPCPs</p>	<ul style="list-style-type: none"> - PLE (ASE 200, MeOH-H₂O, (65:35, v/v), 100°C, 4 ciclos) - SPE (Oasis MAX) 	<p>MDLs: 3.9 – 74 µg kg⁻¹ dm (ifosfamida)</p>	<p>4 – 167% (IFO) 8 – 155% (CP)</p>	<p>Lodos de depuradora (France), 2009-2011</p>	<p>11.4 – 42.5 µg kg⁻¹ dw (IFO) 12.6 µg kg⁻¹ (CP)</p>	<p>[130]</p>

	- SPE (Oasis MCX)	2.5 – 51 µg kg ⁻¹ dm (Ciclofosfamide)		<LOQ – 8546 µg kg ⁻¹ (Total PPCPs) 231 – 8546 µg kg ⁻¹ (Fluoroquinolonas) 16 – 7106 µg kg ⁻¹ (TCS) <LOQ – 15,51 µg kg ⁻¹ (Sulfonamidas) 0.25 – 28.31 µg kg ⁻¹ (Macrólidos)	[166]
Fármacos: fluorquinolonas, tetraciclínas, sulfonamidas, macrólidos	- Liofilizado, homogenizado y tamizado - UAE (3 times) - SPE (Oasis HLB)	MDLs: 0.01 – 0.50 µg kg ⁻¹	61 – 130%	Lodos de depuradora (China)	
UHPLC-MS/MS (ESI+/-)					
PFCs, compuestos estrogénicos naturales y sintéticos; TCS, TCEP, BPA, TCP, OP, 4-MBC, NP	- UAE (H ₂ O-MeOH-acetona, (12:1, v/v/v)) - SPE (Carbograph-4)	MDLs: 0.04 – 6 ng g ⁻¹	19 – 93%	Sedimentos de lagos y ríos (Italia), 2015	[26]
EDCs	- UAE (MeOH) - MAE (PTFE vasos, MeOH, 500W, 4 min at 65°C, 5 min cooling y 10 min at RT) - Filtrado (0.20 µm jeringa PET)	0.03 – 0.40 ng g ⁻¹ 2.1 – 192.8 ng L ⁻¹ MDLs: 1.11 – 7.90 ng g ⁻¹	83 – 107% >60%	Compost de EDAR (España) Lodos (España), 2015-2016	[23] [62]
Hormonas esteroideas	- MAE (PTFE vasos, MeOH, 200W, 16 min) - Filtrado (0.45 µm jeringa) - On-line SPE (Oasis HLB)	0.1 – 0.7 ng g ⁻¹	>77%	Lodos de aguas residuales (España), 2010-2012	[150]
Fármacos y drogas ilícitas	- Liofilizado - UAE (MeOH:H ₂ O, (50:50, v/v)) - Filtrado (0.2 µm filtro de jeringa)	0.8 – 19.9 ng g ⁻¹ dw (fármacos) 0.6 – 14.3 ng g ⁻¹ dw (drogas ilícitas)	50 – 110% (para más del 77% de compuestos)	Lodos de depuradora (Grecia), 2013	[51]
Fármacos y PPCPs (PBs,	- QueCHERS (NaCl, MgSO ₄ y PSA)	MDLs: 0.15 – 3.0 ng g ⁻¹	50 – 93%	Lodos sams (Brasil), 2012	[27]
				Otros compuestos no	

		detectados
BzPs, TCS		
	<ul style="list-style-type: none"> - UAE (100 mM sodium hydroxide, MeOH-H₂O₁ (80:20, v/v), MeOH) - SPE (ENVI-Carb) - SPE (Oasis WAX) - SPE (C18, only for BPA) 	1.80 – 2.67 ng g ⁻¹ dw (PFOA) 10.5 – 10.7 ng g ⁻¹ dw (PFOS) 155 – 142 ng g ⁻¹ dw (BPA)
	Sin datos	80.9% (PFOA, PFOS) 68.4% (BPA)
	Lodos de depuradora (Hong Kong, China), 2012-2013	[100]
ECS		
	<ul style="list-style-type: none"> - Liofilizado - MAE (H₂O-MeOH, (50:50, v/v), pH (2), 800W, 30 min) - SPE (Oasis MCX) <ul style="list-style-type: none"> o Analitos ácidos (0.6% HCOOH in MeOH) o Analitos básicos (7% NH₄OH en MeOH) 	0.3 – 5800 ng g ⁻¹ (PPCPs)
	MDLs: 0.03 – 4.81 ng g ⁻¹	[120]
	Lodos digeridos (Inglaterra)	
LC-HRMS		
UHPLC-Orbitrap-MS (ESI+/-)		
EDCs	<ul style="list-style-type: none"> - QueChERS (NaCl, MgSO₄, ácido cítrico disodium salt y trisodium salt dihydrate y Z-sep+dSPE) 	<LOQ – 181.2 ng g ⁻¹
	0.5 – 10 ng g ⁻¹ dw	[67]
LC-QTOF-MS (ESI+/-)		
	<ul style="list-style-type: none"> - MSPD (Florisil y PSA) - Cartucho SCX (neutros y ácidos) - SAX (neutros y básicos) 	2 – 295 ng g ⁻¹ (lodos) 5 – 152 ng g ⁻¹ (biosólido)
PPCPs	Fármacos y compuestos estrogénicos	
	LOQ: 2 ng g ⁻¹	[25]
	1 – 2500 ng g ⁻¹	
	Lodos de depuradora (France), 2009	[119]
LC-QTOF-MS (ESI+)		
PPCPs	<ul style="list-style-type: none"> - MSPD - Clean-up con cartuchos de sílica 	1.8 – 21.6 ng g ⁻¹
	LOQ: 0.005 – 0.05 ng g ⁻¹	[144]
LC-QqLIT-MS/MS (ESI+)		

BFRs emergentes	HBCDs, TBBPA, BPA, MonoBBPA, DIBBPA, TriBBPA	- UAE (DCM-MeOH, (1:9, v/v)) - SPE (C18 cartuchos)	1.40 – 66 ng g ⁻¹ dw (HBCDs, TBBPA) 66 – 200 ng g ⁻¹ dw (BPA y TriBBPA)	39 – 120%	Lodos de depuradora (Cataluña, España)	97.5 ng g ⁻¹ dw (HBCDs) 472 ng g ⁻¹ dw (TBBPA) 55.6 – 2595 ng g ⁻¹ (BPA) 886 ng g ⁻¹ dw (MonoBBPA) 807 ng g ⁻¹ dw (TriBBPA)	[58]
PPCPs	Drogas ilícitas y sus metabolitos	- PLE (ASE 200, MeOH-H ₂ O, (9:1, v/v), 50°C, un ciclo) - SPE (Evolute ABN)	0.1 – 6.4 ng g ⁻¹ dw	89 – 130%	Lodos de depuradora (España), 2010	0.5 – 479.0 ng g ⁻¹ dw >100 ng g ⁻¹ dw (Cannabinoides, metadona y su metabolito)	[102]
TFC-LC-MS/MS (ESI+/-)							
EDCs	Compuestos estrogénicos sintéticos y conjugados, antimicrobianos, PBs, BPA, APs, BTRs, y OPFRs	- PLE (ASE 200, H ₂ O-MeOH: acetona, (1:2:1, v/v/v), 50°C, 3 ciclos) - SPE (Oasis HLB)	0.031 – 38 ng g ⁻¹ 321 ng g ⁻¹ (OP1EO) 12.5 ng g ⁻¹ (NP1EO)	40–115% (método on-line) 33–127% (método off-line)	Lodos de depuradora (Río Ebro, España)	2.6 – 29416 ng g ⁻¹	[59]

Abreviaturas: ACN, acetónitrilo; APs, alquilfenoles; APCI, ionización química a presión atmosférica; APEOs, etoxilatos de alquilfenoles; BA, ácido benzoico; BFRs, retardantes de llama bromados; BBPA, bromobisfenol A; BHT, 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol; BPs, bisfenoles; BPA, bisfenol A; BSAs, bencenosulfonamidas; BTHs, benzotriazoles; BzPs, benzofenonas; CP, ciclofosfamida; DAD, detector de diodos array; DCM, diclorometano; d-SPE, extracción sólido-líquido dispersiva; E2, 17 β -estradiol; ECs, contaminantes emergentes; EDCs, disruptores endocrinos químicos; EE2, 17 α -etilnestradiol; EPA, Agencia de Protección Ambiental; ESI, ionización por electrospray; EtAc, acetato de etilo; FI, detector de fluorescencia; FRs, retardantes de llama; HBCDs, hexabromociclododecanos; HESI, ionización por electrospray; HILS, edulcorantes de alta intensidad; HPLC, cromatografía de líquidos de alta resolución; IBF, ibuprofeno; IFO, ifosfamida; LC-TOF-MS, cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo; LC-HRMS, cromatografía de líquidos/espectrometría de masas de alta resolución; LLE, extracción líquido-líquido; LOD, límite de detección; LOQ, límite de cuantificación; LSE, extracción líquido-sólido; 4-MBC, 4-Metilbenzilideno camfor; MAE, extracción asistida por microondas; MDL, límite de detección del método; MeOH, metanol; MOPEs, ésteres organofosforados monoméricos; MPB, metil parabeno; MQL, límite de cuantificación del método; MSPD, dispersión de matriz en fase sólida; NP, 4-nonilfenol; NP1EO, nonilfenol monoetoxilato; NSAIDs, drogas anti-inflamatorias no esteroideas; OP, 4-octilfenol; OP1EO, octilfenol monoetoxilato; OPEs, ésteres organofosforados oligoméricos; OPs, compuestos organofosforados; OPFRs, retardantes de llama organofosforados; PAEs, ésteres de ácido ftálico; PBs, parabenos; PCPs, productos de cuidado personal; PFCs, compuestos perfluorados; PFCAs, carboxilatos de perfluoroalquilo; PFOA, perfluorooctanoato; PFOs, perfluorooctano sulfonato; PFSAs, sulfonatos de perfluoroalquilo; PLE, extracción con líquido presurizado; PPCPs, fármacos y productos de cuidado personal; QqLIT, triple cuadrupolo de trampa iónica; QTOF, cuadrupolo con analizador de tiempo de vuelo; RT, temperatura ambiente; SAS, sulfonamidas; SLE, extracción sólido-líquido; SPAs, antioxidantes fenólicos sintéticos; SPE, extracción en fase sólida; TBBPA, tetrabromobisfenol A; Tcs, tetraclinas; TCEP, Tris(2-cloroetil)fosfato; TCPP, Tris(2-cloroisopropil)fosfato; TCS, triclosan; TFC, cromatografía de flujo turbulento; UAE, extracción asistida por ultrasonidos; UHPLC, cromatografía de líquidos de ultra alta resolución; WWTPs, plantas de tratamiento de aguas residuales.

Tabla II.7. Métodos para la determinación de nanopartículas en muestras de residuos/lodos de depuradora.

Técnica analítica	Compuestos	Preparación de muestra	LODs	Origen de residuos/lodos de depuradora	Cantidades detectadas	Ref.
APPI-MS	Nanopartículas orgánicas	<ul style="list-style-type: none"> - Liofilizado - UAE (tolueno) - LSE (tolueno; por agitación orbital, dos veces) - Centrifugación - Filtrado, dos veces 	Sin datos	Lodos (Holanda)	32 mg kg ⁻¹	[16]
ICP-MS	Ag	<ul style="list-style-type: none"> - Digestión Kjeldahl - HCl y HNO₃ concentrados - Filtrado (papel de filtro de nitrato de cobre) 	0.14 µg L ⁻¹	Sólidos de lodos de depuradora (Inglaterra)	3 – 14 mg kg ⁻¹ dw	[73]
ICP-AES TEM	α-Ag ₂ S-NPs	<ul style="list-style-type: none"> - Liofilizado y molido - UAE (H₂O₂; sonicado en un baño de agua) - 1 mL de suspendido se diluye con MeOH 	Sin datos	Lodos de depuradora (Medio-oeste, EEUU)	856 mg kg ⁻¹ (Ag) 12.0 g kg ⁻¹ (S)	[77]
ICP-MS XANES	ZnO-NPs	<ul style="list-style-type: none"> - Digestores anaerobios - Liofilizado - Digestión inversa de agua regia asistida por microondas (HCl-HNO₃, 1:3, v/v) 	421 mg kg ⁻¹ (Zn en tratamiento control)	Lodos de depuradora (South Australia)	890 – 939 mg kg ⁻¹	[95]
SP-ICP-MS	Ti-, Fe-, Zn-, Sn-, y Pb-Conteniendo NPs)	<ul style="list-style-type: none"> - Liofilizado y homogenizado - LSE (procedimiento de extracción secuencial de BCR modificado, mediante agitación de extremo a extremo): 1. Extracción con ácido acético; 2. Extracción con cloruro de hidroxilamino con HNO₃ a pH 1.5; 3. Tratado con peróxido de hidrógeno y extraído con HNO₃ a pH 2.0; - Digestión con ácido nítrico asistida por microondas, aprobada por la EPA 	Sin datos	Lodos de depuradora (China)	ND – 12965.05 g kg ⁻¹	[143]
ICP-AES	Partículas nano- y mayores TiO ₂ partículas	<ul style="list-style-type: none"> - Liofilizado y molido - UAE (H₂O) - Diluido con MeOH - Digestión con ácido nítrico asistida por microondas, aprobada por la EPA, usando un 	Sin datos	Lodos de depuradora (Medio-oeste y oeste, EEUU)	96.9 – 4510 mg kg ⁻¹ dw (lodos) 810 mg kg ⁻¹ dw (biosólidos clase A)	[78]

sistema MARS (para biosólidos A)					
ICP-XAS	Ag-NPs, AgCl-NPs	- Digestores anaerobios - Liofilizado - Digestión por microondas en HNO ₃	Sin datos	Lodos de depuradora (Australia)	<7 mg kg ⁻¹ (muestras control) [114]
ICP-OES	Ag	- Digestión ácida asistida por microondas (65% HNO ₃ , 35% H ₂ O ₂ , y 48% HF) usando un sistema UltraClave 3, MLS GmbH	Sin datos	Lodos de depuradora (Suiza)	393 mg kg ⁻¹ (media de lodos) 1431 mg kg ⁻¹ (muestras de ceniza) [108]
ICP-OES	Metales pesados: Cu, Ni, Pb, Zn, Cr	- Ratio líquido-sólido de 10 mL g ⁻¹ (agua bi-distilada) - LSE (H ₂ O ₂), por agitación de extremo a extremo (60 rpm) en oscuridad durante 24h - Centrifugación (30 min, 450g) - Filtrado	0.01 – 0.2 mg L ⁻¹	Lodos de depuradora frescos y secos (Norte oriental, España)	0.15 – 73 mg kg ⁻¹ (lodos secos) 0.2 – 20 mg kg ⁻¹ (lodos frescos) [109]
AAS	ZnO-NPs	- Digestión ácida asistida por microondas (HNO ₃ , HF y H ₂ O bi-distilada, (1:1:1, v/v/v), dos veces) usando un sistema MARS	Sin datos	Lodos de depuradora (Norte de España)	83.88 mg kg ⁻¹ (lodos) 82.62 mg kg ⁻¹ (lodos) [54]

Abreviaturas. AAS, espectrometría de absorción atómica; APPI, fotoionización a presión atmosférica; EPA, Agencia de Protección Ambiental; HF, ácido hidrófluorhídrico; ICP-AES, espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente; ICP-MS, espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente; ICP-OES, espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente; LSE, extracción líquido-sólido; MeOH, metanol; NPs, nanopartículas; o.n, overnight; SP-IPC-MS, espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente de partícula simple; TEM, microscopía de transmisión de electrones; UAE, extracción asistida por ultrasonidos; XANES, absorción de rayos X cerca de la estructura del borde; XAS, espectroscopía de absorción de rayos X.

Si bien las técnicas clásicas como la agitación mecánica o la extracción Soxhlet todavía se emplean en algunas publicaciones, la extracción asistida por ultrasonido (UAE), la extracción asistida por microondas (MAE) y la extracción con líquidos presurizados (PLE) son las opciones preferidas para el tratamiento de muestra en muchos casos debido a la posibilidad de su automatización y a la reducción del tiempo de análisis. Además, se están usando cada vez más otras técnicas de extracción que requieren una menor cantidad de disolvente. Estas incluyen la técnica de QuEChERS (Rápido, Fácil, Económico, Efectivo, Resistente y Seguro); la dispersión de matriz en fase sólida (MSPD); la extracción con agua caliente presurizada (PHWE) o la microextracción con adsorbentes empaquetados (MEPS). Para las técnicas instrumentales, las opciones más comunes siguen siendo la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida (LC) acoplada a espectrometría de masas, simple o en tándem (MS, MS/MS).

3.3.1. Preparación de muestra

3.3.1.1. Obtención de muestra

La ubicación del punto de muestreo dentro de las EDAR depende en gran medida del tipo de muestra de lodos de depuradora que queramos analizar. Si bien la mayoría de los autores optan por muestrear lodos después del paso final de deshidratación (prensa o centrifugado) para obtener una representación del producto biosólido total extraído de las EDAR [3, 10, 40, 52, 55, 67, 79, 86, 87, 93, 98, 99, 102, 117, 118, 148, 158, 159]; otros prefieren el muestreo después del paso de digestión anaeróbica en el que se elimina la mayor parte de la materia orgánica [10, 27, 33, 59, 95, 99, 136, 158]. También se ha elegido como sitios de muestreo el desbordamiento de los tanques primarios y secundarios (clarificadores) [10, 17, 29, 79, 95, 98, 99, 158].

El muestreo compuesto a largo plazo logra una mayor representación del total de lodos de depuradora, mostrando con precisión las fluctuaciones y el rendimiento promedio del lote de producción durante un período de tiempo prolongado. Este tipo de muestreo es un proceso tedioso y, por tanto, no es la opción más utilizada [3, 16, 93, 98, 159]. Sin embargo, la toma de muestras

requiere menos operación manual y puede considerarse comparable a una muestra compuesta de 20 a 30 días, ya que el flujo inferior del clarificador y los tiempos de detención del digestor disminuyen la variabilidad en las propiedades del lodo y producen una mezcla homogénea [145]. Por lo tanto, la toma de muestras es la alternativa preferida para la recolección de muestras de lodos de depuradora [16, 23, 46, 52, 79, 102, 119, 130, 139].

La cantidad de lodo tomada suele variar entre 500 mL y 5 L. Botellas y tarros de ámbar [3, 4, 13, 17, 29, 33, 41, 44, 45, 52, 77, 79, 98, 99, 102, 117-119, 158, 159] o cubos de acero inoxidable [27, 79] son normalmente la opción común para la recolección de muestras, ya que evita la interferencia de moléculas de oligofenilenetilenilo (OPE) y protege los compuestos contenidos en la muestra de la fotodegradación, la humedad y otros factores externos. Otras alternativas para el muestreo incluyen el uso de papel de aluminio [26, 59, 93, 159, 167] y/o bolsas de polietileno o contenedores [16, 23, 44, 93, 130, 136], que son adecuados para el análisis de metales. Después del muestreo, las muestras se suelen transportar al laboratorio en refrigeración y posteriormente se almacenan a -20 °C hasta su extracción y análisis.

Antes del muestreo, el material de vidrio limpio se suele enjuagar con agua ultrapura y un disolvente orgánico como acetona y hexano [52, 116] o más comúnmente metanol (MeOH) [46, 92, 93]. Además, para reducir o inhibir la actividad microbiana, a veces se añaden a la muestra determinados productos químicos. Formaldehído 1% (v/v) [17-19, 44, 45]; formaldehído al 3% (v/v) con agua [23]; NaN₃ [29]; azida de sodio [170]; NaN₃ g_{SS(dw)}⁻¹ con azida sódica [147]; o MeOH al 1% (v/v) [68] se ha utilizado de manera tradicional.

3.3.1.2. Pre-tratamiento de muestra

Antes del análisis, las muestras de lodos de depuradora se someten a un proceso de pretratamiento. Este paso facilita la extracción posterior y ayuda a eliminar constituyentes de la matriz que interferirían con la determinación instrumental [149]. El primer paso previo a la extracción es la eliminación del agua, ya que asegura un contacto adecuado entre el disolvente y la matriz en el proceso de extracción [114]. Se utilizan varias estrategias para eliminar el agua

de las muestras de lodos, dependiendo de los compuestos problema. Algunos autores emplean la centrifugación y la decantación como una alternativa para la separación de los sólidos en suspensión del agua residual y antes de su posterior eliminación mediante secado al aire o calentamiento [17, 20, 44, 98, 130]. El secado al aire es bastante poco común [23]. También se usa el calentamiento de las muestras en un horno [44]. Los analitos propensos a degradarse a determinadas temperaturas requerirían una temperatura más baja, lo que implicaría un mayor período de tiempo para eliminar el agua de los lodos [114]. De ahí que la mayoría de los autores opten por la liofilización, ya que es un método sencillo y eficaz en el tiempo en el que los analitos no se evaporan ni degradan [3, 13, 20, 29, 52, 55, 59, 86, 87, 93, 99, 119, 148].

Una vez obtenido el lodo seco, las muestras se homogeneizan triturando con un mortero. Para asegurar un tamaño de partícula similar, el paso final del pretratamiento consiste en el tamizado. Dependiendo del posterior siguiente método de extracción, es necesario un tamaño de partícula, comprendido, según los diferentes autores, entre 425 μm [117], 125 μm [59, 148], 2 mm [13, 32], <100 μm [99], 250 μm [130], 1.41 mm [23, 44], <100 μm [98], 0.5 mm [164] y 0.2 mm [55].

3.3.1.3. Tratamiento de muestra

Una extracción eficiente de los compuestos de interés del lodo pretratado es esencial para obtener una buena purificación y aislamiento de los analitos diana de la matriz. Las técnicas de extracción utilizadas en los métodos publicados en la literatura se resumen en las **Tablas II.5-7** y se comentan brevemente a continuación.

Agitación mecánica. En algunas publicaciones se ha informado de técnicas clásicas como la agitación (ya sea mediante agitación manual, vortex o agitador orbital) para la extracción de EDCs de muestras de lodo. Congéneres de PBDE [116], APs [109], filtros UV de benzotriazoles [169], BPs [30, 74], PBs y sus metabolitos [28, 75, 89, 154], antibióticos [81], compuestos emergentes como benzotriazoles y benzofenonas [74], entre otros PCPs [28] son ejemplos de analitos extraídos por agitación mecánica. El disolvente de extracción más

utilizado es MeOH, puro [81, 116, 133] o mezclado con agua (5:3, v/v) [56, 74, 75, 89, 154]. Por otro lado, ciclohexano, acetona-hexano (1:1, v/v) y acetonitrilo (ACN) con 1% de ácido acético también se han usado para la determinación de APs [109], filtros UV de benzotriazoles [169] y algunos PCPs (triclocarbán (TCC), antiinflamatorios no esteroideos (AINE), PBs y BPA) [28], respectivamente. Generalmente se realizan dos o tres extracciones consecutivas. Cabe señalar que en la mayoría de los métodos que utilizan agitación, la extracción suele ir seguida de un paso de limpieza con SPE. Por ejemplo, cartuchos SPE como Oasis MCX [74, 75, 89, 154], C18 [81] o sílice [169] se han utilizado después de la extracción con agitación mecánica. En algunos trabajos se emplea agitación mecánica para la determinación de nanopartículas. Por ejemplo, la agitación orbital con tolueno se implementó durante la extracción de partículas orgánicas [16] y la agitación de extremo a extremo con H₂O (durante 24 h en oscuridad) durante el análisis de algunos metales pesados [109]. Para las NPs que contienen Ti-, Fe-, Zn-, Sn- y Pb-, se realizó un procedimiento de extracción secuencial de BCR modificado que también utiliza agitación de extremo a extremo [143].

Extracción Soxhlet. Si bien el Soxhlet es tan altamente eficiente (próximo al 100% es cuestión de tiempo) para la extracción de este tipo de compuestos a partir de matrices sólidas, emplea tiempos de extracción que con frecuencia son excesivamente prolongados y además requiere uso de grandes volúmenes de disolventes [171]. A pesar de estas desventajas, algunos EDCs (en su mayoría retardantes de llama) se han extraído de los lodos de depuradora mediante esta técnica. Por ejemplo, se ha utilizado para la determinación de compuestos organofosforados con diclorometano-acetato de etilo (DCM-EtAc (1:1, v/v)) y análisis LC [158]. Congéneres de PBDE [32, 79, 159], otros HFRs como BTBPE y DBDPE [159], y algunos EDCs que incluyen PBs, fenilfenoles, triclosán (TCS), APs y BPA [14] también se han extraído favorablemente con Soxhlet y luego se han analizado con GC. Se emplearon DCM [32, 79], acetona-hexano (1:1, v/v) [159] y MeOH [14] como disolventes en estos casos. Los volúmenes de disolvente reportados fueron de 100 mL y 200 mL respectivamente [14, 32, 159], y los tiempos de extracción variaron de 16 a 48 h. Antes de la extracción Soxhlet, es habitual homogeneizar y secar la muestra sólida con sulfato de sodio anhidro

(Na₂SO₄) [14, 79, 158, 159]. Normalmente se requiere un tratamiento de limpieza como SPE con alúmina y gel de sílice como resultado de la extracción. Sin embargo, en los últimos años la extracción Soxhlet ha sido reemplazada paulatinamente por otras técnicas igualmente efectivas, como UAE y PLE, que requieren menos tiempo y cantidad de extracción de disolvente.

Extracción en fase sólida. La preparación de muestras para SPE permite el análisis de residuos múltiples para compuestos con una amplia gama de propiedades fisicoquímicas y polaridades, al tiempo que permite su buen almacenamiento. Aunque el SPE se considera una técnica de extracción, en este tipo de matrices complejas se suele utilizar como tratamiento posterior con fines de limpieza. SPE combinado con un paso de extracción previo, se ha convertido en la opción más utilizada para limpiar una variedad de EDCs, PBDEs y PPCPs. Se han aplicado, en columna o cartuchos para la limpieza de extractos de lodos de depuradora, las tres clases de adsorbentes disponibles (fase inversa, fase normal o adsorbentes de modo mixto). Oasis[®] HLB (copolímero de divinilbenceno/N-vinilpirrolidona) ha sido la opción común para la purificación de PPCPs y EDCs utilizando SPE en los modos off-line y on-line [90, 150] a partir de matrices de lodos. Este adsorbente es el más versátil y muestra las mejores recuperaciones generales para la extracción de analitos de una amplia gama de polaridades [162]. Según estos autores, Oasis HLB mostró las mejores recuperaciones (85.4-105.8%) para la extracción de siete bisfenoles en un solo paso de extracción. En contraste, el cartucho GCB resultó en recuperaciones relativamente pobres (<60%) para BPS, TCBPA y TBBPA (analitos con mayor acidez) y C18 tuvo las tasas de recuperación más bajas (<20%) para BPS y BPF (analitos relativamente polares). Esto podría atribuirse a la fuerte unión con el adsorbente (GCB) y la débil absorbancia y pérdidas ocurridas durante la etapa de limpieza (C18). Li y col. [85] también evidenciaron buenas recuperaciones de parabenos en las muestras de lodos extraídas por HLB SPE (de 86.8% a 99.2%) con desviaciones estándar relativas (RSD = 5) de 1.1 a 8.6%. También se utilizó el modo SPE on-line con sorbente HLB para la determinación de antibióticos [90] y hormonas esteroideas, NP, OP, BPA, acoplado a análisis LC-MS/MS con sensibilidad moderada a buena [29, 53, 85, 118, 140, 150, 162, 170]. SPE (HLB) se ha utilizado comúnmente como un paso de limpieza de extractos de PLE y UAE

para una amplia variedad de EDCs debido a su versatilidad [10, 17, 18, 53, 117, 162]. Una desventaja de usar el cartucho Oasis HLB SPE es que no es selectivo y la coextracción de compuestos de la matriz puede causar una supresión significativa de la señal. Un procedimiento de limpieza adicional (por ejemplo, mediante el uso de cartuchos MAX) puede disminuir la supresión de la matriz, obteniendo una purificación eficaz y selectiva de todos los analitos diana [120, 162].

También se han utilizado adsorbentes de octadecil sílice (C18), Florisil, sílice y alúmina para analizar los EDCs. El C18 se ha empleado para la limpieza de hormonas esteroideas endógenas, etoxilatos de alquilfenol, bisfenol A y ftalatos [159], análogos de BPs [133], productos farmacéuticos [136], antibióticos [81] y BFRs emergentes [58]. Se utilizó LC-MS/MS como técnica analítica en todos los casos, excepto para la determinación de antibióticos y BFRs, donde se utilizó LC con detección ultravioleta (LC-UV) y LC-QqLIT-MS/MS. Florisil se aplicó en la extracción de PBDEs [52, 79] y filtros UV [79] para análisis por GC, y en la limpieza de retantes de llama, hexabromociclododecanos (HBCDs) [52] y retardantes de llama organofosforados (OPFRs) [88] mediante análisis por LC. Se ha utilizado adsorbente de gel de sílice para analizar retardantes de llama halogenados mediante HR-GC; y se utilizó un sistema Power Prep de purificación automatizado que incluye gel de sílice, alúmina básica y columnas de carbono para BFRs con análisis HRGC-TQMS/MS [41].

Los adsorbentes SPE en modo mixto se están volviendo cada vez más populares en aplicaciones farmacéuticas debido a su selectividad y retención únicas de una amplia variedad de compuestos [168]. Estos tipos de adsorbentes están diseñados químicamente para tener múltiples sitios de retención en una partícula individual al permitir la interacción con diferentes grupos funcionales [156]. Los solutos interactúan con la fase estacionaria a través de más de un modo de interacción, empleando la combinación de interacciones hidrófobas, hidrófilas e/o iónicas [69]. Los adsorbentes de modo mixto se pueden usar como un procedimiento de limpieza alternativo o complementario a la fase inversa tradicional, intercambio iónico y SPE de fase normal [168]. Un ejemplo es Oasis[®] MCX (modo mixto, intercambio de cationes

fuerte) que se ha utilizado principalmente para limpiar PBs y sus metabolitos [30, 75, 88, 89, 154] aunque también se ha aplicado en el caso de otros EDCs (como BPs, benzofenonas, filtros UV, entre otros) [74, 120, 165]. Se logró una sensibilidad considerable para los PBs después de la extracción y limpieza con MCX, con LODs que van desde 0.01-10.0 ng g⁻¹ [154], 0.01-5 ng L⁻¹ [75] y 0.2-0.5 ng L⁻¹ [30]. Otro ejemplo de adsorbente de modo mixto es Oasis[®] WAX (modo mixto, intercambio de aniones débiles) que se usa preferiblemente para la extracción de perfluorooctanoato, sulfonato de perfluorooctano y compuestos perfluoroalquilo [100, 132]. Aunque es menos común, se ha utilizado una amplia variedad de absorbentes para la limpieza de contaminantes emergentes en muestras de lodos de aguas residuales. Estos incluyen Phenomenex[®] Strata X (con base de polímero) [127], Evolute[®] ABN (poliestireno-divinilbenceno que incorpora grupos hidroxilo no ionizables) [5, 102], Carbograph-4 [26], Lichrolut[®] EN (polímero de etilvinilbenceno-divinilbenceno) [14], entre otros resumidos en las **Tablas II.5-7**.

Extracción asistida por ultrasonido. El mayor impacto de la energía ultrasónica en medios líquidos se atribuye a la cavitación acústica, efecto que genera numerosas burbujas, provocando erosión mecánica de sólidos y ruptura de partículas. UAE se ha utilizado cada vez más como una alternativa a la extracción Soxhlet. Aunque se utilizan disolventes similares en ambas técnicas, se considera que el volumen del disolvente de extracción y el tiempo de extracción se reducen con UAE. El baño de ultrasonido es la fuente de irradiación ultrasónica más barata y disponible. A pesar de eso, ahora se utiliza un sistema más eficiente: una potente sonda cilíndrica para la sonicación de muestras [141].

Esta técnica se ha aplicado en el estudio de una amplia gama de EDCs. Entre los compuestos extraídos con esta técnica se encuentran compuestos estrogénicos naturales y sintéticos [5, 18, 26, 142, 147, 159], antimicrobianos como TCS [23, 26, 138, 147] y TCC [23], antibióticos como quinolonas [45] y tetraciclinas [166], PPCPs [20, 51, 55, 98, 99, 136, 138, 164], BPA y/o análogos de BPs [26, 58, 100, 140, 147, 162], PBs [19, 23, 30], ésteres de ftalato [159] y filtros UV [23, 138], algunos retardantes de llama (PBDEs, HBCDDs, OPFRs y BRFs)

[101, 134, 157, 158, 163] y OPEs [39] y otros compuestos como alquilfenoles y etoxilatos de alquilfenoles [33, 159], compuestos perfluorados y polifluorados [26, 132], HAPs, PCBs [142] y clorofenoles [162]. UAE también se ha aplicado con éxito para la extracción de partículas orgánicas [16], α -Ag₂S [77], así como nanopartículas de TiO₂ y más grandes [78]. En cuanto a los disolventes empleados durante UAE, las mezclas con H₂O y MeOH (1:1, v/v) son las más utilizadas para la extracción de productos farmacéuticos seguidas de análisis por LC, según lo informado por varios [20, 51, 55, 100, 136, 138]. Aunque es menos común, también se han utilizado mezclas de MeOH con disolventes como ACN, DCM, acetona y hexano, o combinaciones de ambos. Por ejemplo, se utilizaron ACN y MeOH-ACN (1:1, v/v) (después de una extracción previa con ácido acético al 1% en MeOH) para la extracción de OPFRs [88] y perfluoroalquilcarboxilatos, perfluoroalquilsulfonatos [132] y OPEs [118], respectivamente. La acetona combinada con MeOH y H₂O o DCM también se aplicó en la determinación de varios EDCs [26, 159]. Se utilizó una mezcla de hexano-acetona (4:1, v/v) para la extracción de etoxilatos de alquilfenol y BRFs [33]; y MeOH seguido de una segunda extracción con DCM-hexano (1:1, v/v) se utilizó para la determinación de hormonas esteroideas y ftalatos [159] de muestras de lodo, junto con congéneres de PBDE y HBCD de biosólidos [52]. En el análisis por GC, además de los solventes orgánicos usados en LC, EtAc y ciclohexano también fueron reportados como solventes para extracción de compuestos estrogénicos [18], retardantes de llama [35], HAPs y PCBs [142]. En el caso de partículas orgánicas de α -Ag₂S y TiO₂, se emplearon tolueno [16] y H₂O destilada [77, 78] antes del análisis por APPI-MS, ICP-AES-TEM e ICP-ES, respectivamente. En general, el volumen requerido de extractante y el tiempo de extracción se reducen en comparación con los de la extracción Soxhlet. Una ventaja de la UAE es que la cantidad de disolvente de extracción necesaria, así como el tiempo de extracción, se reducen considerablemente en comparación con la extracción Soxhlet. El volumen es alrededor de diez veces menor (por ejemplo, se requieren 100 mL en Soxhlet y 10 mL en UAE) y el tiempo se acorta de horas a media hora de media, según la literatura [14].

Extracción por disolvente presurizado. Se emplean disolventes convencionales a presiones elevadas para alcanzar temperaturas superiores a

su punto de ebullición normal. De esta manera, se incrementa la solubilidad y la tasa de transferencia de masa de los analitos, obteniendo tiempos de extracción más cortos con una menor cantidad de disolvente [171]. En las últimas décadas, PLE se ha convertido en una estrategia habitual para la preparación de muestra, ya que es una técnica capaz de extraer EDCs en matrices sólidas. En comparación con los métodos de extracción tradicionales, como Soxhlet, utiliza menos disolvente y toma menos tiempo por muestra [137]. El volumen de disolvente de extracción (en el rango de 4 mL a 100 mL) es comparable con el requerido en UAE, pero el tiempo de extracción es más corto, generalmente por debajo de 30 min [137]. Además, PLE exhibe un alto nivel de automatización y la capacidad de realizar múltiples extracciones simultáneamente [44]. Se ha determinado una amplia variedad de EDCs objetivo a partir de muestras de lodo utilizando PLE como técnica de extracción. Entre estos, se han incluido congéneres de BPs y BPA [29, 44, 59], APs [59], hormonas esteroideas [29, 59, 66], retardantes de llama como los BFRs [40, 41, 59, 167] y retardantes de llama clorados [167], PBs [19, 58, 85] y algunos productos farmacéuticos [8], antibióticos [45, 53, 117] y antimicrobianos [40, 59]. También se ha realizado PLE utilizando diferentes tipos de disolventes o mezclas. Los retardantes de llama se han determinado mediante GC utilizando DCM, hexano y acetona como disolventes. Por ejemplo, para la extracción de congéneres de PBDE, HBB, PBEB y BBDPE, se utilizó una mezcla de hexano-DCM (1:1, v/v) a 100°C y 1500 psi en dos ciclos [58]; para congéneres de BDE también se utilizó hexano-DCM (1:1, v/v), a 40°C en una extracción estática [97]. Muchas de las mezclas de extracción combinan agua o MeOH con otros disolventes para análisis por LC adicionales, como MeOH-acetona (1:1, v/v), seguido de un ciclo H₂O-MeOH para la extracción de compuestos estrogénicos y BPA [29], H₂O-alcohol isopropílico (1:4, v/v) para los antimicrobianos TCS y TCC [10]; y ACN-H₂O (1:3, v/v) para antibióticos de sulfonamida [53]. En algunos métodos, se aplica MeOH como único disolvente de extracción para el análisis de PBs y metabolitos [19, 85] y productos farmacéuticos [8], o se mezcla con agua en diferentes proporciones para drogas ilícitas [102] y medicamentos contra el cáncer [130]. También se emplearon otros disolventes, como EtAc a 100°C y 1000 psi para BPA y sus

derivados de cloro [44], y DCM-hexano (3:1, v/v) a 90°C y 1500 psi para SPAs [92, 93]. En PLE, otros parámetros a tener en cuenta son la temperatura, la presión, el tiempo de extracción y el número de ciclos. En cuanto a la temperatura, normalmente oscila entre los 40 °C y los 120 °C. Se utilizó alta temperatura (120 °C) para extracciones de PBs [19] y TCC y TCS [10] con MeOH y H₂O-alcohol isopropílico, respectivamente. La presión de extracción en casi todos los casos se fijó en 1500 psi (10.34 MPa), aunque también se han empleado 1000 psi [44], 1250 psi [102] y 2001 psi [10]. En el caso del tiempo de extracción estática, generalmente se establece entre 2 y 16 minutos. El tiempo de extracción más utilizado es de 10 minutos [10, 41, 58, 66, 85, 92, 93]. El número de ciclos estudiados se encontró en el rango de 1-4 ciclos, aunque el más utilizado fue el de 3 ciclos [40, 41, 44, 53, 59, 92, 93, 167]. Solo un método informó el uso de 4 ciclos de extracción para el análisis de medicamentos contra el cáncer [130]. Después de la extracción del PLE, es habitual aplicar un paso de limpieza SPE usando diferentes tipos de cartuchos [117], ya que mejora la preconcentración de la muestra y reduce el efecto matriz [44]. Al igual que con otras técnicas de extracción basadas en disolventes, las sustancias que pueden interferir en la detección y cuantificación a menudo se extraen conjuntamente de la matriz de la muestra. Esta es la razón por la que generalmente se necesita una limpieza posterior a la extracción (por ejemplo, SPE, GPC o columnas cromatográficas empaquetadas) antes del análisis del extracto resultante de PLE [137]. En términos generales, PLE proporciona recuperaciones aceptables para la extracción de EDCs en muestras de lodos de depuradora similares a las obtenidas con técnicas como UAE y MAE, con algunas excepciones ocasionales. Por ejemplo, Benítez-Villalba et al. [19] compararon ambas técnicas de extracción (UAE y PLE) para la extracción de PBs y, aunque PLE proporcionó las recuperaciones más altas (especialmente para metil-, etil- y propilparabeno), ambos métodos exhibieron buenos parámetros analíticos y ninguna diferencia estadísticamente significativa con respecto a la precisión y sensibilidad. Pang y col. [118] han demostrado que PLE es un método de extracción más adecuado para OPEs. Si bien las recuperaciones variaron del 24 al 58% utilizando UAE, los resultados arrojaron recuperaciones en el rango de 56 a 119% con PLE, casi 2-4 veces más altas que las obtenidas con UAE.

Extracción asistida por microondas. MAE ofrece varias ventajas sobre otras técnicas como pequeñas cantidades de muestras, menor consumo de disolventes, tiempos de extracción más cortos y la capacidad de extraer una gran cantidad de muestras simultáneamente [62, 82]. Los disolventes necesarios para MAE tienen que absorber microondas con dipolo permanente, por lo que son limitados. A pesar de eso, la mezcla de disolventes con y sin dipolos abre una amplia variedad de mezclas de disolventes [171]. Se ha desarrollado el uso de MAE para extraer diferentes familias de EDCs a partir de matrices de lodos sólidos. Los métodos en la literatura han demostrado la extracción exitosa de hormonas esteroideas [62, 150], antibióticos quinolónicos [45], TCS [19], derivados del clorobromo [83], PBDEs [116], algunos productos farmacéuticos [13, 120] y otros EDCs como BPA [13, 14, 120, 150], filtros UV [120], PBs [14, 120], NP, OP y sus correspondientes etoxilatos [14, 68]. Se realizó una acetilación *in situ* con presencia de anhídrido acético durante el proceso MAE para la extracción de TCS y sus derivados [83]. Los extractos se suelen diluir con agua hasta un contenido de disolvente orgánico <5%. Luego, las disoluciones resultantes se tratan como una muestra líquida y se someten a un paso de limpieza antes del análisis. MAE en combinación con SPE para limpieza es la opción más utilizada para preparar muestras sólidas de acuerdo con la bibliografía descrita anteriormente. En cuanto a la potencia de microondas, cubre un amplio rango de 200 W a 1200 W. Por ejemplo, se utilizaron 1000 W para la determinación de antibióticos de quinolona [45], 500 W para el análisis de EDCs [13, 62] y 1200 W, la irradiación más fuerte, se realizó durante la determinación de PBDEs [116]. En el caso de los metales, es necesaria una digestión previa de la muestra. La digestión ácida con MAE se usa comúnmente en métodos para la determinación de nanopartículas en muestras de lodos de depuradora. La digestión ácida se realiza en la mayoría de los casos con HNO₃, puro o mezclado con H₂O₂, H₂O o HF, como se describe en la literatura publicada [54, 78, 96, 108, 143]. Algunos ejemplos se aplican en el caso de Ag/AgCl-NPs [96] y ZnO-NPs. Los análisis se realizaron con digestión por microondas para Ag-NPs y utilizando HNO₃, HF y H₂O doblemente desionizado, en proporción 1:1:1 (v/v/v), empleando un sistema MARS, para ZnO-NPs [54]. Por el contrario, Lombi et al. [95] utilizaron un procedimiento de digestión

inversa de agua regia por microondas (HCl-HNO₃, (1:3, v/v)) para la determinación de ZnO-NPs. La digestión de agua regia es un método adecuado para analizar metales recuperables totales en matrices complejas; por lo tanto, se aplicó con éxito en lodos de depuradora. Azzouz y Ballesteros [14] compararon las técnicas de extracción MAE, UAE y Soxhlet bajo variables óptimas para la determinación simultánea de 13 EDCs en muestras ambientales sólidas. Los mejores resultados se obtuvieron con MAE, con recuperaciones del 93 al 99%. Por el contrario, los de UAE fueron algo menos eficientes (recuperaciones del 81% al 95%), seguidos de la extracción de Soxhlet (recuperaciones del 70% al 89%). MAE fue la mejor opción en base a la cantidad de disolvente orgánico y el tiempo de extracción utilizado (10 min y 3 min, respectivamente).

Extracción por agua caliente presurizada. PHWE es una técnica sin disolventes orgánicos en la que se utiliza agua como disolvente de extracción a alta temperatura y presión. La base de esta técnica de extracción es la misma que la del PLE [94]. En PHWE también se estudian variables como temperatura de extracción, presión, número de ciclos y el volumen de descarga así mismo que en PLE. El pH del agua también es un factor que afecta la eficiencia de extracción cuando los analitos exhiben propiedades ácidas [171]. Se aplicó PHWE para la extracción de N-nitrosaminas en muestras de lodos de depuradora a pH 7.5, 125 °C y 1500 psi. Los periodos de precalentamiento y extracción estática fueron de 6 y 5 min, respectivamente, con un volumen de descarga del 60%. Se realizaron dos ciclos de extracción. Se realizó una microextracción previa en fase sólida del espacio en cabeza (HS-SPME) antes del análisis de N-nitrosaminas por GC-MS, obteniendo una sensibilidad considerable con LODs que van desde 0.03 a 0.15 ng g⁻¹ [94].

Dispersión en matriz en fase sólida. Aunque no es una técnica de extracción de uso común, la MSPD es una técnica muy adecuada para el tratamiento de matrices complejas [4, 15]. MSPD con matrices complejas, como lodos de depuradora, no solo asegura una extracción eficiente de los analitos similar a UAE y PLE, sino que también evita posibles interferencias. Permite la extracción y limpieza simultánea de compuestos con una notable reducción en el consumo

de disolventes, no requiere instrumentación costosa y es fácil de usar [3]. La MSPD se ha utilizado para la determinación de EDCs y PPCPs [19, 62, 89, 150, 154] en lodos de depuradora. La MSPD también se ha aplicado con éxito a la extracción de compuestos estrogénicos sintéticos y naturales [4], PBs [49, 61], TCS, TCC, BPA y algunos productos farmacéuticos [86, 87, 139] incluyendo AINE [46], filtros UV [139] y azoles clorados [25]. Entre las variables más importantes a controlar durante el proceso de extracción de MSPD se encuentran el disolvente extractor (usado como dispersante) y el disolvente de elución. Por ejemplo, para la extracción de PBs y subproductos clorados, se han probado varios disolventes de extracción como DCM, MeOH, EtAc y una mezcla EtAc-MeOH (9:1, v/v). EtAc mezclado con MeOH proporcionó las mejores recuperaciones (> 80%), por lo que esta mezcla se seleccionó como disolvente de extracción. Entre todos los adsorbentes de limpieza analizados (Florisil, alúmina y PSA), Florisil proporcionó, en general, los mejores resultados para todos los PB estudiados y, por lo tanto, fue seleccionado como sorbente de limpieza [3]. Este método obtuvo resultados de recuperación para parabenos entre 85 y 125%, en general similares a los descritos mediante extracción de sólido-líquido, UAE o PLE para muestras de suelo y sedimentos [19, 85, 89]. Para la extracción de compuestos estrogénicos en suelos enmendados con lodos se probaron diferentes disolventes, como acetato de etilo, ACN, MeOH y mezclas de estos. ACN-MeOH (9:1, v/v) con C18 fue el seleccionado [4].

Microextracción con adsorbentes empaquetados. MEPS es una nueva forma miniaturizada de SPE que se puede conectar on-line a GC o LC [110]. Desde que se introdujo esta técnica en 2004, ha sido ampliamente aceptada como una alternativa a otras técnicas de microextracción por sorción [1]. Es totalmente automatizado, más rápido y sencillo, y consume menos volumen de disolventes que las técnicas clásicas de preparación de muestras (SPE, extracción de líquidos, etc.). El empaque se inserta directamente en la jeringa y no en una columna separada. MEPS también se puede usar varias veces, hasta más de 400 veces para muestras de agua. Es otra ventaja sobre la columna SPE convencional que solo se utiliza una vez [97]. Puede manejar pequeños volúmenes de muestra (10 µL) así como grandes volúmenes (1000 µL). A pesar de que se aplica más comúnmente para el análisis de compuestos en fluidos

biológicos, como plasma, sangre y orina, los MEPS también se pueden usar para muestras de lodos. Por ejemplo, Martínez-Moral y Tena [97] aplicaron MEPS para la limpieza de extractos de PLE para la determinación de congéneres de BDEs por GC-MS/MS. El método optimizado proporcionó LODs en el rango de 0.01 y 0.04 ng g⁻¹ y buenas recuperaciones relativas (92-102%) en comparación con otros métodos utilizados para la determinación de PBDEs (congéneres de BDEs) por GC-MS/MS, utilizando técnicas clásicas como Soxhlet, UAE y PLE seguidas de SPE convencional.

Microextracción en fase sólida y microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (SPME y HS-SPME). SPME es un procedimiento de extracción por adsorción y desorción rápido, simple y eficiente, que elimina la necesidad de disolvente para concentrar analitos volátiles o no volátiles en matrices líquidas. En esta técnica, una cantidad muy pequeña de la fase extractora se coloca en una varilla delgada de sílice fundida. La pequeña geometría del dispositivo permite una rápida transferencia de masa durante la extracción y desorción, evita el taponamiento y supera las limitaciones de SPE [6]. SPME se ha aplicado con éxito para determinar una amplia gama de compuestos de EDCs como clorofenoles, compuestos estrogénicos, androsterona, DHT, 19-noretindrona, TCS y BPA [147], N-nitrosaminas [94] a PCP como fragancias macrocíclicas de almizcle [148] en muestras de lodos de depuradora acopladas a GC. Las muestras se diluyeron con agua ultrapura y se extrajeron eficientemente con fibra de policrilato [147], polidimetilsiloxano-divinilbenceno [148] o divinilbenceno-carboxeno-polidimetilsiloxano [94].

QuEChERS (Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe - Rápido, fácil, económico, eficaz, resistente y seguro). QuEChERS es una alternativa a la extracción tradicional líquido-líquido y en fase sólida [7]. Aunque se usa con menos frecuencia, también se han encontrado algunas aplicaciones para lodo de depuradora. Se ha utilizado con éxito para la determinación de productos farmacéuticos [27, 119], incluidos AINE [28, 127], bencenosulfonaminas, benzotiazoles y benzotriazoles [67], hormonas esteroideas naturales y sintéticas (compuestos estrogénicos y androgénicos) [5, 119], y otras clases de PCPs como PBs, TCC, BPA y benzofenonas [27, 28]. Además, la extracción de

QuEChERS se puede combinar con SPE on-line, consiguiendo una disminución notable del tiempo total de análisis junto con un aumento significativo de la preconcentración. El acoplamiento automático con LC-MS/MS se desarrolló en un trabajo para la determinación de compuestos farmacéuticos en lodos de depuradora [127]. Como se muestra en las tablas resumen, QuEChERS es, en términos generales, el método menos eficiente ya que ofrece recuperaciones que varían de 15 a >100%, como en la extracción de compuestos estrogénicos y farmacéuticos [119].

3.3.2. Análisis instrumental

Las técnicas más comunes empleadas para la detección y cuantificación de contaminantes emergentes en muestras de lodos de depuradora se resumen en las **Tablas II. 5-7**. Habitualmente se han empleado GC o LC acoplados a MS o MS/MS. Los compuestos orgánicos volátiles o volatilizables a menudo se separan mediante GC, mientras que la LC se aplica generalmente para compuestos polares y menos volátiles. Además, las determinaciones analíticas que implican cantidades traza de productos farmacéuticos normalmente emplean LC-MS/MS. En este caso, el efecto matriz es un inconveniente en el análisis de EDCs y PPCPs que implican ionización por electrospray (ESI) como fuente. Sin embargo, la GC, en combinación con la espectrometría de masas de ionización por impacto electrónico (EI) (GC-MS), puede ser aplicable para el análisis de estos compuestos sin un efecto matriz aparente. Además, es menos costoso y requiere menos operación que LC-MS/MS.

La GC exige habitualmente la inclusión de una reacción de derivatización con el fin de mejorar el comportamiento cromatográfico de los analitos y, aumentar la sensibilidad, selectividad y resolución de picos [93]. La mayoría de los EDCs requieren derivatización debido a su naturaleza polar. Este paso reduce la adsorción del analito a la columna cromatográfica y evita la descomposición térmica en el puerto del inyector [14]. Este paso adicional presenta varias desventajas en el tratamiento de la muestra, como un aumento de la complejidad del tratamiento y del tiempo total de análisis y más posibilidades de error. En este sentido, el GC se ha utilizado para analizar HAPs

y PCBs [142], sustancias fenólicas [14, 68, 93, 109, 147], filtros UV [169], fragancias macrocíclicas de almizcle [148], N-nitrosaminas [94], congéneres de PBDEs [32, 35, 40, 41, 52, 58, 97, 116] y otros retardantes de llama halogenados [40, 159, 167] en muestras de lodos de depuradora. BPA, PBs, TCS y productos farmacéuticos también se han cuantificado mediante esta técnica instrumental. Si bien algunos de estos compuestos se han determinado mediante GC sin una etapa de derivatización previa, la mayoría se obtienen con frecuencia antes de su análisis debido a su baja volatilidad y la presencia de grupos funcionales polares. Este es el caso de hidroxilo, EDCs fenólicos, aminas y amidas. Las diferentes estrategias de derivatización generalmente implican el uso de reactivos de acilación (generalmente acetilación), alquilación o sililación [3, 4, 164]. La mayoría de los métodos utilizados para retardantes de llama que involucran congéneres de PBDE no requieren una reacción de derivatización. Por el contrario, las hormonas sintéticas y naturales, las sustancias fenólicas y los productos farmacéuticos se han analizado comúnmente usando GC después de la sililación con N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) o N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) para formar derivados de trimetilsililo metoxilados (TMS). La derivatización de hormonas estrogénicas y algunos compuestos antiinflamatorios se realiza habitualmente utilizando BSTFA con piridina (1:1) [4, 17, 18], BSTFA con 1% de trimetilclorosilano (TMCS) [13] o BSTFA mezclado con ambos reactivos [68]; mientras que la progesterona y los andrógenos, como la testosterona, se han analizado usando MSTFA-TMIS-DTE (1000:2:5, v/v/v) [5, 68]. Los fenil y alquilfenoles que incluyen NP₁EO, NP₂EO, 4tOP y NP, BPA y PB se han analizado utilizando GC-MS en lodos de depuradora directamente [109, 147] o después de derivatizar con BSTFA [14, 68]. También se han empleado otros agentes de derivatización (MTBSTFA y HFBA + trietilamina) para estos compuestos [33, 58]. TCS se ha determinado usando GC-MS después de derivatizar con BSTFA 1% TMCS [13, 14], MTBSTFA [58] o con la técnica de acetilación in situ MAE usando anhídrido acético [83].

Dado que el análisis de contaminantes emergentes requiere alta selectividad y bajos LODs, la técnica más común reportada para muestras de lodos es la cromatografía de gases acoplada a MS y MS/MS, ya que cumplen con los requisitos para la determinación de estos compuestos (**Tabla II. 5**). El

detector de MS puede proporcionar una gran selectividad y sensibilidad, dependiendo del tipo de modo de ionización seleccionado. El modo de ionización EI es una de las primeras técnicas de ionización desarrolladas para espectrometría de masas y la opción más utilizada para la detección de EDCs en muestras de lodo mediante un acoplamiento a GC (**Tabla II. 5**). El modo de ionización química negativa (NCI) [32, 58, 83, 52, 107] se ha utilizado para los PBDEs, ya que a menudo ofrece una mayor sensibilidad que la EI. La GC, en combinación con la espectrometría de masas de iones negativos por captura de electrones (ECNI), es una herramienta versátil para la determinación de trazas de compuestos bromados en muestras ambientales [126]. Este método tiene utilidad porque solo detecta organohalógenos y hace que los compuestos coextraídos sean invisibles para la herramienta analítica [40, 159]. Por otro lado, se ha encontrado un trabajo en el que se usa la disociación inducida por colisión (CID) con GC-MS/MS para el análisis de nitrosaminas [94].

La espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) se ha relacionado habitualmente con la detección de NPs en matrices de lodo de depuradora. Las principales ventajas de esta técnica radican en la alta precisión, los bajos límites de detección, el bajo costo económico y el análisis multielemento y simultáneo de la mayoría de los elementos e isótopos presentes en la tabla periódica en pocos minutos. Se han analizado NPs que contienen Ag, Ti, Fe, Sn y Pb mediante el uso de esta herramienta [73, 95, 143]. La combinación de ICP con otros detectores también se aparece para el análisis de NPs (**Tabla II.7**) [77, 78, 96, 108].

Hoy en día, la LC acoplada a MS o MS/MS la opción más elegida para analizar un gran número de EDCs en muestras de lodos de depuradora (**Tabla II.6**). También se han encontrado trabajos de LC con otros detectores para la detección de EDCs en matrices de lodos. LC-MS permite una detección con alta sensibilidad y selectividad de compuestos muy polares, térmicamente inestables y de gran peso molecular, como es el caso de compuestos ácidos, esteroides y antibióticos, respectivamente. También se han empleado otros detectores, como UV o FLD para analizar antibióticos [81] y varios PPCPs, entre los que se encuentran antiinflamatorios, estrógenos, antibióticos, reguladores

de lípidos, β -bloqueantes, antiepilépticos y drogas estimulantes [98, 99]. En muchos casos, se ha seleccionado UHPLC en lugar de HPLC, ya que estas técnicas de LC muestran una mejor resolución y un tiempo de análisis más corto [10, 19, 23, 26, 27, 30, 51, 62, 65, 66, 88, 100, 118, 120, 150, 162, 166]. Con respecto al modo de ionización, ESI, tanto en modo positivo como negativo, ha sido elegido como la interfaz más sensible para ionizar estos compuestos antes de MS/MS. Solo en un trabajo analizado, la ionización se llevó a cabo mediante ionización química a presión atmosférica (APCI) durante la detección de BPA y sus derivados clorados [44]. APCI ofrece más opciones de ionización para compuestos de baja polaridad y, en cierta medida, suprime el efecto de la matriz; mientras que ESI puede provocar interferencias de fondo. Por otro lado, en el análisis LC-(Orbitrap)-MS para la detección de hormonas esteroideas se utilizó una fuente de ionización por electrospray calentada con interfaz de electrospray (HESI-II) [67].

El triple cuadrupolo (QqQ) se considera la herramienta más sensible y selectiva para la determinación de EDCs en muestras de lodos de depuradora. Sin embargo, avances recientes en LC-MS han demostrado que los analizadores de tiempo de vuelo (TOF) [119, 144] u orbitrap [67] son una alternativa muy adecuada a QqQ. Estos instrumentos permiten el cribado de analitos específicos y no específicos debido a su precisión de masa (<5 ppm) y su potencia de alta resolución. También se ha aplicado la trampa de iones lineal/triple cuadrupolo híbrido (QqLIT) en dos trabajos para el análisis de BFRs [58] y PPCPs [67]. En la mayoría de los casos, la mejor opción para el análisis de EDCs es el sistema MS que opera en modo ESI y MRM. MRM permite monitorear dos transiciones entre iones precursores y producto. Para cada compuesto, las energías de colisión óptimas se seleccionaron generalmente para obtener dos, tres o varias transiciones MRM características con la mejor intensidad de señal. Se elige el que tiene la mejor intensidad de señal para la cuantificación, y las otras mejores transiciones se utilizan para confirmar el compuesto [27]. Por tanto, es posible la identificación de los compuestos a partir de muestras de lodos a concentraciones muy bajas.

3.4. Conclusiones

El presente trabajo proporciona una revisión profunda de las principales técnicas de extracción e instrumentales utilizadas para la determinación de contaminantes emergentes en muestras de lodos de depuradora provenientes de diferentes ubicaciones de EDAR y su entorno. Las técnicas de tratamiento convencionales (agitación mecánica, agitación, Soxhlet), aunque todavía se usan para la extracción, presentan varios inconvenientes como la manipulación manual, tiempos de análisis prolongados y grandes volúmenes de disolvente. PLE, UAE o MAE se han adoptado ampliamente en los últimos 5 años para la extracción de varias clases de contaminantes emergentes de muestras de lodos de aguas residuales sólidas y semisólidas. SPE también se ha utilizado como técnica de extracción, así como como paso de limpieza para extractos después de someterse a otros procedimientos de extracción. La capacidad de extraer una gran variedad de compuestos con diversas propiedades fisicoquímicas hace que SPE sea la opción preferida para analizar EDCs y PPCPs, ya que permite el análisis de múltiples residuos de compuestos off-line u on-line. En los últimos años, nuevas técnicas de microextracción como MEPS, SPME, HS-SPME o QuEChERS se han convertido en una opción para el análisis de contaminantes emergentes de muestras de lodos, aunque el número de publicaciones que emplean estas técnicas no es tan extenso. Como puede observarse, los resultados de la recuperación variaron enormemente debido a la diversidad de clases químicas entre los EDCs seleccionados y a las diferencias entre los métodos de extracción utilizados. En términos generales, el rango de recuperaciones proporcionado por la mayoría de las técnicas estudiadas fue relativamente bueno (> 60%) pero con algunos casos excepcionales. Las recuperaciones superiores al 100% podrían explicarse por contribuciones de la heterogeneidad intrínseca y la complejidad de las matrices sólidas o por errores de método. QuEChERS demostró ser la técnica menos eficiente para la extracción de EDCs.

Las principales técnicas instrumentales empleadas para el análisis de muestras de lodos de depuradora son la cromatografía de líquidos y de gases acoplada a espectrometría de masas. Aunque se han utilizado diferentes clases de detectores (LC-DAD-FLD, LC-UV, TFC-LC-MS/MS, etc.) para determinar EDCs, PPCPs y PBDEs, el más utilizado sigue siendo la espectrometría de masas en

tándem acoplada a LC debido a su alta sensibilidad y selectividad. La medición de PLE seguida de LC-MS/MS es la opción más común para muchos autores para la detección de EDCs y PPCPs, dada su naturaleza polar. También se han empleado métodos alternativos como QuEChERS, MSPD o MEPS, antes del análisis LC-HRMS. Sin embargo, la cantidad de artículos publicados centrados en métodos de microextracción alternativos y novedosos es escasa. Para la determinación de PBDEs en muestras de lodos, la GC-MS es la técnica instrumental más utilizada. La GC-MS también se ha empleado para la determinación de EDCs y PPCPs, previa derivatización. El número de investigaciones relativas al análisis de nanopartículas de muestras de lodos es significativamente menor en comparación con el resto de compuestos estudiados. Sin embargo, la técnica más utilizada es ICP acoplada a una variedad de detectores, incluidos MS, AES, XAS u OES.

Para concluir, en los últimos años se ha observado un notable aumento en el número de publicaciones que emplean técnicas de extracción y cromatográficas novedosas para la determinación de contaminantes emergentes en muestras de lodos de depuradora. Esto sugiere que estos métodos están reemplazando rápidamente los procesos de tratamiento convencionales desarrollados previamente.

3.5. Referencias

- [1]. M. Abdel-Rehim, New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 801 (2004) 317–321, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.11.042>.
- [2]. M. Alaee, P. Arias, A. Sjödin, A. Bergman, An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release, *Environ. Int.* 29 (2003) 638–689, [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00121-1](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00121-1).
- [3]. B. Albero, R.A. Pérez, C. Sánchez-Brunete, J.L. Tadeo, Occurrence and analysis of parabens in municipal sewage sludge from wastewater

- treatment plants in Madrid (Spain), *J. Hazard. Mater.* 239–240 (2012) 48–55, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.05.017>.
- [4]. B. Albero, C. Sánchez-Brunete, E. Miguel, R.A. Pérez, J.L. Tadeo, Analysis of natural-occurring and synthetic sexual hormones in sludge-amended soils by matrix solid-phase dispersion and isotope dilution gas chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1283 (2013) 39–45, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.113>.
- [5]. B. Albero, C. Sánchez-Brunete, E. Miguel, R. Aznar, J.L. Tadeo, Rapid determination of natural and synthetic hormones in biosolids and poultry manure by isotope dilution GC–MS/MS, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 811–819, <https://doi.org/10.1002/jssc.201301037>.
- [6]. M.F. Alpendurada, Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis, *J. Chromatogr. A* 889 (2000) 3–14, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00453-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00453-2).
- [7]. M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck, Fast and easy multi-residue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412–431, <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>.
- [8]. P. Arbeláez, J. Granados, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurrull, Determination of sedative hypnotics in sewage sludge by pressurized liquid extraction with high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 3481–3488, <https://doi.org/10.1002/jssc.201400791>.
- [9]. P. Arbeláez, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurrull, Trace-level determination of sweeteners in sewage sludge using selective pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1408 (2016) 15–21, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.001>.
- [10]. D.L. Armstrong, C.P. Rice, M. Ramirez, A. Torrents, Influence of thermal hydrolysis-anaerobic digestion treatment of wastewater solids on

- concentrations of tri- closan, triclocarban, and their transformation products in biosolids, *Chemosphere* 171 (2017) 609–616, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.122>.
- [11]. M. Ashfaq, Y. Li, Y. Wang, D. Qin, M.S.U. Rehman, A. Rashid, C.P. Yu, Q. Sun, Monitoring and mass balance analysis of endocrine disrupting compounds and their transformation products in an anaerobic-anoxic-oxic wastewater treatment system in Xiamen, China, *Chemosphere* 204 (2018) 170–177, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.028>.
- [12]. M. Auriol, Y. Filali-Meknassi, R.D. Tyagi, C.D. Adams, R.Y. Surampalli, Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge, *Process Biochem.* 41 (2006) 525–539, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.09.017>.
- [13]. A. Azzouz, E. Ballesteros, 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 (2012) 208–215, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.12.058>.
- [14]. A. Azzouz, E. Ballesteros, 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. Bional. Chem.* 408 (2016) 231–241, <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9096-1>.
- [15]. S.A. Barker, Matrix solid phase dispersion (MSPD), *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007) 151–162, <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.06.005>.
- [16]. P.S. Bäuerlein, E. Emke, P. Tromp, J.A.M.H. Hofman, A. Carboni, F. Schooneman, P. de Voogt, A.P. van Wezel, Is there evidence for man-made nanoparticles in the Dutch environment? *Sci. Total Environ.* 576 (2017) 273–283, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.206>.
- [17]. D. Belhaj, R. Baccar, I. Jaabiri, J. Bouzid, M. Kallel, H. Ayadi, J.L. Zhou, Fate of selected estrogenic hormones in an urban sewage treatment plant in

- Tunisia (North Africa), *Sci. Total Environ.* 505 (2015) 154–160, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.018>.
- [18]. D. Belhaj, K. Athmouni, B. Jerbi, M. Kallel, H. Ayadi, J.L. Zhou, Estrogenic compounds in Tunisian urban sewage treatment plant: occurrence, removal and eco- toxicological impact of sewage discharge and sludge disposal, *Ecotoxicology* 25 (2016) 1849–1857, <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1733-8>.
- [19]. J.C. Benítez-Villalba, A. Zafra-Gómez, N. Dorival-García, F.J. Camino-Sánchez, S. Cantarero, J.L. Vílchez, Ultra-performance liquid chromatography MS/MS method for the determination of parabens in compost from sewage sludge: comparison of the efficiency of two extraction techniques, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 2635–2645, <https://doi.org/10.1002/jssc.201300318>.
- [20]. C. Boix, M. Ibáñez, D. Fabregat-Safont, E. Morales, L. Pastor, J.V. Sancho, J.E. Sánchez-Ramírez, F. Hernández, Analytical methodologies based on LC–MS/ MS for monitoring selected emerging compounds in liquid and solid phases of the sewage sludge, *MethodsX* 3 (2016) 333–342, <https://doi.org/10.1016/j.mex.2016.04.010>.
- [21]. J.M. Brausch, G.M. Rand, A review of personal care products in the aquatic environment: environmental concentrations and toxicity, *Chemosphere* 82 (2011) 1518–1532, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.11.018>.
- [22]. W.W. Buchberger, Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge, *Anal. Chim. Acta* 593 (2007) 129–139, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.05.006>.
- [23]. F.J. Camino-Sánchez, A. Zafra-Gómez, N. Dorival-García, B. Juárez-Jiménez, J.L. Vílchez, Determination of selected parabens, benzophenones, triclosan and triclocarban in agricultural soils after and before treatment with compost from sewage sludge: a lixiviation study, *Talanta* 150 (2016) 415–424, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.12.031>.

- [24]. C.G. Campbell, S.E. Borglin, F.B. Green, A. Grayson, E. Wozei, W.T. Stringfellow, Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: a review, *Chemosphere* 65 (2006) 1265–1280, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.08.003>.
- [25]. G. Castro, M. Roca, I. Rodríguez, M. Ramil, R. Cela, Identification and determination of chlorinated azoles in sludge using liquid chromatography quadrupole time-of-flight and triple quadrupole mass spectrometry platforms, *J. Chromatogr. A* 1476 (2016) 69–76, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.11.020>.
- [26]. C. Cavaliere, A.L. Capriotti, F. Ferraris, P. Foglia, R. Samperi, S. Ventura, A. Laganá, Multiresidue analysis of endocrine-disrupting compounds and per-fluorinated sulfates and carboxylic acids in sediments by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1438 (2016) 133–142, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.02.022>.
- [27]. M.B.R. Cerqueira, J.R. Guilherme, S.S. Caldas, M.L. Martins, R. Zanella, E.G. Primel, Evaluation of the QuEChERS method for the extraction of pharmaceuticals and personal care products from drinking-water treatment sludge with determination by UPLC-ESI-MS/MS, *Chemosphere* 107 (2014) 74–82, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.026>.
- [28]. M.B.R. Cerqueira, S.S. Caldas, E.G. Primel, 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 (2014) 10–22, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.002>.
- [29]. Q. Chen, J. Shi, W. Wu, X. Liu, H. Zhang, 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 (2012) 49–55, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.04.008>.

- [30]. J. Chen, B.F.G. Pycke, B.J. Brownawell, C.A. Kinney, E.T. Furlong, D.W. Kolpin, R.U. Halden, Occurrence, temporal variation, and estrogenic burden of five parabens in sewage sludge collected across the United States, *Sci. Total Environ.* 593–594 (2017) 368–374, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.162>.
- [31]. A. Christodoulou, K. Stamatelidou, Overview of legislation on sewage sludge management in developed countries worldwide, *Water Sci. Technol.* 73 (2016) 453–462, <https://doi.org/10.2166/wst.2015.521>.
- [32]. A. Cincinelli, T. Martellini, L. Misuri, E. Lanciotti, A. Sweetman, S. Laschi, I. Palchetti, PBDEs in Italian sewage sludge and environmental risk of using sewage sludge for land application, *Environ. Poll.* 161 (2012) 229–234, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.11.001>.
- [33]. T.B. Chokwe, J.O. Okonkwo, L.L. Sibali, E.J. Ncube, 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 (2015) 230–236, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.07.001>.
- [34]. B.O. Clarke, S.R. Smith, Review of "emerging" organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids, *Environ. Int.* 37 (2011) 226–247, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.06.004>.
- [35]. J. Cristale, S. Lacorte, Development and validation of a multiresidue method for the analysis of polybrominated diphenyl ethers, new brominated and organo-phosphorus flame retardants in sediment, sludge and dust, *J. Chromatogr. A* 1305 (2013) 267–275, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.028>.
- [36]. J. Cristale, S. Lacorte, PBDEs versus NBFR in wastewater treatment plants: occurrence and partitioning in water and sludge, *AIMS Environ. Sci.* 2 (2015) 533–546, <https://doi.org/10.3934/environsci.2015.3.533>.

- [37]. Council of the European Communities, Directive 86/278/EEC of 12 June 1986 on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture, Off. J. Eur. Commun. L181 (1986) 6.
- [38]. Council of the European Communities, Directive 91/271/EEC of May 21 1991 concerning urban wastewater treatment, Off. J. Eur. Commun. L135 (1991) 40.
- [39]. C.G. Daughton, T.A. Ternes, Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ. Health Perspect.* 107 (1999) 907–938, <https://doi.org/10.2307/3434573>.
- [40]. E.F. Davis, S.L. Klosterhaus, H.M. Stapleton, Measurement of flame retardants and triclosan in municipal sewage sludge and biosolids, *Environ. Int.* 40 (2012) 1–7, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.11.008>.
- [41]. A. de la Torre, M.A. Concejero, M.A. Martínez, Concentrations and sources of an emerging pollutant, decabromodiphenylethane (DBDPE), in sewage sludge for land application, *J. Environ. Sci.* 24 (2012) 558–563, [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(11\)60801-2](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(11)60801-2).
- [42]. E. Diamanti-Kandarakis, J.P. Bourguignon, L.C. Giudice, R. Hauser, G.S. Prins, A.M. Soto, R.T. Zoeller, A.C. Gore, Endocrine-disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement, *Endocr. Rev.* 30 (2009) 293–342, <https://doi.org/10.1210/er.2009-0002>.
- [43]. M.S. Díaz-Cruz, M.J. García-Galán, P. Guerra, A. Jelic, C. Postigo, E. Eljarrat, M. Farré, M.J. López de Alda, M. Petrovic, D. Barceló, Analysis of selected emerging contaminants in sewage sludge, *Trends Anal. Chem.* 28 (2009) 1263–1275, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.09.003>.
- [44]. N. Dorival-García, A. Zafra-Gómez, A. Navalón, J.L. Vilchez, 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 (2012) 1–10, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.08.045>.

- [45]. N. Dorival-García, A. Zafra-Gómez, F.J. Camino-Sánchez, A. Navalón, J.L. Vílchez, Analysis of quinolone antibiotic derivatives in sewage sludge samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: comparison of the efficiency of three extraction techniques, *Talanta* 106 (2013) 104–118, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.11.080>.
- [46]. K.I. Ekpeghere, J.W. Lee, H.Y. Kim, S.K. Shin, J.E. Oh, Determination and characterization of pharmaceuticals in sludge from municipal and livestock waste-water treatment plants, *Chemosphere* 168 (2017) 1211–1221, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.077>.
- [47]. K.M. El-Say, H.S. El-Sawy, Polymeric nanoparticles: promising platform for drug delivery, *Int. J. Pharm.* 528 (2017) 675–691, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.052>.
- [48]. EPA 505-F-17-015, Technical Fact Sheet – Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) and Polybrominated Biphenyls (PBBs), 2017.
- [49]. European Commission No. 01/2010, Working Document on Sludge and Biowaste 21st September 2010. Available at the site: <https://www.compostnetwork.info/download/no-012010-eu-working-document-sludge-biowaste> (Visited: 12/06/2018).
- [50]. European Commission (EU), Regulation 2017/227 of 9 February 2017 amending Annex XVII to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council concerning the registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals (REACH) as regards bis(pentabromophenyl)ether, *Off. J. Eur. Union* L35 (2017) 6.
- [51]. P. Gago-Ferrero, V. Borova, M.E. Dassenaki, N.S. Thomaidis, Simultaneous determination of 148 pharmaceuticals and illicit drugs in sewage sludge based on ultrasound-assisted extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 4287–4297, <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8540-6>.
- [52]. C. Gallen, D. Drage, S. Kaserzon, C. Baduel, M. Gallen, A. Banks, S. Broomhall, J.F. Mueller, Occurrence and distribution of brominated flame retardants and perfluoroalkyl substances in Australian landfill leachate

- and biosolids, *J. Hazard. Mater.* 312 (2016) 55–64, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.03.031>.
- [53]. M.J. García-Galán, S. Díaz-Cruz, D. Barceló, Multiresidue trace analysis of sulfo- namide antibiotics and their metabolites in soils and sewage sludge by pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography–electrospray-quadrupole linear ion trap mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1275 (2013) 32–40, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.004>.
- [54]. C. García-Gómez, M.D. Fernández, M. Babin, Ecotoxicological evaluation of sewage sludge contaminated with zinc oxide nanoparticles, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 67 (2014) 494–506, <https://doi.org/10.1007/s00244-014-0070-2>.
- [55]. A. García-Rodríguez, E. Sagristà, V. Matamoros, C. Fontàs, M. Hidalgo, V. Salvadó, Determination of pharmaceutical compounds in sewage sludge using a standard addition method approach, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 94 (2014) 1199–1209, <https://doi.org/10.1080/03067319.2014.921292>.
- [56]. E.M. Golet, I. Xifra, H. Siegrist, A.C. Alder, W. Giger, Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 3243–3249, <https://doi.org/10.1021/es0264448>.
- [57]. A.C. Gore, V.A. Chappell, S.E. Fenton, J.A. Flaws, A. Nadal, G.S. Prins, J. Toppari, R.T. Zoeller, EDC-2: The Endocrine Society’s second scientific statement on endo- crine disrupting chemicals, *Endocr. Rev.* 36 (2015) E1–E150, <https://doi.org/10.1210/er.2015-1010>.
- [58]. M. Gorga, E. Martínez, A. Ginebrada, E. Eljarrat, D. Barceló, Determination of PBDEs, HBB, PBEB, DBDPE, HBCD, TBBPA and related compounds in sewage sludge from Catalonia (Spain), *Sci. Total Environ.* 444 (2013) 51–59, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.11.066>.
- [59]. M. Gorga, S. Insa, M. Petrovic, D. Barceló, Analysis of endocrine disrupters and related compounds in sediment sand sewage sludge using on-line turbulent flow chromatography–liquid chromatography–tandem

- mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1352 (2014) 29–37, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.028>.
- [60]. T. Gorgy, L.Y. Li, J.R. Grace, M.G. Ikononou, An exploratory investigation on the mobility of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in biosolids-amended soil, *Water Air Soil Pollut.* 223 (2012) 2297–2309, <https://doi.org/10.1007/s11270-011-1024-1>.
- [61]. N. Gottschall, E. Topp, C. Metcalfe, M. Edwards, M. Payne, S. Kleywegt, P. Russell, D.R. Lapen, Pharmaceutical and personal care products in groundwater, subsurface drainage, soil, and wheat grain, following a high single application of municipal biosolids to a field, *Chemosphere* 87 (2012) 194–203, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.12.018>.
- [62]. R. Guedes-Alonso, S. Santana-Viera, S. Montesdeoca-Esponda, C. Afonso-Olivares, Z. Sosa-Ferrera, J.J. Santana-Rodríguez, 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 (2016) 6833–6844, <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9810-7>.
- [63]. M. Hadioui, V. Merdzan, K.J. Wilkinson, Detection and characterization of ZnO nanoparticles in surface and waste waters using single particle ICPMS, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 6141–6148, <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00681>.
- [64]. H. Hamid, C. Eskicioglu, Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: a review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix, *Water Res.* 46 (2012) 5813–5833, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.08.002>.
- [65]. M.G. Healy, O. Fenton, M. Cormican, D.P. Peyton, N. Ordsmith, K. Kimber, L. Morrison, Antimicrobial compounds (triclosan and triclocarban) in sewage sludges, and their presence in runoff following land application, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 142 (2017) 448–453, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.04.046>.

- [66]. P. Herrero, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurrull, Pressurised liquid extraction and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine endogenous and synthetic glucocorticoids in sewage sludge, *Talanta* 103 (2013) 186–193, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.10.030>.
- [67]. P. Herrero, F. Borrull, E. Pocurrull, R.M. Marcé, 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 (2014) 34–41, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.081>.
- [68]. B. Huang, X. Li, W. Sun, D. Ren, X. Li, X. Li, Y. Liu, Q. Li, X. Pan, 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 (2014) 12898–12908, <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3236-6>.
- [69]. C. Huang, Y. Li, J. Yang, J. Peng, J. Jin, J. Dhanjai, Wang, J. Chen, Preparation of a reversed-phase/anion-exchange mixed-mode spherical sorbent by Pickering emulsion polymerization for highly selective solid-phase extraction of acidic pharmaceuticals from wastewater, *J. Chromatogr. A* 1521 (2017) 1–9, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.09.021>.
- [70]. V.J. Inglezakis, A.A. Zorpas, A. Karagianides, P. Samaras, I. Voukalli, European Union legislation on sewage sludge management, in: *Proceedings of the 3rd International CEMEPE & SECOTOX Conference, Skiathos, 2011*, pp. 19–24.
- [71]. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors, in: T. Damstra, S. Barlow, A. Bergman, R. Kavlock, G. Van Der Kraak (Eds.), *International Programme on Chemical Safety, WHO/PCS/EDC/02.2 ed, 2002*.

- [72]. I. Jiménez-Díaz, F. Vela-Soria, R. Rodríguez-Gómez, A. Zafra-Gómez, O. Ballesteros, A. Navalón, Analytical methods for the assessment of endocrine disrupting chemical exposure during human fetal and lactation stages: a review, *Anal. Chim. Acta* 892 (2015) 27–48, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.08.008>.
- [73]. A.C. Johnson, M.D. Lawlor, A.J. Cisowska, Particulate and colloidal silver in sewage effluent and sludge discharged from British wastewater treatment plants, *Chemosphere* 112 (2014) 49–55, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.039>.
- [74]. R. Karthikraj, K. Kannan, Mass loading and removal of benzotriazoles, benzothiazoles, benzophenones, and bisphenols in Indian sewage treatment plants, *Chemosphere* 181 (2017) 216–223, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.075>.
- [75]. R. Karthikraj, A.K. Vasu, K. Balakrishna, R.K. Sinha, K. Kannan, Occurrence and fate of parabens and their metabolites in five sewage treatment plants in India, *Sci. Total Environ.* 593–594 (2017) 592–598, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.173>.
- [76]. H.Y. Kaw, N. Kannan, A review on polychlorinated biphenyls (PCBs) and poly-brominated diphenyl ethers (PBDEs) in South Asia with a focus on Malaysia, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 242 (2017) 153–181, https://doi.org/10.1007/398_2016_14.
- [77]. B. Kim, C.S. Park, M. Murayama, M.F. Hochella Jr., Discovery and characterization of silver sulfide nanoparticles in final sewage sludge products, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 7509–7514, <https://doi.org/10.1021/es101565j>.
- [78]. B. Kim, M. Murayama, B.P. Colman, M.F. Hochella, Characterization and environmental implications of nano-and larger TiO₂ particles in sewage sludge, and soils amended with sewage sludge, *J. Environ. Monit.* 14 (2012) 1128–1136, <https://doi.org/10.1039/C2EM10809G>.
- [79]. M. Kim, P. Guerra, M. Theocharides, K. Barclay, S.A. Smyth, M. Alaei, Polybrominated diphenyl ethers in sewage sludge and treated biosolids:

- effect factors and mass balance, *Water Res.* 47 (2013) 6496–6505, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.08.022>.
- [80]. M. Kim, L.Y. Li, T. Gorgy, J.R. Grace, Review of contamination of sewage sludge and amended soils by polybrominated diphenyl ethers based on meta-analysis, *Environ. Pollut.* 220 (2017) 753–765, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.053>.
- [81]. S.J. Kimosop, Z.M. Getenga, F. Orata, V.A. Okello, J.K. Cheruiyot, Residue levels and discharge loads of antibiotics in wastewater treatment plants (WWTPs), hospital lagoons, and rivers within Lake Victoria Basin, Kenya, *Environ. Monit. Assess.* 108 (2016) 532, <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5534-6>.
- [82]. K. Kotnik, T. Kosjek, U. Krajnc, E. Heath, Trace analysis of benzophenone-derived compounds in surface waters and sediments using solid-phase extraction and microwave-assisted extraction followed by gas chromatography–mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 3179–3190, <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7749-0>.
- [83]. H.B. Lee, J. Kohli, T.E. Peart, N. Nguyen, Selected chloro and bromo derivatives of triclosan-syntheses and their occurrence in Canadian sewage and biosolid samples, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21 (2014) 314–324, <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1880-x>.
- [84]. S. Lee, G.J. Song, K. Kannan, H.B. Moon, Occurrence of PBDEs and other alternative brominated flame retardants in sludge from wastewater treatment plants in Korea, *Sci. Total Environ.* 470–471 (2014) 1422–1429, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.118>.
- [85]. W. Li, Y. Shi, L. Gao, J. Liu, Y. Cai, Occurrence, fate and risk assessment of parabens and their chlorinated derivatives in an advanced wastewater treatment plant, *J. Hazard. Mater.* 300 (2015) 29–38, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.06.060>.
- [86]. M. Li, Q. Sun, Y. Li, M. Lv, L. Lin, Y. Wu, C.P. Yu, Simultaneous analysis of 45 pharmaceuticals and personal care products in sludge by matrix solid-

- phase dispersion and liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 4953–4964.
- [87]. M. Li, Q. Sun, Y. Li, M. Lv, L. Lin, Y. Wu, M. Ashfaq, C.P. Yu, Simultaneous analysis of 45 pharmaceuticals and personal care products in sludge by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 4953–4964, <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9590-0>.
- [88]. K. Liang, F. Shi, J. Liu, Occurrence and distribution of oligomeric organophosphorus flame retardants in different treatment stages of a sewage treatment plant, *Environ. Pollut.* 232 (2018) 229–235, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.036>.
- [89]. C. Liao, S. Lee, H.B. Moon, N. Yamashita, K. Kannan, Parabens in sediment and sewage sludge from the United States, Japan, and Korea: spatial distribution and temporal trends, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 10895–10902, <https://doi.org/10.1021/es402574k>.
- [90]. P.C. Lima Gomes, I.N. Tomita, Á.J. Santos-Neto, M. Zaiat, Rapid determination of 12 antibiotics and caffeine in sewage and bioreactor effluent by online column-switching liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 8787–8801, <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9038-y>.
- [91]. J.L. Liu, M.H. Wong, Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): a review on environmental contamination in China, *Environ. Int.* 59 (2013) 208–224, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.012>.
- [92]. R. Liu, S. Song, Y. Lin, T. Ruan, G. Jiang, Occurrence of synthetic phenolic antioxidants and major metabolites in municipal sewage sludge in China, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 2073–2080, <https://doi.org/10.1021/es505136k>.
- [93]. R. Liu, T. Ruan, S. Song, Y. Lin, G. Jiang, Determination of synthetic phenolic antioxidants and relative metabolites in sewage treatment plant and recipient river by high performance liquid chromatography–

- electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1381 (2015) 13–21, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.11.042>.
- [94]. A. Llop, F. Borrull, E. Pocurull, Pressurized hot water extraction followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of N-nitrosamines in sewage sludge, *Talanta* 88 (2012) 284–289, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.10.042>.
- [95]. E. Lombi, E. Donner, E. Tavakkoli, T.W. Turney, R. Naidu, B.W. Miller, K.G. Scheckle, Fate of zinc oxide nanoparticles during anaerobic digestion of wastewater and post-treatment processing of sewage sludge, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 9089–9096, <https://doi.org/10.1021/es301487s>.
- [96]. E. Lombi, E. Donner, S. Taheri, E. Tavakkoli, A.K. Jämting, R. Naidu, B.W. Miller, K.G. Scheckel, K. Vasiley, Transformation of four silver/silver chloride nano- particles during anaerobic treatment of wastewater and post-processing of sewage sludge, *Environ. Pollut.* 176 (2013) 193–197, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.01.029>.
- [97]. M.P. Martínez-Moral, M.T. Tena, Use of microextraction by packed sorbents following selective pressurised liquid extraction for the determination of brominated diphenyl ethers in sewage sludge by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1364 (2014) 28–35, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.08.075>.
- [98]. J. Martín, D. Camacho-Muñoz, J.L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso, Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants: removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal, *J. Hazard. Mater.* 239–240 (2012) 40–47, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.068>.
- [99]. J. Martín, M.D. Camacho-Muñoz, J.L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso, Distribution and temporal evolution of pharmaceutically active compounds alongside sewage sludge treatment. Risk assessment of sludge application onto soils, *J. Environ. Manag.* 102 (2012) 18–25, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.02.020>.

- [100]. Y.B. Man, K.L. Chow, Y.F. Tsang, F.T. Kwong Lau, W.C. Fung, M.H. Wong, Fate of bisphenol A, perfluorooctanoic acid and perfluorooctanesulfonate in two different types of sewage treatment works in Hong Kong, *Chemosphere* 190 (2018) 358–367, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.001>.
- [101]. S. Manzetti, D. van der Spoel, Impact of sludge deposition on biodiversity, *Ecotoxicology* 24 (2015) 1799–1814, <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1530-9>.
- [102]. N. Mastroianni, C. Postigo, M. Lopez de Alda, D. Barcelo, Illicit and abused drugs in sewage sludge: method optimization and occurrence, *J. Chromatogr. A* 1322 (2013) 29–37, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.078>.
- [103]. Y. Masuo, M. Ishido, Neurotoxicity of endocrine disruptors: possible involvement in brain development and neurodegeneration, *J. Toxicol. Environ. Health B* 14 (2011) 346–369, <https://doi.org/10.1080/10937404.2011.578557>.
- [104]. M. Matejczyk, G.A. Płaza, G. Nałęcz-Jawecki, K. Ulfig, A. Markowska-Szczupak, Estimation of the environmental risk posed by landfills using chemical, micro- biological and ecotoxicological testing of leachates, *Chemosphere* 82 (2011) 1017–1023, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.066>.
- [105]. T.A. McDonald, A perspective on the potential health risks of PBDEs, *Chemosphere* 46 (2002) 745–755, [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00239-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00239-9).
- [106]. T.J. McGrath, A.S. Ball, B.O. Clarke, Critical review of soil contamination by polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and novel brominated flame retardants (NBFRs); concentrations, sources and congener profiles, *Environ. Pollut.* 230 (2017) 741–757, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.009>.
- [107]. M.S. McLachlan, A. Kierkegaard, M. Radke, A. Sobek, A. Malmvärn, T. Alsberg, J.A. Arnot, T.N. Brown, F. Wania, K. Breivik, S. Xu, Using model-

- based screening to help discover unknown environmental contaminants, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 7264–7271, <https://doi.org/10.1021/es5010544>.
- [108]. Meier, A. Voegelin, A. Pradas del Real, G. Sarret, C.R. Mueller, R. Kaegi, Transformation of silver nanoparticles in sewage sludge during incineration, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 3503–3510, <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04804>.
- [109]. J. Milinovic, M. Vidal, S. Lacorte, A. Rigol, Leaching of heavy metals and alkyl-phenolic compounds from fresh and dried sewage sludge, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21 (2013) 2009–2017.
- [110]. M.M. Moein, A. Abdel-Rehim, M. Abdel-Rehim, Microextraction by packed sorbent (MEPS), *Trends Anal. Chem.* 67 (2015) 34–44, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.12.003>.
- [111]. S. Mompelat, B. Le Bot, O. Thomas, Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water, *Environ. Int.* 35 (2009) 803–814, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.10.008>.
- [112]. Muresan, C. Lorgeoux, J. Gasperi, R. Moilleron, Fate and spatial variations of polybrominated diphenyl ethers in the deposition within a heavily urbanized area: case of Paris (France), *Water Sci. Technol.* 62 (2010) 822–828, <https://doi.org/10.2166/wst.2010.93>.
- [113]. Y. Nie, Z. Qiang, H. Zhang, C. Adams, 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 (2009) 7071–7080, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.08.064>.
- [114]. A. Nieto, F. Borrull, E. Pocurull, R.M. Marcé, Pressurized liquid extraction: a useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge, *Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 752–764, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.03.014>.

- [115]. G.J. Nohynek, C.J. Borgert, D. Dietrich, K.K. Rozman, Endocrine disruption: fact or urban legend? *Toxicol. Lett.* 223 (2013) 295–305, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.10.022>.
- [116]. P. Novak, T. Zuliani, R. Milačič, J. Ščančar, Development of an analytical method for the determination of polybrominated diphenyl ethers in sewage sludge by the use of gas chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 915 (2016) 27–35, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.02.022>.
- [117]. A. Pamreddy, M. Hidalgo, J. Havel, V. Salvadó, Determination of antibiotics (tetracyclines and sulfonamides) in biosolids by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1298 (2013) 68–75, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.05.014>.
- [118]. L. Pang, P. Yang, L. Ge, J. Du, H. Zhang, Accelerated solvent extraction combined with solid phase extraction for the determination of organophosphate esters from sewage sludge compost by UHPLC–MS/MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 1435–1440, <https://doi.org/10.1007/s00216-016-0078-8>.
- [119]. W. Peysson, E. Vulliet, 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 (2013) 46–61, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.03.057>.
- [120]. B. Petrie, J. Youdan, R. Barden, B. Kasprzyk-Hordern, 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 (2016) 64–78, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.12.036>.
- [121]. Piao, L. Chen, Y. Wang, A review of the extraction and chromatographic determination methods for the analysis of parabens, *J. Chromatogr. B* 969 (2017) 139–148, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.08.015>.

- [122]. T. Qiao, Z. Yu, X. Zhang, D.W. Au, Occurrence and fate of pharmaceuticals and personal care products in drinking water in southern China, *J. Environ. Monit.* 13 (2011) 3097–3103, <https://doi.org/10.1039/c1em10318k>.
- [123]. S. Rattan, C. Zhou, C. Chiang, S. Mahalingam, E. Brehm, J.A. Flaws, Exposure to endocrine disruptors during adulthood: consequences for female fertility, *J. Endocrinol.* 233 (2017) R109–R129, <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0023>.
- [124]. Real Decreto 1310/1990, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Boletín Oficial del Estado (BOE), State Official Newsletter, BOE-A-1990-26490, 262, 1990, p. 32339.
- [125]. J. Roberts, A. Kumar, J. Du, C. Hepplewhite, D.J. Ellis, A.G. Christy, S.G. Beavis, Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Australia's largest inland sewage treatment plant, and its contribution to a major Australian river during high and low flow, *Sci. Total Environ.* 541 (2016) 1625–1637, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.145>.
- [126]. N. Rosenfelder, W. Vetter, Gas chromatography coupled to electron capture negative ion mass spectrometry with nitrogen as the reagent gas – an alternative method for the determination of polybrominated compounds, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 3807–3812, <https://doi.org/10.1002/rcm.4327>.
- [127]. Rossini, L. Ciofi, C. Ancillotti, L. Checchini, M.C. Bruzzoniti, L. Rivoira, D. Fibbi, S. Orlandini, M. Del Bubba, Innovative combination of QuEChERS extraction with on-line solid-phase extract purification and pre-concentration, followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their metabolites in sewage sludge, *Anal. Chim. Acta* 935 (2016) 269–281, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.06.023>.
- [128]. T. Saeed, N. Al-Jandal, A. Abusam, H. Taqi, A. Al-Khabbaz, J. Zafar, Sources and levels of endocrine disrupting compounds (EDCs) in Kuwait's coastal areas, *Mar. Pollut. Bull.* 118 (2017) 407–412, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.03.010>.

- [129]. M. Scheurer, M. Ramil, C.D. Metcalfe, S. Groh, T.A. Ternes, The challenge of analyzing beta-blocker drugs in sludge and wastewater, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 845–856, <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3225-7>.
- [130]. J. Seira, C. Claparols, C. Joannis-Cassan, C. Albasia, M. Montréjaud-Vignoles, Sablayrolles, Optimization of pressurized liquid extraction using a multivariate chemometric approach for the determination of anticancer drugs in sludge by ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1283 (2013) 27–38, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.114>.
- [131]. Sewage Sludge Production and Disposal, Eurostat. Last update 15/09/2017. Available at: http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=env_ww_spd&lang=en (Visited: 05/04/2018).
- [132]. O. Sindiku, F. Orata, R. Weber, O. Osibanjo, Per- and polyfluoroalkyl substances in selected sewage sludge in Nigeria, *Chemosphere* 92 (2013) 329–335, <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2100-4>.
- [133]. S. Song, M. Song, L. Zeng, T. Wang, R. Liu, T. Ruan, G. Jiang, Occurrence and profiles of bisphenol analogues in municipal sewage sludge in China, *Environ. Pollut.* 186 (2014) 14–19, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.11.023>.
- [134]. A.S. Stasinakis, Review on the fate of emerging contaminants during sludge anaerobic digestion, *Bioresour. Technol.* 121 (2012) 432–440, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.074>.
- [135]. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, Recommendations of the Persistent Organic Pollutants Review Committee of the Stockholm Convention to Amend Annexes A, B or C of the Convention, 2009. Available at: <http://chm.pops.int> (Visited 05/04/2018).
- [136]. B. Subedi, S. Lee, H.B. Moon, K. Kannan, Emission of artificial sweeteners, select pharmaceuticals, and personal care products through sewage

- sludge from waste- water treatment plants in Korea, *Environ. Int.* 68 (2014) 33–40, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.03.006>.
- [137]. B. Subedi, L. Aguilar, E.M. Robinson, D.J. Hageman, E. Björklund, R.J. Sheesley, S. Usenko, Selective pressurized liquid extraction as a simple-preparation technique for persistent organic pollutants and contaminants of emerging concern, *Trends Anal. Chem.* 68 (2015) 119–132, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.02.011>.
- [138]. B. Subedi, K. Balakrishna, D.I. Joshua, K. Kannan, Mass loading and removal of pharmaceuticals and personal care products including psychoactives, anti-hypertensives, and antibiotics in two sewage treatment plants in southern India, *Chemosphere* 167 (2017) 429–437, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.026>.
- [139]. Q. Sun, M. Li, C. Ma, X. Chen, X. Xie, C.P. Yu, Seasonal and spatial variations of PPCP occurrence, removal and mass loading in three wastewater treatment plants located in different urbanization areas in Xiamen, China *Environ. Pollut.* 208 (2016) 371–381, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.10.003>.
- [140]. Q. Sun, Y. Wang, Y. Li, M. Ashfaq, L. Dai, X. Xie, C.P. Yu, Fate and mass balance of bisphenol analogues in wastewater treatment plants in Xiamen City, China, *Environ. Pollut.* 225 (2017) 542–549, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.03.018>.
- [141]. J.L. Tadeo, C. Sánchez-Brunete, B. Albero, A.I. García-Valcárcel, Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2415–2440, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.066>.
- [142]. S.I. Torri, C. Alberti, Characterization of organic compounds from biosolids of Buenos Aires city, *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 12 (2012) 143–152, <https://doi.org/10.4067/S0718-95162012000100012>.
- [143]. Tou, Y. Yang, J. Feng, Z. Niu, H. Pan, Y. Quin, X. Guo, X. Meng, M. Liu, M.F. Hochella, Environmental risk implications of metals in sludge from waste water treatment plants: the discovery of vast stores of metal-containing

- nano-particles, *Environ. Sci. Technol.* 51 (2017) 4831–4840, <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05931>.
- [144]. S. Trinanes, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, Matrix solid-phase dispersion followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in sewage sludge samples, *J. Chromatogr. A* 1462 (2016) 35–43, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.07.044>.
- [145]. US EPA, Sampling Procedures Sewage Sludge Survey, U.S. Environmental Protection Agency, 1988. Available at: <https://www.epa.gov/biosolids/sewage-sludge-surveys> (Visited 05/04/2018).
- [146]. US-EPA, An Exposure Assessment of Polybrominated Diphenyl Ethers, 2010. <http://www.epa.gov/ncea> (Visited: 05/04/2018).
- [147]. N. Vakondios, A.A. Mazioti, E.E. Koukouraki, E. Diamadopoulos, An analytical method for measuring specific endocrine disruptors in activated sludge (biosolids) using solid phase microextraction-gas chromatography, *J. Environ. Chem. Eng.* 4 (2016) 1910–1917, <https://doi.org/10.1016/j.jece.2016.03.018>.
- [148]. L. Vallecillos, E. Pocrull, F. Borrull, A simple and automated method to determine macrocyclic musk fragrances in sewage sludge samples by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1314 (2013) 38–43, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.09.033>.
- [149]. S.P.J. Van Leeuwen, J. De Boer, Extraction and clean-up strategies for the analysis of poly- and perfluoroalkyl substances in environmental and human matrices, *J. Chromatogr. A* 1153 (2007) 172–185, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.069>.
- [150]. T. Vega-Morales, Z. Sosa-Ferrera, J.J. Santana-Rodríguez, 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 (2013) 1486, <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1486-4>.
- [151]. P. Verlicchi, E. Zambello, 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 (2015) 750–767, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.108>.
- [152]. S. Vigneswaran, *Water and Wastewater Treatment Technologies Volume I. Encyclopedia of Life Support Systems*, (2009) ISBN 978-1-84826-638-4.
- [153]. Walters, K. McClellan, R.U. Halden, Occurrence and loss over three years of 72 pharmaceuticals and personal care products from biosolids-soil mixtures in out- door mesocosms, *Water Res.* 44 (2010) 6011–6020, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.051>.
- [154]. W. Wang, K. Kannan, Fate of parabens and their metabolites in two wastewater treatment plants in New York State, United States, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 1174–1181, <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05516>.
- [155]. J. Wang, S. Wang, Removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) from wastewater: a review, *J. Environ. Manag.* 182 (2016) 620–640, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.07.049>.
- [156]. M.J.M. Wells, *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, USA, 2003, p. 96, <https://doi.org/10.1002/0471457817>.
- [157]. J. Wilkinson, P.S. Hooda, J. Barker, S. Barton, J. Swinden, Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water: an overarching review of the field, *Environ. Pollut.* 231 (2017) 954–970, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.032>.
- [158]. M.B. Woudneh, J.P. Benskin, G. Wang, R. Grace, M.C. Hamilton, J.R. Cosgrove, 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 (2015) 149–155, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.04.026>.

- [159]. Qia Wu, H. Li, D.T.F. Kuo, S. Chen, B. Mai, H. Li, Z. Liu, M. Deng, H. Zheng, X. Hu, X. Geng, Y. Chen, Occurrence of PBDEs and alternative halogenated flame retardants in sewage sludge from the industrial city of Guangzhou, China, *Environ. Pollut.* 220 (2017) 63–71, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.023>.
- [160]. Qih Wu, J.C.W. Lam, K.Y. Kwok, M.M.P. Tsui, P.K.S. Lam, Occurrence and fate of endogenous steroid hormones, alkylphenol ethoxylates, bisphenol A and phthalates in municipal sewage treatment systems, *J. Environ. Sci.* 61 (2017) 49–58, <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.02.021>.
- [161]. N. Xiang, X. Zhao, X.Z. Meng, L. Chen, Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in a conventional wastewater treatment plant (WWTP) from Shanghai, the Yangtze River Delta: implication for input source and mass loading, *Sci. Total Environ.* 461–462 (2013) 391–396, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.05.019>.
- [162]. Y. Yang, L. Lu, J. Zhang, Y. Yang, Y. Wu, B. Shao, Simultaneous determination of seven bisphenols in environmental water and solid samples by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1328 (2014) 26–34, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.12.074>.
- [163]. Y. Yang, Y.S. OK, K.H. Kim, E.E. Kwon, Y.F. Tsang, 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 (2017) 303–320, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.102>.
- [164]. Y. Yu, L. Wu, Analysis of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products in sewage sludge by gas chromatography–mass spectrometry, *Talanta* 89 (2012) 258–263, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.12.023>.
- [165]. X. Yu, J. Xue, H. Yao, Q. Wu, A.K. Venkatesanc, R.U. Haldenc, K. Kannan, Occurrence and estrogenic potency of eight bisphenol analogs in sewage sludge from the U.S. EPA targeted national sewage sludge survey, *J.*

- Hazard. Mater. 299 (2015) 733–739, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.07.012>.
- [166]. X. Yuan, Z. Qiang, W. Ben, B. Zhu, J. Liu, Rapid detection of multiple class pharmaceuticals in both municipal wastewater and sludge with ultrahigh performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Environ. Sci.* 26 (2014) 1949–1959, <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.06.022>.
- [167]. L. Zeng, R. Yang, Q. Zhang, H. Zhang, K. Xiao, H. Zhang, Y. Wang, P.K.S. Lam, G. Jiang, Current levels and composition profiles of emerging halogenated flame retardants and dehalogenated products in sewage sludge from municipal waste- water treatment plants in China, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 12586–12594, <https://doi.org/10.1021/es503510q>.
- [168]. K. Zhang, X. Liu, Mixed-mode chromatography in pharmaceutical and biopharmaceutical applications, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 128 (2016) 73–88, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.05.007>.
- [169]. X. Zhao, Z.F. Zhang, L. Xu, L.Y. Liu, W.W. Song, F.J. Zhu, Y.F. Li, W.L. Ma, Occurrence and fate of benzotriazoles UV filters in a typical residential wastewater treatment plant in Harbin, China, *Environ. Pollut.* 227 (2017) 215–222, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.072>.
- [170]. L.J. Zhou, G.G. Ying, S. Liu, J.L. Zhao, B. Yang, Z.F. Chen, H.J. Lai, Occurrence and fate of eleven classes of antibiotics in two typical wastewater treatment plants in South China, *Sci. Total Environ.* 452–453 (2013) 365–376, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.03.010>.
- [171]. O. Zuloaga, P. Navarro, E. Bizkarguenaga, A. Iparraguirre, A. Vallejo, M. Olivares, A. Prieto, Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: a review, *Anal. Chim. Acta* 736 (2012) 7–29, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.01>.

CAPÍTULO III

Mytilus galloprovincialis

1. OBJETIVOS

Los objetivos principales del trabajo realizado y presentado en este capítulo son:

- Proponer un método de buenas características desde el punto de vista analítico para el análisis de disruptores endocrinos químicos (bisfenoles, parabenos y triclocarbán) mediante cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem de triple cuadrupolo (LC-MS/MS) en muestras de mejillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*).
- Aplicar la técnica de extracción asistida por ultrasonidos seguida de un proceso de limpieza de los extractos con adsorbentes dispersivos.
- Llevar a cabo la validación del método analítico propuesto, de acuerdo a los requerimientos de las guías de validación aplicables, en términos de linealidad, exactitud (veracidad y precisión), sensibilidad, y selectividad.
- Aplicar la metodología desarrollada en el control y evaluación del contenido de los disruptores endocrinos seleccionados en muestras de mejillón mediterráneo capturadas en su medio natural en la costa de Granada.

2. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS

Se trata de una herramienta poderosa, de alta reproducibilidad, con tiempos de análisis cortos, lo que reduce el consumo de disolventes y simplifica el procesamiento. Es una técnica de gran ayuda puesto que también puede ser utilizada para otros procesos como homogenización, dispersión en suspensión acuosa, derivatización o lavado⁸⁹. El ultrasonido tiene una frecuencia mucho mayor que el rango audible a los humanos (10-16 kHz)⁹⁰ (**Figura III.1**).

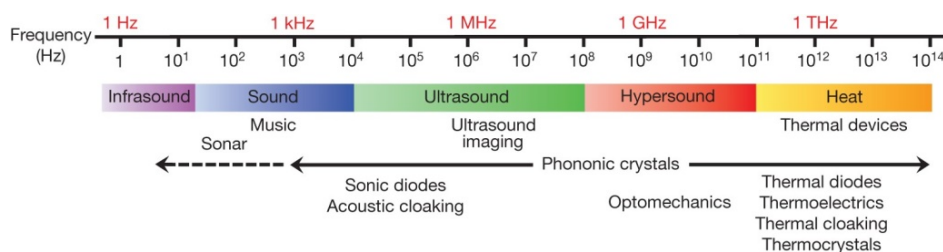


Figura III. 1. Región de frecuencia del sonido⁹¹.

Las ondas de sonido son vibraciones mecánicas en un sólido, líquido o gas. Cuando se sonicen líquidos a altas intensidades, las ondas de sonido que se propagan al medio líquido dan como resultado ciclos alternos de alta presión (compresión, las moléculas se acercan y chocan) y baja presión (expansión, las moléculas se separan por la presión negativa ejercida), como se muestra en la **Figura III.2**. La magnitud de la presión negativa depende de la naturaleza y pureza del líquido⁹².

⁸⁹ Luque-García, J.L., Luque de Castro, M.D. Ultrasound: a powerful tool for leaching. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22:1 (2003) 41-47.

⁹⁰ Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.S., Abert-Vian, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34 (2017) 540-560.

⁹¹ Maldovan, M. Sound and heat revolutions in phononics. *Nature*, 503 (2013) 209-217.

⁹² Mason, T.J., Lorimer, J.P. Applied Sonochemistry: uses of power ultrasound chemistry and processing. General Principles. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2 (2003) 25-74.

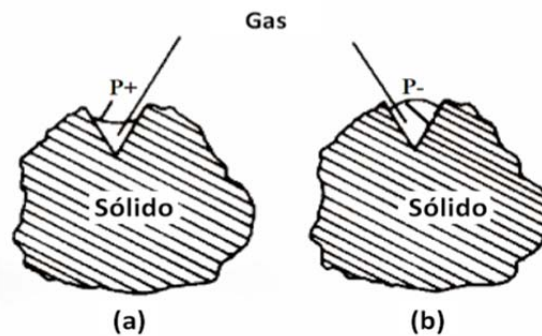


Figura III. 2. Efecto del gas aprisionado en el poro de una partícula: (a) presión positiva, (b) presión negativa⁹³.

Durante el ciclo de expansión, las ondas ultrasónicas de alta intensidad crean pequeñas burbujas de vacío en el líquido. Cuando las burbujas alcanzan un volumen en el que ya no pueden absorber energía, colapsan durante un ciclo de alta presión. Este fenómeno se denomina *cavitación* (**Figura III.3**). El colapso de las burbujas de cavitación genera condiciones locales extremas: temperaturas muy altas (aproximadamente 5000 K) y presiones (estimadas de 1000 atm)⁹⁴.

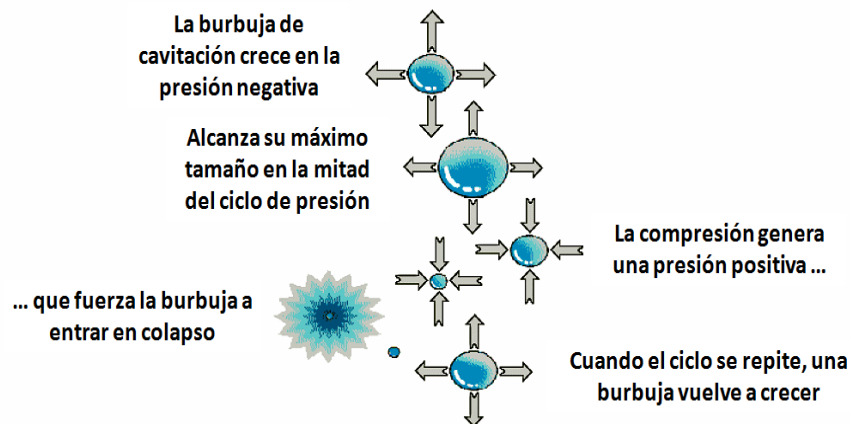


Figura III. 3. Esquema de la implosión de una burbuja⁹³.

⁹³ Lorimer, J.P., Mason T.J. Sonochemistry Part 1 – The physical aspect. *Chemical Society Reviews*, 16 (1987) 239-274.

⁹⁴ Suslick, K.S. Price, G.J. Applications of Ultrasound to Materials Chemistry. *Annual Review of Materials Science*, 29 (1999) 295-326.

Este fenómeno de cavitación acústica ocasiona una interacción única entre la materia y la energía. Cuando esto sucede, la dinámica del colapso de la cavidad cambia de manera drástica. La energía potencial de la burbuja en expansión se convierte en energía cinética, que viaja a una velocidad considerable y así alcanzar el recorrido de las partículas de la matriz. Estas colisiones provocan la ruptura de la misma generando partículas más pequeñas, exponiendo una mayor superficie al disolvente⁹⁵. Este hecho, sumado a la alta temperatura que conduce a una mayor solubilidad y difusividad, y la alta presión que facilita la penetración y el transporte, justifican la alta capacidad de extracción de esta técnica y se considera una técnica robusta para extraer contaminantes orgánicos de matrices sólidas⁹⁶.

Habitualmente se utilizan dos tipos de dispositivos para la extracción por ultrasonido: baños y sondas. Los baños son los más empleados, en cambio, muestran desventajas como la falta de uniformidad en la distribución de la energía y la disminución de la potencia con el tiempo. Esto está acompañado de una reducción de la repetibilidad y la reproducibilidad. Por otro lado, los sistemas que emplean sondas de ultrasonido tienen la ventaja de enfocar su energía en una región localizada, por lo que proporciona una cavitación más eficiente en el líquido.

En el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se ha utilizado el sistema de sonda, mediante un diseño mostrado en la **Figura III.4**.

⁹⁵ Capelo, J.L., Mota A.M. Ultrasonication for analytical chemistry. *Current Analytical Chemistry*, 1:2 (2005) 193–201.

⁹⁶ Bossio, J.P., Harry J., Kinney C.A. Application of ultrasonic assisted extraction of chemically diverse organic compounds from soils and sediments. *Chemosphere*, 70:5 (2008) 858– 864.

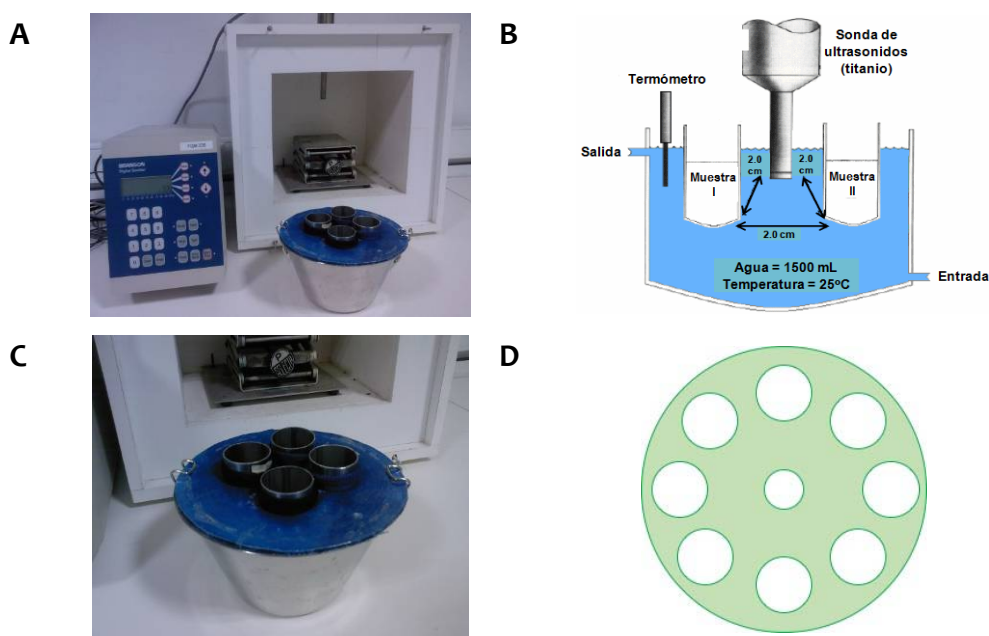


Figura III. 4. A Equipo de ultrasonidos empleado.
B Esquema del proceso de extracción mediante ultrasonidos.
C Detalle del portaceldas y celdas de acero inoxidable.
D Detalle de la tapa del portaceldas. Los agujeros grandes dan cabida a las celdas, mientras que el agujero central es para la sonda.

El proceso consiste en introducir la sonda de ultrasonido en un baño con agua donde se encuentran las celdas que contienen la muestra. Teóricamente, la introducción directa de la sonda de ultrasonido en la muestra favorecería el proceso de cavitación, incrementando la eficiencia de la extracción⁹², en este trabajo se ha comprobado que no es necesario y así se disminuye el riesgo de daño de la punta de la sonda. Este método resulta más práctico ya que permite el procesado de un mayor número de muestras simultáneamente (hasta 8 por ciclo).

Las variables del sistema de extracción que se deben tener en cuenta son numerosas⁹⁷. Las que más afectan al rendimiento de la extracción son: la naturaleza del líquido utilizado para la propagación de las ondas, la cantidad de

⁹⁷ Nascentes, C.C., Korn, M., Sousa, C.S., Arruda, M.A.Z. Use of ultrasonic baths for analytical applications: a new approach for optimization conditions. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 12 (2001) 57-63.

líquido empleado en el baño, la temperatura del líquido, la forma geométrica tanto del baño como de la cápsula de extracción, la composición material de la cápsula, el número de cápsulas, la distancia entre la sonda y la cápsula de extracción. Por tanto, los análisis deben ser realizados siempre bajo las mismas condiciones.

Una vez que estas variables están establecidas, se procede a la optimización de aquellas que afectan al proceso de extracción en sí. Los parámetros evaluados fueron los siguientes:

- Disolvente de extracción.
- Volumen del disolvente de extracción.
- Número de ciclos de extracción.
- Tiempo de extracción mediante ultrasonido.
- Amplitud del ultrasonido.

Con el fin de no reducir el tiempo de vida de la sonda y evitar el sobrecalentamiento del líquido en el que se encuentra inmersa la misma, se utilizaron valores de amplitud menores del 70% y tiempos de extracción por debajo de 20 minutos. De acuerdo a cada situación particular, estos parámetros fueron optimizados empleando métodos univariantes o multivariantes mediante diseño de experimentos, sobre todo por las importantes interacciones que existen entre parámetros como el tiempo de extracción y la amplitud del ultrasonido.

3. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM DE LOS EDCs ESTUDIADOS

La determinación mediante LC-MS/MS a través de una interfaz ESI requiere la optimización de diferentes variables de la fuente de ionización y del analizador, como son voltaje de capilar, temperatura de la fuente y de desolvatación, flujo de gas del cono y de desolvatación, presión de nebulizador y voltaje de cono, energía de colisión y flujo de gas de colisión.

En este trabajo se ha empleado un equipo de masas de triple cuadrupolo (Xevo TQ-XS), capaz de optimizar automáticamente todos los parámetros al mismo tiempo. Para ello, se introduce directamente en el espectrómetro de masas una solución individual de cada analito de concentración conocida ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). El proceso se realiza a través de la aplicación *Intellistart* del software del espectrómetro, pasando cada solución a través de un tubo capilar a un caudal constante.

La **Tabla III.1** resume las condiciones establecidas para realizar la optimización de los parámetros.

Tabla III.1. Condiciones generales del espectrómetro de masas optimizadas.

Voltaje de capilar	-3 kV
Temperatura de la fuente	150 °C
Temperatura de desolvatación	600 °C
Flujo de gas de cono	150 L h ⁻¹
Flujo de gas de desolvatación	500 L h ⁻¹
Presión del gas nebulizador	7.0 bar
Gas de cono/desolvatación	N ₂ ($\geq 99.995\%$)
Gas de colisión	Ar (99.999%)
Tiempo de medida (dwell time)	25 ms
Tiempo de interscan	3 ms

Este equipo también permite operar simultáneamente en modo ESI+ y ESI-. Cuando se analizan diferentes familias de compuestos, con estructuras

químicas y propiedades variadas, es muy importante estudiar si todos tienen el mejor rendimiento con la misma polaridad. En el caso de los EDCs estudiados se ha demostrado que la polaridad adecuada en todos los casos es la negativa, observándose una gran caída en la magnitud de la señal cuando se usa la polaridad positiva.

Una vez fijadas las condiciones del espectrómetro se inyectaron los analitos con objeto de seleccionar el fragmento precursor de cada compuesto y los fragmentos obtenidos por la rotura del mismo. El equipo optimiza de manera automática el voltaje de cono (CV) y la energía de colisión (CE) aplicados para maximizar la ionización y la sensibilidad de las diferentes transiciones seleccionadas (SRM). Por otro lado, el flujo del gas de colisión se fijó en 0.15 mL min⁻¹.

En todos los casos, se ha procurado obtener dos transiciones, la primera se usa para el análisis cuantitativo y la segunda se utiliza para la confirmación de la identidad del analito, según exigen las guías de validación y las normativas, a excepción de algunos casos en los que no fue posible obtener dos transiciones, dada la baja fragmentación del ion precursor. La **Tabla III.2** muestra las transiciones óptimas, el voltaje de cono y la energía de colisión para cada analito optimizado.

Tabla III.2. Condiciones de medida del espectrómetro de masas optimizadas.

Analito	Transición SRM (m/z)	CV (V)	CE (eV)
BPS	249.1 → 107.5 ^a	-4	-26
	249.1 → 155.5 ^b	-4	-20
MPB	151.0 → 91.4 ^a	-12	18
	151.0 → 135.5 ^b	-12	14
EPB	165.1 → 91.6 ^a	-14	-22
	165.1 → 136.3 ^b	-14	-14
PPB	179.1 → 91.5 ^a	-26	-22
	179.1 → 114.5 ^b	-26	-16
PhPB	213.0 → 92.1 ^a	-20	-22
	213.0 → 136.1 ^b	-20	-18
BPB	193.1 → 91.5 ^a	-18	-26
	193.1 → 135.9 ^b	-18	-16
BPF	199.1 → 76.4 ^a	-14	-24
	199.1 → 92.4 ^b	-14	-20
BPE	213.1 → 197.7 ^a	-46	-18
BPA	227.2 → 132.9 ^a	-50	-26
BisPB	241.2 → 211.8 ^a	-10	-16
	241.2 → 225.9 ^b	-10	-20
TCC	313.0 → 125.5 ^a	-40	-24
	313.0 → 159.6 ^b	-40	-12
BPAF	335.2 → 196.7 ^a	-4	-36
	335.2 → 264.9 ^b	-4	-22
BPP	345.2 → 315.1 ^a	-18	-40
	345.2 → 330.1 ^b	-18	-24
BPA-d ₁₆	241.3 → 141.7 ^a	-24	-26
EPB-d ₅	170.2 → 91.3 ^a	-24	-16
	170.2 → 137.6 ^b	-24	-14

CV: Voltaje de cono (V); CE: Energía de colisión (eV); IS: Patrón interno.

^a SRM transición para cuantificación; ^b SRM transición para confirmación.

4. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Se estudiaron las variables que más influyen en la separación cromatográfica de los analitos objeto de estudio a una concentración individual de 100 µg L⁻¹. Se optimizaron las condiciones cromatográficas para conseguir la mayor resolución posible (selectividad) con la mayor señal (sensibilidad) en el espectrómetro de masas.

4.1. Elección de la fase estacionaria

En base a la experiencia del grupo de investigación en el análisis y determinación de este tipo de compuestos en diferentes matrices⁹⁸⁻¹⁰⁰, se utilizó una columna Acquity UPLC BEH™ C18, con un tamaño de partícula de 1.7 µm, de 100 mm de longitud y un diámetro interno de 2.1 mm como fase estacionaria.

4.2. Elección de la fase móvil y optimización del gradiente

Se han realizado numerosos ensayos variando la composición de la fase móvil con el fin de conseguir la combinación óptima de disolventes y gradiente de composición que lograra una mejor separación con la mejor sensibilidad. Para comenzar, se estudió la mezcla de disolventes adecuada para la separación por cromatografía. Se ensayaron metanol y acetonitrilo como modificadores de la fase móvil, estos son utilizados habitualmente en cromatografía de líquidos en fase inversa. Como fase A se empleó agua desionizada con diferentes aditivos ácidos y alcalinos: ácido fórmico y ácido acético (0.1% v/v) y amoníaco (0.025% v/v). Al usar un medio acuoso alcalino

⁹⁸ Rodríguez-Gómez R., Jiménez-Díaz I., Zafra-Gómez A., Ballesteros O., Navalón A. A multiresidue method for the determination of selected endocrine disrupting chemicals in human breast milk based on a simple extraction procedure. *Talanta*, 130 (2014) 561-570.

⁹⁹ Rodríguez-Gómez R., Martín J., Zafra-Gómez A., Alonso E., Vílchez J.L., Navalón A. Biomonitoring of 21 endocrine disrupting chemicals in human hair samples using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chemosphere*, 168 (2017) 676-684.

¹⁰⁰ Luque-Muñoz A., Vílchez J.L., Zafra-Gómez A. Multiclass method for the determination of pharmaceuticals and personal care products in compost from sewage sludge using ultrasound and salt-assisted liquid-liquid extraction followed by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *J. Chromatogr. A*, 1507 (2017) 72-83.

fuerte (disolvente A) con metanol como disolvente B, la sensibilidad del método mejora significativamente. El medio básico beneficia notablemente la ionización. Este hecho es lógico dado que los analitos ionizan mejor en modo de ionización ESI- y este medio favorece el proceso.

Una vez optimizada la naturaleza de la fase móvil, se realizó un estudio para fijar la composición temporal de la misma. En fase inversa, generalmente el gradiente comienza con un alto contenido de agua y progresivamente se reduce la polaridad de la fase móvil, aumentando la cantidad de disolvente orgánico. Puesto que contamos con un espectrómetro de masas, teóricamente no se necesita una separación de alta resolución, sin embargo, es preferible optimizar la separación para así evitar posibles problemas de supresión iónica (no co-elución de varios picos). El flujo utilizado fue de 0.3 mL min^{-1} . Se fue modificando la composición y elaborando el gradiente hasta conseguir separar los 16 compuestos en menos de diez minutos de manera óptima. El gradiente que finalmente se usó se muestra en la **Tabla III.3**.

Se examinó así mismo la influencia de la temperatura de la columna en la forma del pico y en el tiempo de retención. Se modificó dicha temperatura entre 20 y 50 °C, y los resultados mostraron que la temperatura óptima más alta era de 40 °C, ya que cuanto mayor es la temperatura, más definidos son los picos observados y menor es la presión del sistema. A partir de esa temperatura, la mejora no era significativa y además, temperaturas mayores repercuten negativamente en la columna cromatográfica acortando su vida útil, según especificaciones de la misma.

Tabla III.3. Condiciones cromatográficas optimizadas.

Fase estacionaria	Acquity UPLC BEH C18 (100 mm x 2.1 mm i.d., 1.7 μ m)		
Fase móvil	A: 0.025% (v/v) amoniaco en agua B: metanol		
Gradiente cromatográfico	Tiempo (min)	% A	% B
	0.0	85	15
	1.0	85	15
	5.0	15	85
	7.0	15	85
	7.5	0	100
	9.5	0	100
	9.9*	85	15
	15.0	85	15
Flujo	0.3 mL min ⁻¹		
Volumen de inyección	10 μ L		
Temperatura de la columna	40 °C		
Temperatura de la muestra	25 °C		

*Este intervalo corresponde al acondicionamiento de la columna para la próxima inyección.

Un parámetro habitualmente no estudiado en la optimización de los métodos de análisis es la composición final del disolvente empleado para redissolver el extracto obtenido en el proceso de tratamiento de muestra antes de ser inyectada en el equipo. Este parámetro habitualmente ignorado, tiene una influencia importante cuando obtenemos un pico cromatográfico con baja retención, como se muestra a continuación. En nuestro caso, el metilparabeno (MPB) y el etilparabeno (EPB) aparecen a tiempos de retención bajos. Se observó que este factor era crítico por lo que procedimos a estudiarlo. Se inyectó una mezcla de ambos analitos disueltos en diferentes composiciones de una mezcla de agua:metanol (v/v), en concreto: 50:50, 60:40, 70:30 y 80:20. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura III.5**.

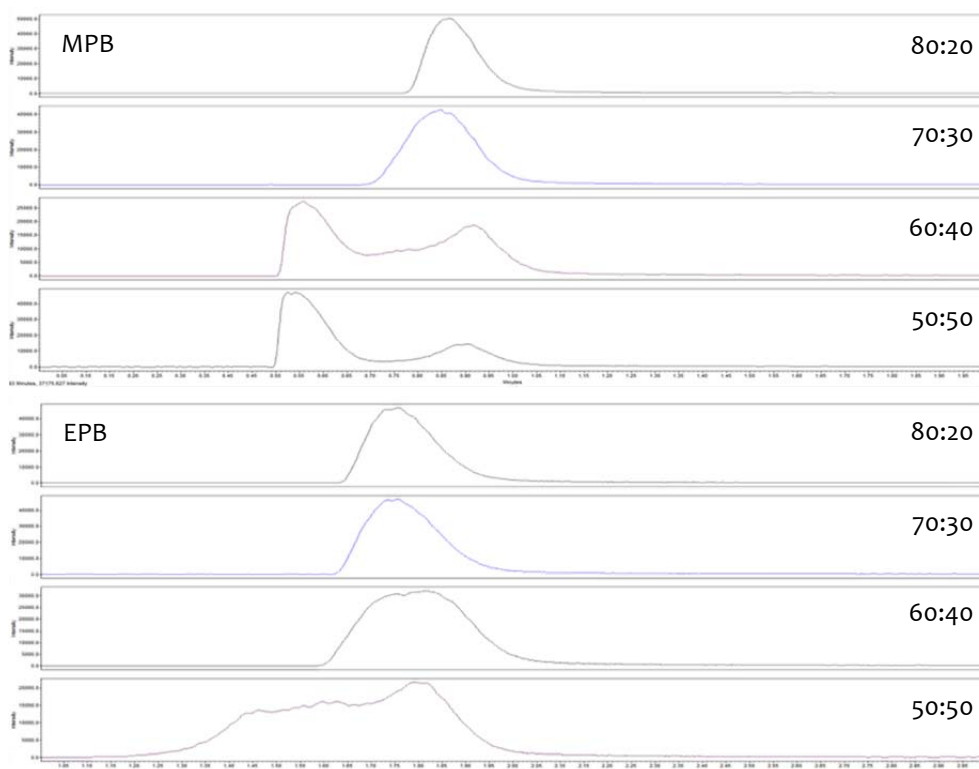


Figura III. 5. Estudio de composición final de la muestra.

En ambos casos, al incrementar la proporción de agua en la mezcla del extracto previo al análisis cromatográfico, acercándonos a la composición inicial de la fase móvil, se observa una mejora significativa en la morfología del pico y un ligero desplazamiento del mismo. Por lo que la proporción agua:metanol seleccionada como composición final de la muestra sería 80:20 (v/v).

En las condiciones optimizadas tanto para el espectrómetro de masas como para el cromatógrafo de líquidos, se inyectó un patrón mezcla de los analitos objeto de estudio ($100 \mu\text{g L}^{-1}$), obteniéndose el cromatograma que se muestra a continuación:

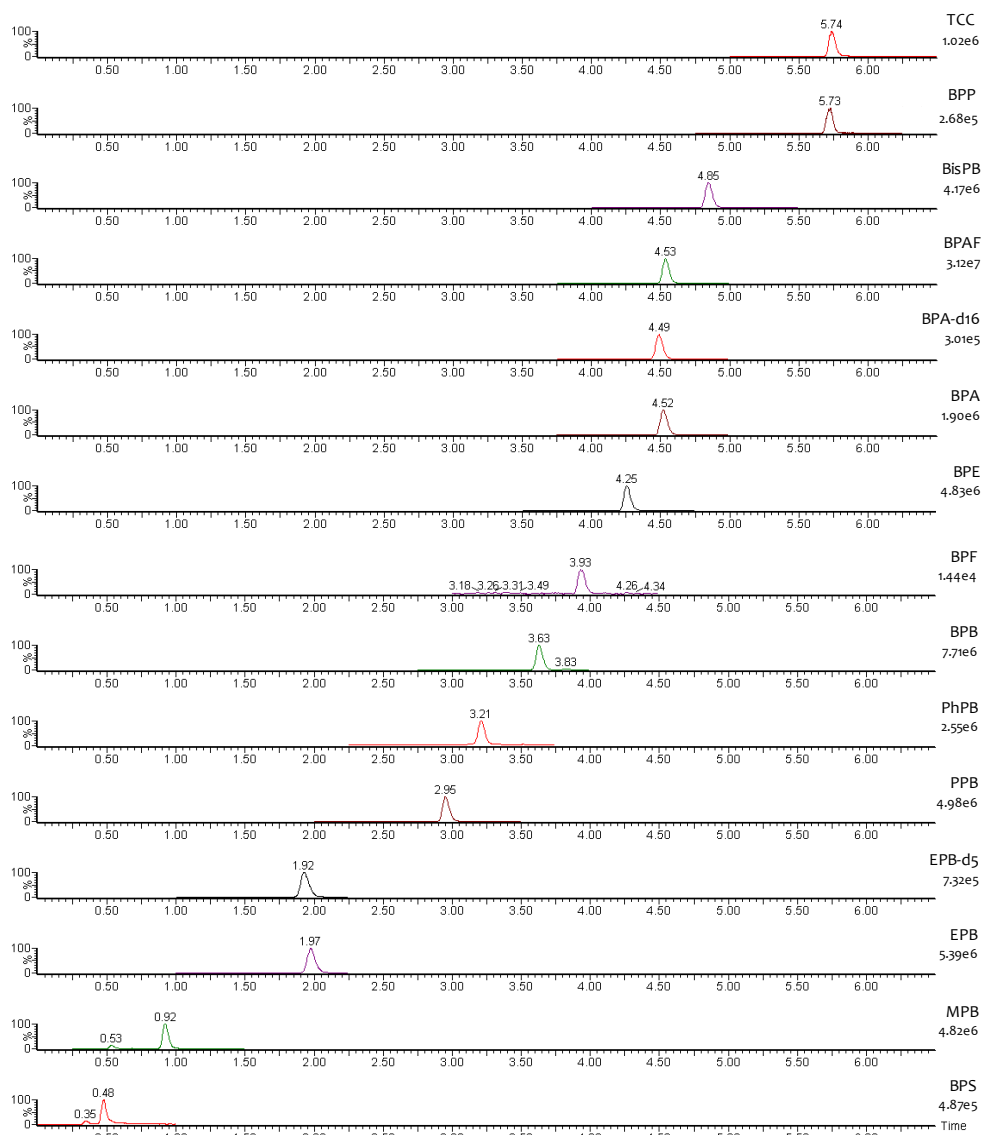


Figura III. 6. Cromatograma de un patrón conteniendo todos los analitos y patrones internos ($100 \mu\text{g L}^{-1}$).

5. OPTIMIZACIÓN DEL TRATAMIENTO DE MUESTRA

5.1. Toma y pretratamiento de muestra

Para la calibración y validación, las muestras de mejillón se obtuvieron de diferentes supermercados de la ciudad de Granada. Se llevó a cabo un amplio cribado de muestras comerciales destinadas al consumo humano, cultivadas en distintos puntos y por tanto de distintas procedencias. El objetivo era obtener muestras limpias de analitos para su uso como blancos. Se encontró que algunas de las muestras analizadas cumplían con los requisitos para ser utilizadas en la validación del método. En concreto, los mejores resultados fueron los obtenidos con muestras procedentes de Abelleira, descargados en el puerto de Muros, A Coruña (España).

Para la aplicación del método, las muestras de mejillón mediterráneo silvestre (*Mytilus galloprovincialis*) fueron recolectadas durante los meses de agosto a octubre de 2020, en la zona intermareal de cinco localidades costeras de la provincia de Granada (España) con diferentes perfiles ambientales:

- **Área 1** → La Caleta (Salobreña)
Zona urbanizada con usos residenciales e industriales
Coordenadas: 36.74448, -3.60234
- **Área 2** → Desembocadura Rio Jate (La Herradura)
Zona urbanizada con uso residencial vacacional
Coordenadas: 36.737856, -3.751868
- **Área 3** → La Calita (La Herradura)
Zona urbanizada con uso residencial vacacional
Coordenadas: 36.725139, -3.736306
- **Área 4** → Playa Las Azucenas (Motril)
Playa no urbanizada cercana a terrenos agrícolas
Coordenadas: 36.718631, -3.513204

- **Área 5** → Rada de Calahonda (Motril)
Rada cerca de una zona agrícola intensiva
Coordenadas: 36.702976, -3.411782

En todos los casos, las muestras se mantuvieron refrigeradas y se transportaron vivas al laboratorio donde se almacenaron congeladas a -20 °C hasta su análisis. Los mejillones fueron pretratados antes de proceder a la extracción, una vez descongelados:

1. Se abrieron y se separaron de la concha con ayuda de un bisturí, eliminando los bisos.
2. Se trituraron con ayuda de una batidora comercial hasta obtener una mezcla homogénea que se almacenó a -20 °C.
3. Esta mezcla fue liofilizada, durante 24-48 horas aproximadamente, y el residuo seco se machacó con un mortero manualmente para después tamizarlo y así aumentar la superficie de contacto entre la muestra y el disolvente de extracción.



Figura III. 7. *Mytilus galloprovincialis* (Fuente: https://www.researchgate.net/publication/263550724_Ship_transport_of_marine_invasive_species_and_its_stress_resistance/figures).

5.2. Optimización del proceso de extracción

Para poder separar los analitos de la compleja matriz del mejillón se desarrolló un procedimiento de extracción sólido-líquido asistido por ultrasonidos. Todas aquellas variables experimentales que pueden afectar al proceso fueron optimizadas con precisión. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Se estudió:

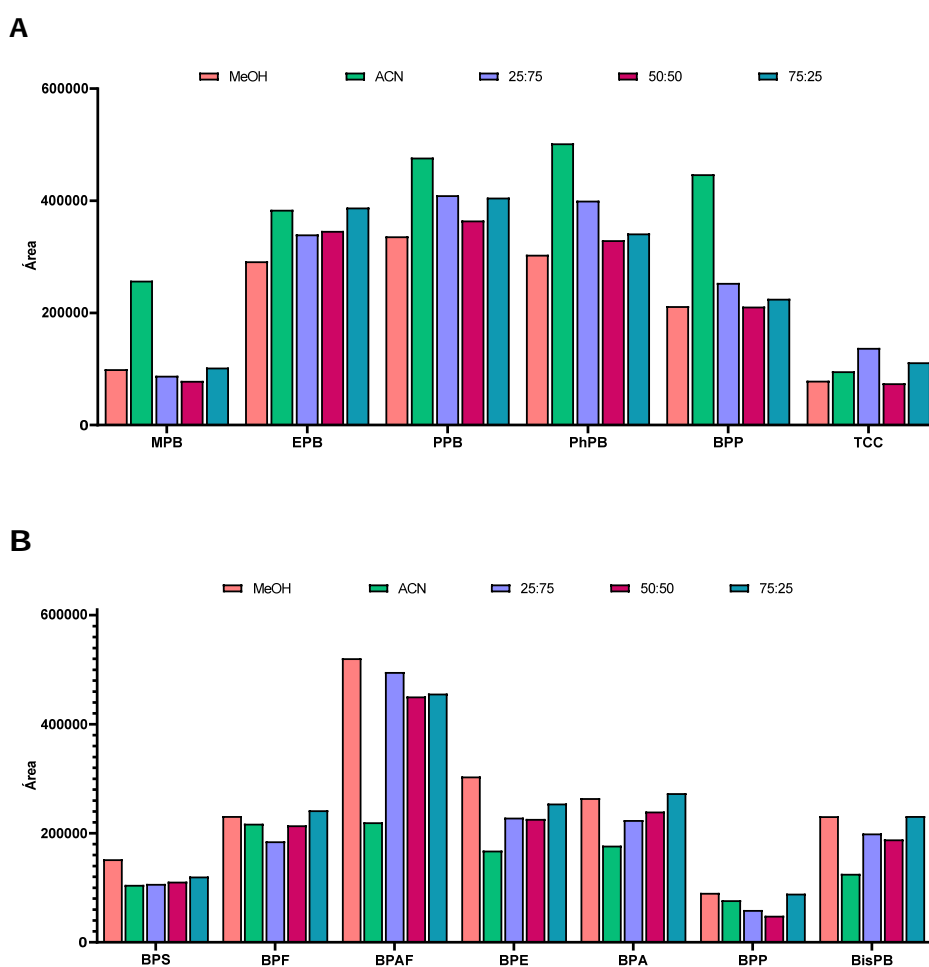
- La naturaleza del disolvente de extracción y el volumen del mismo.
- Los parámetros de extracción asistida por ultrasonido: tiempo y amplitud de ultrasonidos.
- La limpieza del extracto obtenido en el paso de extracción previo.

5.2.1. Selección del disolvente de extracción y optimización del volumen

Para realizar esta experiencia, se pesaron alícuotas de 0.5 g de mejillón liofilizado y se doparon con los analitos a una concentración final de 100 ng g⁻¹. La mezcla se agitó en vortex y se dejó equilibrar durante una noche en liofilizador para eliminar el disolvente adicionado en el dopado y permitir un contacto íntimo entre la muestra y los analitos. Se extrajeron los compuestos objeto de estudio con 4 mL de diferentes disolventes aplicando ultrasonidos durante 20 minutos a temperatura ambiente y a máxima potencia, durante un solo ciclo de extracción, para comparar la eficiencia de extracción para cada compuesto. Se realizaron ensayos con extractantes de diferente polaridad:

- a. Metanol (MeOH)
- b. Acetonitrilo (ACN)
- c. MeOH:ACN (25:75, v/v)
- d. MeOH:ACN (50:50, v/v)
- e. MeOH:ACN (75:25, v/v)
- f. Acetato de etilo (AcEt)
- g. Tolueno

Una vez realizada la extracción con cada disolvente, se centrifugó durante 5 minutos a 4000 rpm y el sobrenadante se retiró y evaporó a sequedad. Finalmente, se redisolvió en una mezcla 80:20 (v/v) de agua:metanol, y tras agitar vigorosamente en vortex y centrifugar durante 10 minutos a 13500 rpm, los extractos se introdujeron en los correspondientes viales cromatográficos y se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos. En las **Figuras III.8A y 8B** se muestran los resultados obtenidos en cada una de las condiciones ensayadas.

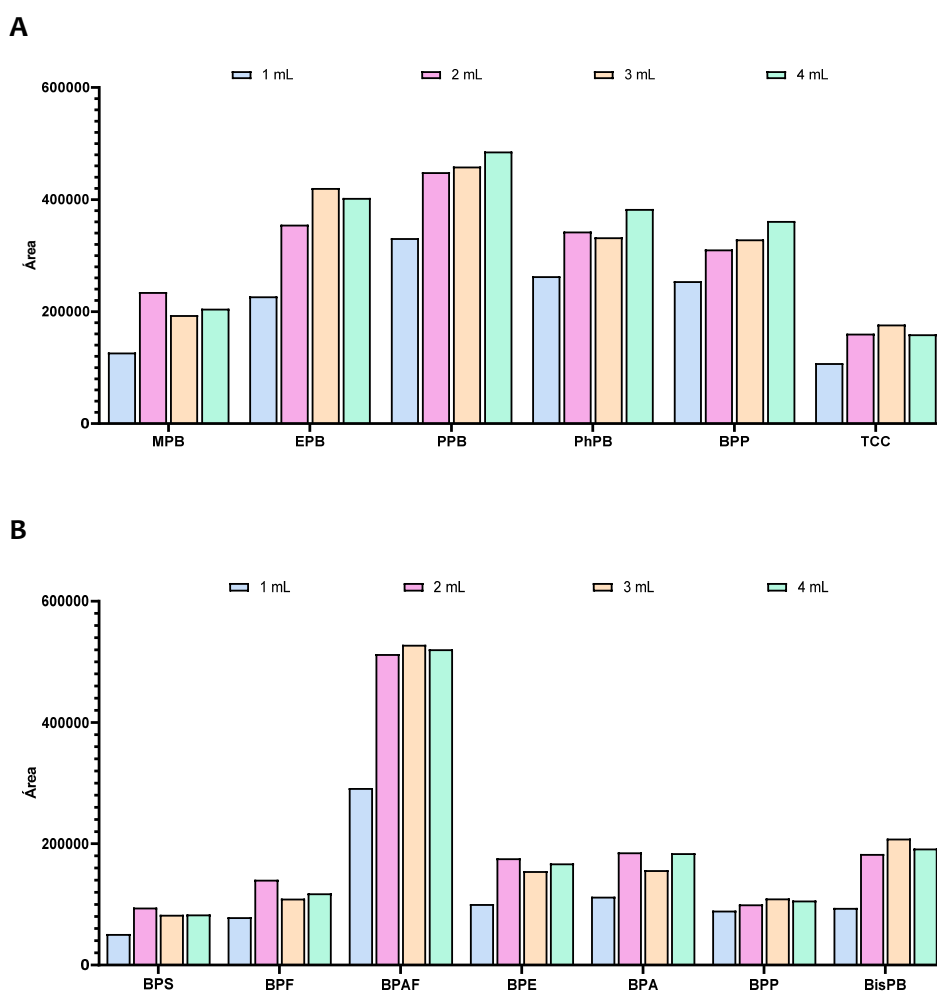


Figuras III. 8. Optimización del disolvente de extracción.

A Parabenos y triclocarbán. **B** Bisfenoles.

Las señales analíticas máximas para los antimicrobianos (parabenos y TCC) se obtuvieron cuando se utilizó acetonitrilo como disolvente en todos los casos. En el caso de los bisfenoles el metanol es claramente el mejor agente extractante. Por tanto, como solución de compromiso y con el fin de maximizar el rendimiento de extracción para ambas familias de compuestos, se propusieron dos pasos secuenciales de extracción. La primera extracción con ACN, para favorecer a los antimicrobianos; y la segunda, con MeOH para favorecer a los bisfenoles.

Seleccionados los disolventes de extracción, se optimizó el volumen de los mismos. Siguiendo el procedimiento anterior, se modificaron los volúmenes de ambos entre 1 y 4 mL. En las **Figuras III.9^a y 9B** se muestran los resultados obtenidos para cada compuesto en cada una de las condiciones ensayadas.



Figuras III. 9. Optimización del volumen de los disolventes de extracción.
A Parabenos y triclocarban. **B** Bisfenoles.

Para obtener un buen rendimiento de extracción no es suficiente con 1 mL de disolvente, ya que no cubre completamente la muestra y fue difícil recuperar el extracto correctamente. A partir de 2 mL, no se observaron diferencias significativas en la señal analítica obtenida (inferior al 5% para todos los compuestos). De manera que se seleccionó un volumen de 2 mL de cada disolvente, como suficiente para la extracción con el fin de asegurar un alto rendimiento de extracción, evitando un empleo innecesario de disolventes y

acortando los tiempos de evaporación en el posterior secado de los extractos obtenidos.

5.2.2. Optimización de extracción asistida por ultrasonidos

Una vez seleccionado el disolvente y optimizado el volumen del mismo empleado en cada extracción, se procedió a la evaluación de los parámetros que afectan al proceso de extracción por ultrasonidos: amplitud y tiempo. Se llevó a cabo un diseño de experimentos factorial simple 3^2 , se estudió el tiempo de extracción entre 5 y 20 minutos, y la amplitud de ultrasonido entre 25 y 70% (máximo recomendado para el equipo utilizado). Todos los experimentos se realizaron de forma aleatoria para minimizar los efectos de sesgo de las variables no controladas. Se incorporaron 3 puntos centrales, para estimar el error experimental que no depende del modelo ajustado, lo que resultó en 12 experimentos analíticos, según las condiciones mostradas en la **Tabla III.4**.

Tabla III.4. Condiciones obtenidas del diseño factorial 3^2 para la extracción por ultrasonidos.

	Amplitud (%)	Tiempo (min)		Amplitud (%)	Tiempo (min)
1	25	5	7	25	20
2	47.5	5	8	47.5	20
3	70	5	9	70	20
4	25	12.5	10	47.5	12.5
5	47.5	12.5	11	47.5	12.5
6	70	12.5	12	47.5	12.5

Los resultados obtenidos se introdujeron en el programa informático (Statgraphics), obteniendo las superficies de respuesta individuales para cada compuesto y la general estimada para todos los compuestos estudiados a la vez (gráfico de deseabilidad, **Figura III.10**). A partir de ésta última, se obtuvo el valor óptimo de las variables optimizadas para todos los compuestos objeto de estudio.

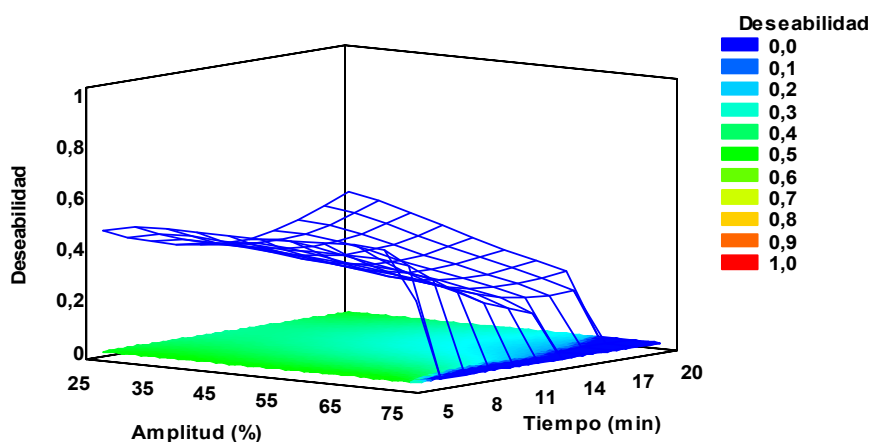


Figura III.10. Gráfico de superficie de respuesta óptima. Optimización del % de amplitud y el tiempo necesario para la extracción por ultrasonidos.

En la **Tabla III.5** se muestra la combinación de niveles de factores que maximiza la función de “deseabilidad” en la región indicada, junto con la combinación de factores a la cual se alcanza el óptimo.

Tabla III.5. Condiciones óptimas para el proceso de extracción asistida por ultrasonidos.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Amplitud (%)	25.0	70.0	65.9
Tiempo (min)	5.0	20.0	5.0

5.2.3. Optimización del proceso de limpieza del extracto

Dada la complejidad de la muestra biológica seleccionada y como consecuencia de la suciedad observada en el extracto obtenido en la primera etapa ya optimizada, se consideró la posibilidad de realizar un proceso de limpieza del mismo para eliminar la mayor cantidad de interferencias posible coextraídas en esta primera fase. Se optimizó un proceso de limpieza con adsorbentes dispersivos (d-SPE) basada en la técnica QuEChERS (Quick, Easy,

Cheap, Effective, Rugged and Safe)^{101,102}. El proceso general consiste en añadir disolvente al extracto seco, agitar vigorosamente, añadir un adsorbente dispersivo, agitar de nuevo y centrifugar. Después de la centrifugación se obtienen se recoge la fase orgánica y se evapora a sequedad.

Para la optimización de las variables que afectan al proceso de limpieza, se empleó la metodología multivariante de superficie de respuesta. Se aplicó un diseño Box-Behnken para 3 variables. Los adsorbentes dispersivos ensayados fueron los de QuEChERS original: C18 y PSA, así como el disolvente utilizado fue el acetonitrilo. Los factores variaron de 2 a 4 mL para el disolvente, y de 0 a 1 g para los adsorbentes dispersivos. El diseño consta de 16 experimentos. Las muestras dopadas con 100 ng g⁻¹ se trataron siguiendo el procedimiento optimizado a lo largo de este trabajo y los extractos obtenidos se trataron según las condiciones que se muestran en la **Tabla III.6**.

¹⁰¹ Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., Schenck, F.J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86 (2003) 412-431.

¹⁰² EN 15662:2008 standard. Foods of plant origin. Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and *clean-up* by dispersive SPE. QuEChERS-method. ISBN 978 0 580 58441 1 (2008).

Tabla III.6. Condiciones obtenidas del diseño Box-Behnken para la limpieza de muestra.

	Volumen de ACN (mL)	Masa de PSA (g)	Masa de C18 (g)
1	2	0	0.5
2	4	0	0.5
3	2	1	0.5
4	4	1	0.5
5	2	0.5	0
6	4	0.5	0
7	2	0.5	1
8	4	0.5	1
9	3	0	0
10	3	1	0
11	3	0	1
12	3	1	1
13	3	0.5	0.5
14	3	0.5	0.5
15	3	0.5	0.5
16	3	0.5	0.5

Tras el análisis de los extractos obtenidos en el UPLC-MS/MS, los resultados obtenidos se introdujeron en el programa informático, obteniendo las superficies de respuesta individuales para cada compuesto y la general estimada para todos los compuestos analizados a la vez (gráfico de deseabilidad, **Figura III.11**). Este gráfico permite obtener los valores óptimos de las tres variables para todos los analitos simultáneamente.

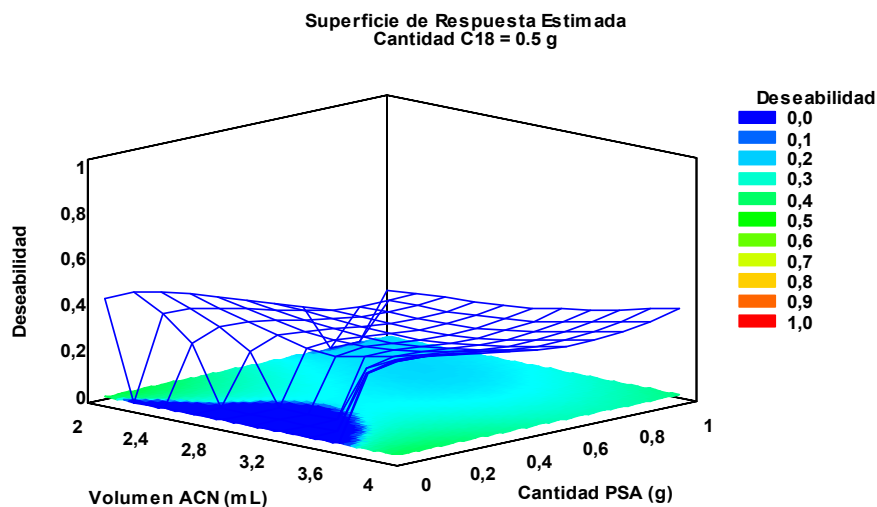


Figura III. 11. Gráfico de superficie de respuesta óptima. Optimización del volumen de acetonitrilo, la cantidad de C18 y la cantidad de PSA para la limpieza de muestra (d-SPE).

Se observó que la presencia de PSA tenía un efecto negativo sobre la señal, haciéndola prácticamente desaparecer a cantidades mínimas. Del estudio de las superficies, además, se concluyó que los rangos de cantidad tanto de acetonitrilo y como del adsorbente dispersivo C18 no incluían al óptimo. Por este motivo, se realizó un segundo diseño, descartando el uso de PSA e incrementando los volúmenes de ACN y las cantidades de C18. Se aplicó el diseño factorial simple 3^2 con cuatro puntos centrales mostrado en la **Tabla III.7.**

Tabla III.7. Condiciones obtenidas del diseño factorial 3^2 para la limpieza de muestra.

	Volumen de ACN (mL)	Masa de C18 (g)		Volumen de ACN (mL)	Masa de C18 (g)
1	2	0	8	4	2
2	4	0	9	6	2
3	6	0	10	4	1
4	2	1	11	4	1
5	4	1	12	4	1
6	6	1	13	4	1
7	2	2			

Los dos factores fueron modificados entre 2 y 6 mL para el disolvente y de 0 a 2 g para el adsorbente dispersivo. La combinación de los valores experimentales optimizados de las variables evaluadas permitió determinar la eficiencia óptima de limpieza, que también se estimó mediante la función de deseabilidad. En la **Figura III. 12** podemos observar los resultados obtenidos.

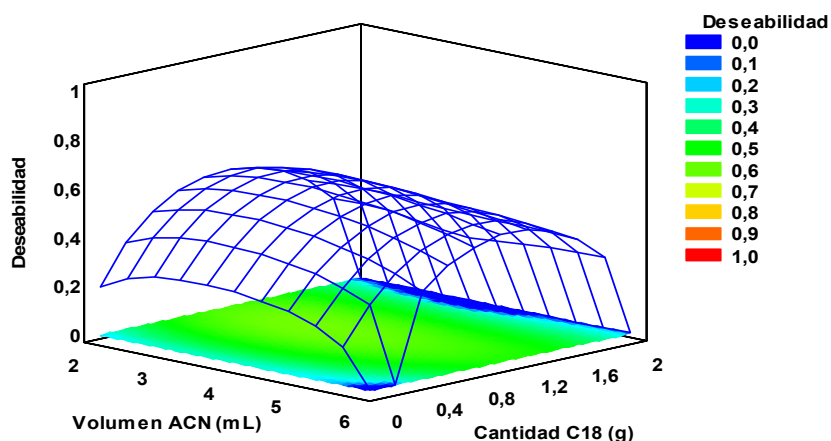


Figura III. 12. Gráfico de superficie de respuesta óptima. Optimización del volumen de acetonitrilo y la cantidad de C18 para la limpieza de muestra.

Tabla III.8. Condiciones óptimas del proceso de limpieza de los extractos.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Volumen de ACN (mL)	2.0	6.0	3.28
Masa de C18 (g)	0.0	2.0	0.93

Como valores de trabajo para experimentos posteriores se fijó 3 mL de ACN y 0.9 g de C18.

5.2.4. Procedimiento final optimizado

Después de optimizar el proceso de extracción sólido-líquido de los analitos objeto de estudio a partir las muestras naturales de *Mytilus galloprovincialis* y de limpieza de los extractos, el método de

extracción/limpieza de los EDCs optimizado previo a la inyección en UPLC-MS/MS quedó como sigue:

1. Se pesan 0.5 g de mejillón liofilizado en tubos de vidrio (10 mL). Se dopan con 25 μL de una solución en metanol (100 mg L^{-1}) que contiene los patrones internos (EPB- d_5 y BPA- d_{16} , a una concentración final de 250 ng mL^{-1}).
2. Se añaden 2 mL de ACN a los tubos, se agitan en vórtex durante unos segundos y se someten al primer ciclo de extracción asistida por ultrasonidos, fijando las condiciones optimizadas: 65% de amplitud durante 5 min. La mezcla se centrifuga durante 10 minutos a 4000 rpm y la fase superior orgánica resultante se recoge en tubos de vidrio limpios (10 mL).
3. Se realiza el segundo ciclo de extracción, añadiendo 2 mL de MeOH al pellet resultante de la centrifugación, los tubos se agitan en vórtex durante unos segundos y se procede a la extracción, con los mismos parámetros anteriores. Esta mezcla se vuelve a centrifugar y el sobrenadante se recoge en los tubos que contienen el extracto anterior.
4. Esta mezcla se evapora hasta sequedad en un concentrador a vacío a 760 x g.
5. A continuación, se realiza el proceso de limpieza, en el que al residuo resultante se le adicionan 3 mL de ACN y 0.9 g de C18, se agita durante 2 minutos en vórtex, se somete a un baño de ultrasonidos durante 5 minutos y se centrifuga utilizando las condiciones anteriores. La fase orgánica se recoge en tubos de vidrio nuevos.
6. Esta mezcla se evapora hasta sequedad en un concentrador a vacío a 760 x g y a 60 °C.

7. El residuo que se obtiene se redisuelve en 1 mL de una mezcla de agua:metanol (80:20, v/v), se agita un minuto en vórtex, se sonica en el baño de ultrasonidos durante 5 minutos. Se centrifuga a 13500 rpm (16300 x g) durante 10 minutos.
8. Finalmente, el sobrenadante se transfiere a un vial de cromatografía para su análisis por UPLC-MS/MS.
9. El esquema de trabajo sería el siguiente:

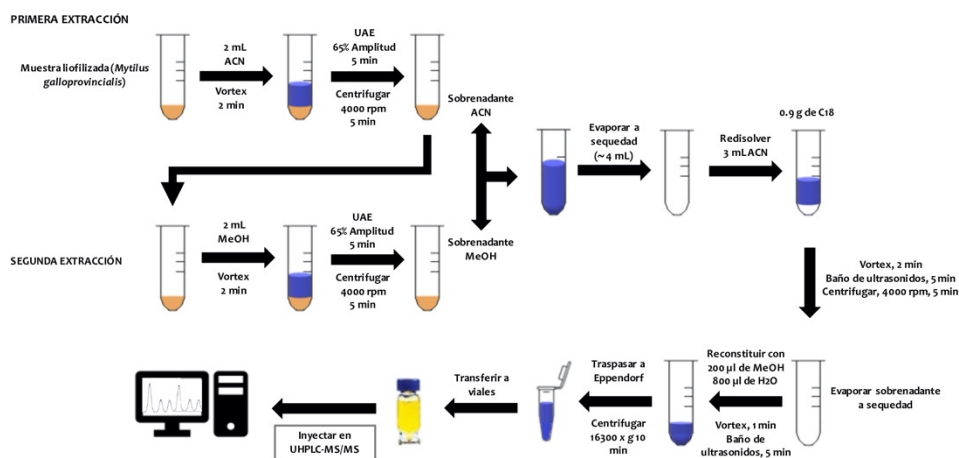


Figura III. 13. Esquema del procedimiento de tratamiento de muestra.

5.3. Calibración del método analítico

El propósito de la calibración es establecer una relación lineal entre la concentración del analito y la señal analítica. Para construir el calibrado en matriz se analizaron siete niveles de concentración (1, 5, 10, 25, 50, 100 y 250 ng g⁻¹) en un intervalo variable dependiendo del compuesto estudiado, así como el blanco correspondiente. Cada nivel se preparó 8 veces y se utilizaron BPA-d₁₆ y EPB-d₅ como patrones internos (a una concentración final de 250 ng mL⁻¹ en muestra de mejillón).

A pesar de realizar una extracción previa de los analitos y un paso de limpieza del extracto obtenido, se llevó a cabo un estudio estadístico del efecto matriz. Para ello, se compararon dos curvas de calibración obtenidas para todos los compuestos en la fase móvil inicial y en una muestra de matriz blanco de mejillón. Se llevó a cabo una comparación de las pendientes obtenidas en ambos calibrados mediante un test de *t-Student*, y se observó que en algunos casos existía un notable efecto matriz. Por esta razón, se aplicó una calibración en matriz para la cuantificación de todos los analitos en las muestras naturales. En la **Tabla III. 9** se muestran los parámetros estadísticos de la calibración en muestras de mejillón.

Tabla III.9. Parámetros estadísticos de la calibración en matriz para muestras de mejillón.

Analito	n	b	$S_{y/x}$
BPS	56	$2.60 \cdot 10^{-1}$	0.196
MPB	64	$7.22 \cdot 10^{-3}$	$4.8 \cdot 10^{-2}$
EPB	64	$9.19 \cdot 10^{-3}$	$5.1 \cdot 10^{-2}$
PPB	64	$5.59 \cdot 10^{-3}$	$5.3 \cdot 10^{-2}$
PhPB	64	$6.38 \cdot 10^{-3}$	$3.3 \cdot 10^{-2}$
BPB	64	$2.91 \cdot 10^{-3}$	$1.6 \cdot 10^{-2}$
BPF	56	$2.53 \cdot 10^{-2}$	0.271
BPE	56	$2.83 \cdot 10^{-2}$	0.332
BPA	64	$1.22 \cdot 10^{-2}$	0.182
BisPB	64	$1.05 \cdot 10^{-1}$	1.143
TCC	56	$6.80 \cdot 10^{-3}$	$2.7 \cdot 10^{-3}$
BPAF	64	$5.17 \cdot 10^{-1}$	8.076
BPP	64	$2.44 \cdot 10^{-2}$	0.344

n: puntos de calibración; *b*: pendiente; S_b : desviación estándar de la pendiente; $S_{y/x}$: desviación estándar de los residuos.

En la **Figura III. 14** se muestran los cromatogramas individuales de cada compuesto correspondientes al patrón de 25 ng g^{-1} .

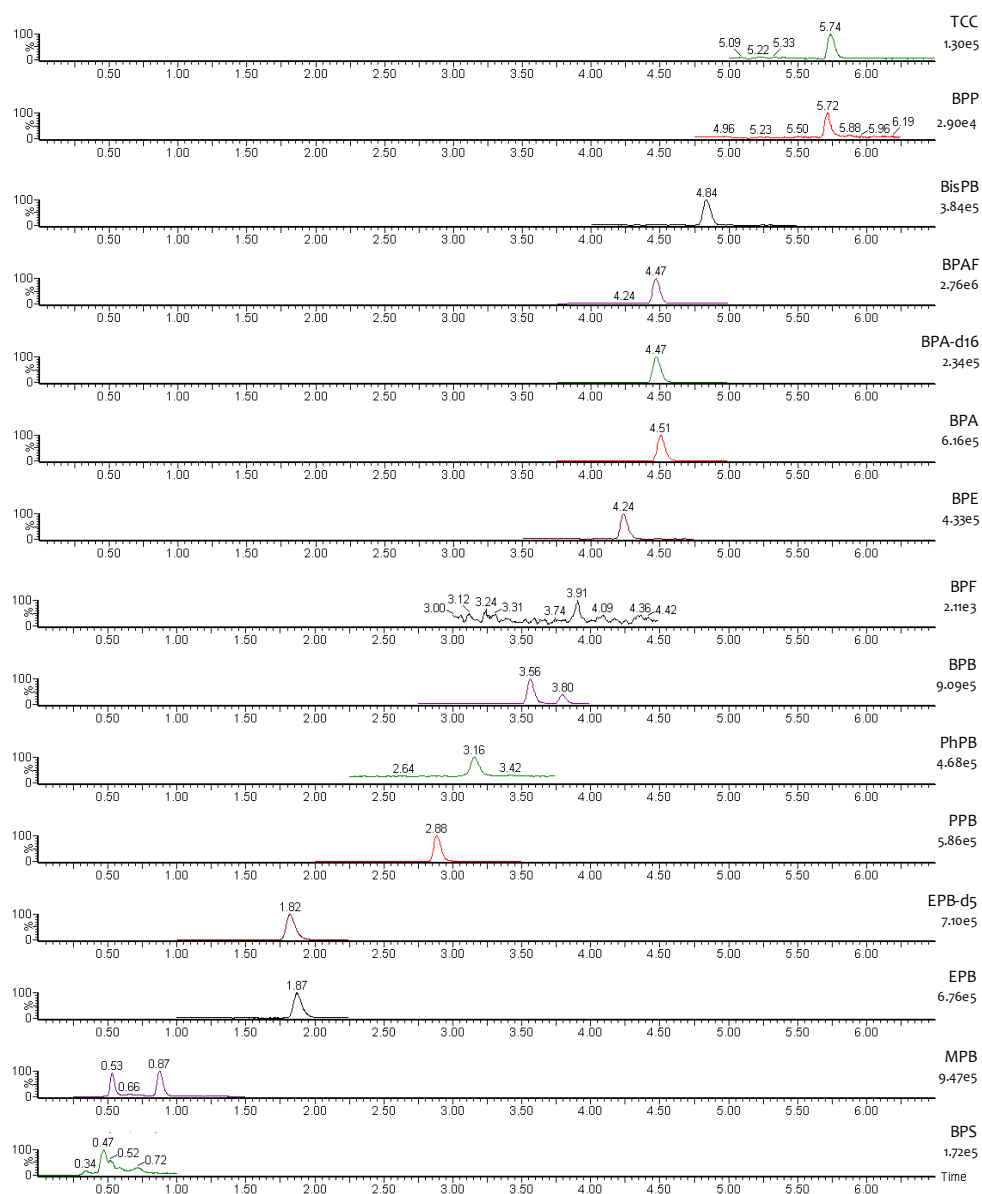


Figura III. 14. Cromatograma de un patrón de calibración (25 ng g⁻¹).

5.4. Validación del método analítico

Para la validación del método analítico se siguieron las recomendaciones de la “Guía de validación para métodos bioanalíticos” propuesta por la FDA¹⁰³. Los parámetros de validación evaluados fueron: linealidad y rango dinámico lineal, sensibilidad (límites de detección y cuantificación), exactitud (veracidad y precisión) y selectividad.

5.4.1. Linealidad y rango dinámico lineal

La linealidad se evaluó a partir de los coeficientes de determinación (% R^2) y los valores de P de la prueba de falta de ajuste (% P_{lof}). En la tabla siguiente se muestran los valores obtenidos para cada uno de estos parámetros y el rango lineal en el que se ha aplicado el método.

Tabla III.10. Parámetros de linealidad del método optimizado.

Analito	% R^2	% P_{lof}	RDL (ng g ⁻¹)
BPS	97.3	25.1	1.0 – 250
MPB	99.8	10.5	1.0 – 250
EPB	99.9	15.2	1.0 – 250
PPB	99.7	98.0	1.0 – 250
PhPB	99.8	99.4	1.0 – 250
BPB	99.8	12.1	1.0 – 250
BPF	99.5	37.1	5.0 – 250
BPE	99.5	78.8	5.0 – 250
BPA	99.2	89.5	1.0 – 250
BisPB	99.3	88.1	1.0 – 250
TCC	99.7	62.3	5.0 – 250
BPAF	99.1	16.2	1.0 – 250
BPP	99.3	78.6	1.0 - 250

R^2 (%): coeficiente de correlación; P_{lof} (%): falta de ajuste de la calibración; RDL (ng g⁻¹): rango dinámico lineal.

¹⁰³ Guidance for Industry, 2018. Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM).

Como se muestra en la **Tabla III. 10**, los valores de R^2 están comprendidos entre el 97.3% para el BPS y el 99.9% para el EPB. Por otro lado, los valores de P_{lof} fueron superiores a 5% en todos los casos. Se puede concluir que existe una buena linealidad dentro del rango establecido para el análisis.

5.4.2. Sensibilidad

Los valores de límite de detección (**LOD**) y límite de cuantificación (**LOQ**) fueron establecidos como la concentración mínima de analito que puede ser detectada o cuantificada por el método a partir de la relación señal/ruido (S/N) medida en el cromatograma. El LOD será la concentración correspondiente a una señal 3 veces dicha relación y el LOQ 10, respectivamente. Los resultados recogidos en la **Tabla III.11**. Los valores mostraron que los LODs se encuentran en un rango de 0.2 y 1.5 ng g^{-1} , y los LOQs oscilan entre 1.0 y 5 ng g^{-1} .

Tabla III.11. Parámetros de sensibilidad del método optimizado.

Analito	LOD (ng g^{-1})	LOQ (ng g^{-1})	Analito	LOD (ng g^{-1})	LOQ (ng g^{-1})
BPS	0.2	1.0	BPE	1.5	5.0
MPB	0.3	1.0	BPA	0.3	1.0
EPB	0.3	1.0	BisPB	0.2	1.0
PPB	0.2	1.0	TCC	1.5	5.0
PhPB	0.3	1.0	BPAF	0.2	1.0
BPB	0.3	1.0	BPP	0.2	1.0
BPF	1.4	5.0			

LOD (ng g^{-1}): límite de detección; LOQ (ng g^{-1}): límite de cuantificación.

Los LODs y LOQs calculados demuestran la elevada sensibilidad del método propuesto para la aplicación que se pretende llevar a cabo.

5.4.3. Exactitud

Para establecer la exactitud del método propuesto, se ha estudiado la veracidad en términos de recuperación, y su precisión en términos de variabilidad inter-día (reproducibilidad) e intra-día (repetibilidad). Se ha llevado a cabo un ensayo de recuperación con matrices libres de los compuestos, o cuyas concentraciones están por debajo de los límites de detección del

método, enriquecidas a tres niveles de concentración (5, 100 y 250 ng g⁻¹) para evaluar la recuperación de cantidades conocidas de los compuestos de interés añadidos a muestras de mejillón. Las muestras se analizaron utilizando el método propuesto y la concentración de cada compuesto se determinó por interpolación en la curva de calibración en matriz. Las recuperaciones se calcularon comparando las cantidades encontradas con las cantidades teóricas para cada compuesto en seis días consecutivos; se realizaron un total de 18 determinaciones para cada nivel. La **Tabla III.12** muestra los valores de recuperación y de precisión obtenidos.

Tabla III.12. Parámetros de exactitud del método optimizado.

Analito	Dopado (ng g ⁻¹)	Observado ^a (ng g ⁻¹)	RSD (%)	Rec (%)
MPB	5	5.0	8.5	100.1
	100	96.8	6.5	96.8
	200	237.2	6.6	94.9
EPB	5	4.8	11.4	96.6
	100	97	5.8	96.7
	250	259	6.9	103.6
PPB	5	5.79	11.6	115.8
	100	98.4	10.1	98.4
	250	251	6.9	100.4
PhPB	5	4.9	9.6	98.4
	100	101	8.7	101.2
	250	251	3.3	100.3
BPB	5	5.6	5.5	111.1
	100	101	5.9	100.9
	250	255	7.8	101.8
BPS	5	4.6	14.6	91.0
	100	102	9.2	102.0
	250	234	11.1	95.0
BPF	5	4.9	3.9	97.5
	100	107	8.2	106.5
	250	246	9.5	98.5
BPE	5	5.0	5.2	100.7
	100	102.3	9.2	102.3
	250	255	10.7	102.0
BPA	5	5.4	8.6	108.0
	100	104	12.5	104.1
	250	244	9.9	97.7
BisPB	5	4.5	3.5	90.0
	100	105	12.5	104.8
	250	244	12.0	97.8
BPAF	5	4.6	5.0	91.0
	100	105	5.4	105.2
	250	236	12.2	94.2
BPP	5	5.5	7.0	109.6
	100	98.8	7.2	98.8
	250	246	8.4	98.5
TCC	5	4.5	6.9	90.0
	100	104	8.5	104.0
	250	247	5.4	98.7

^a Media de 18 determinaciones; RSD (%): desviación estándar relativa; Rec (%): porcentaje de recuperación

En cuanto a la recuperación, los valores son próximos al 100% en todos los casos, oscilando entre el 90.0% para el TCC y el 111.1% para el BPB. La precisión entre días, en términos de %RSD, se encuentra por debajo del 15%, por lo que están dentro de los límites aceptables para cumplir los requisitos establecidos en la guía de validación empleada, según la cual se consideran aceptables valores iguales o inferiores al 15%, en general al 20% en la zona próxima al límite de cuantificación del método. Los datos obtenidos para la precisión y la veracidad indican que el método propuesto para determinar MPB, EPB, PPB, BPB, PhPB, TCC, BPA, BPS, BPF, BPAF, BPE, BisPB y BPP en muestras de mejillón es preciso, y que la presencia de interferentes, que podrían afectar a la supresión iónica en espectrometría de masas, no afecta a la calidad del método propuesto.

5.4.4. Selectividad

La forma práctica de estimar la selectividad es mediante la comparación de los cromatogramas correspondientes al blanco con los patrones internos y a la muestra contaminada con los compuestos de interés en ambos casos en presencia de los patrones internos. En las **Figura III. 15A y 15B** se muestran dichos cromatogramas.

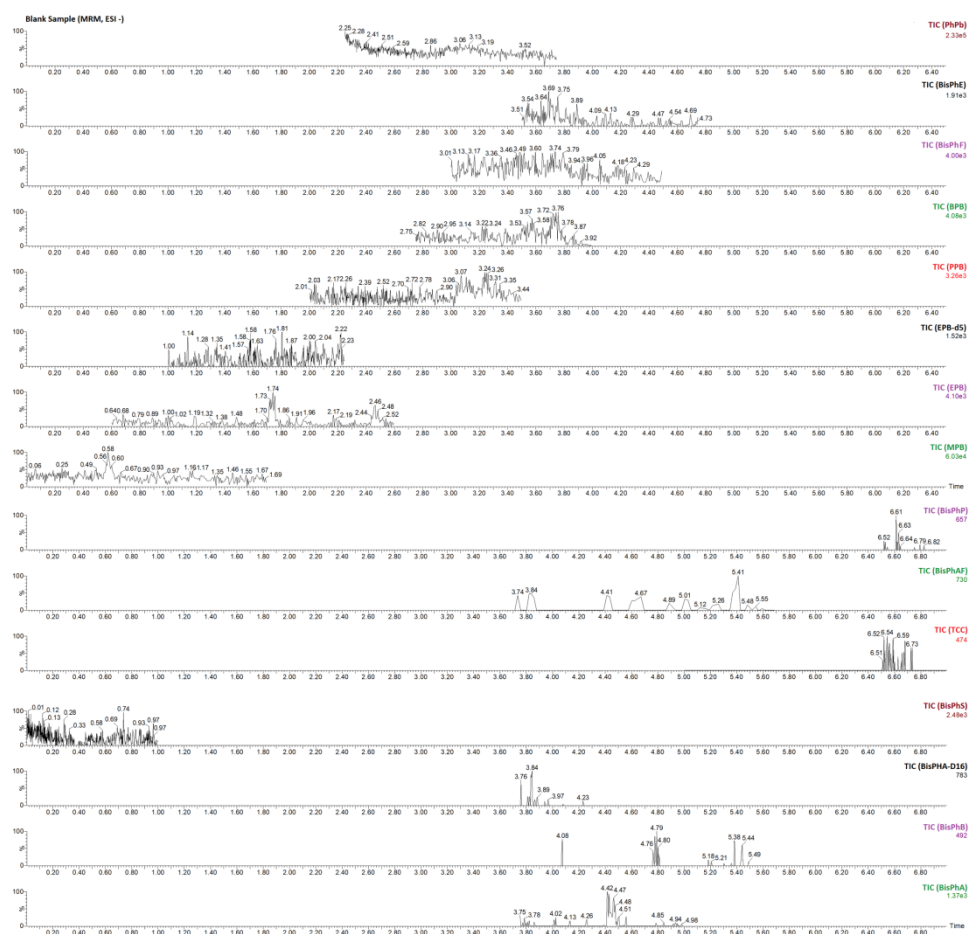


Figura III. 15A. Cromatograma del blanco.

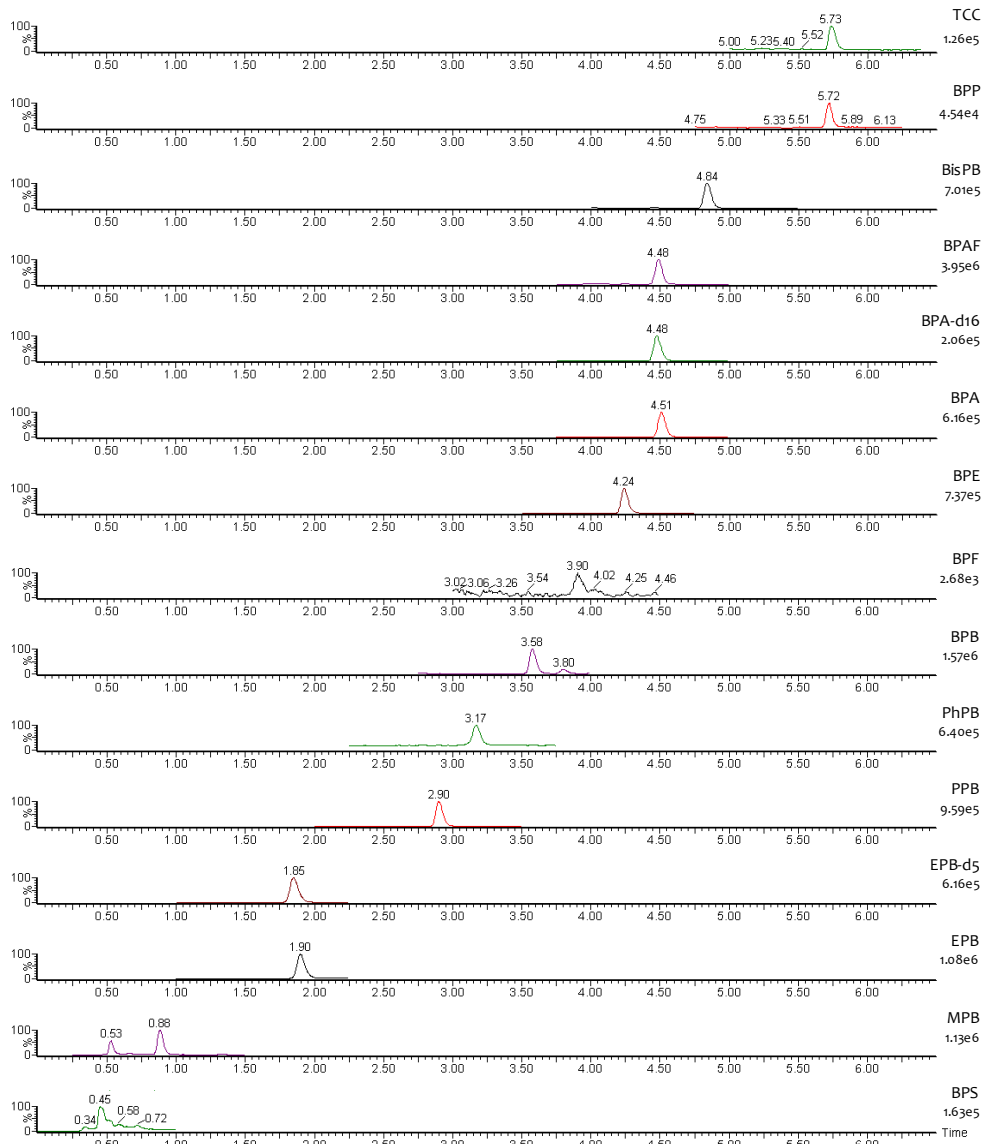


Figura III. 15B. Cromatograma del patrón en muestra.

La comparación de ambos cromatogramas, demuestra la no existencia de interferentes a los tiempos de retención de los diferentes analitos. Por tanto, se concluye que el método propuesto es un método altamente selectivo.

5.5. Aplicación del método analítico

Tras la validación, se aplicó el método desarrollado para determinar los niveles de analitos objeto de estudio en muestras de mejillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*) procedentes de cinco áreas diferentes de la costa de Granada. Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado. Los datos obtenidos en el análisis de las mismas se recogen en la **Tabla III. 13**.

Tabla III.13. Aplicación del método analítico a muestras de *Mytilus galloprovincialis*.

Área	Muestra	Concentración ($\mu\text{g kg}^{-1}$) (RSD %)			
		MPB	EPB	PPB	BPB
Área 1	A	76.0 (2.1)	1.5 (3.8)	1.2 (14.9)	43.4 (1.7)
	B	93.6 (0.6)	1.1 (0.4)	D	25.6 (2.0)
	C	79.0 (2.3)	2.3 (1.2)	D	26.0 (1.6)
	D	42.0 (0.6)	1.0 (3.0)	D	22.2 (2.4)
	E	48.3 (1.4)	D	ND	19.0 (0.2)
	F	44.4 (1.8)	D	ND	20.8 (0.9)
Área 2	A	44.2 (1.2)	D	ND	21.6 (4.9)
	B	40.6 (1.9)	1.3 (2.5)	D	24.6 (3.2)
	C	38.7 (1.0)	D	ND	19.4 (1.0)
	D	68.9 (0.1)	D	D	21.9 (1.8)
	E	66.1 (1.5)	1.7 (2.3)	D	21.6 (1.7)
	F	70.5 (1.1)	D	D	17.6 (1.4)
Área 3	A	44.6 (1.1)	D	D	37.1 (2.9)
	B	52.0 (0.8)	1.0 (3.6)	D	21.1 (3.2)
	C	49.5 (1.2)	D	ND	18.2 (1.8)
	D	32.6 (2.8)	D	D	19.7 (2.3)
	E	35.7 (1.3)	1.0 (5.6)	D	24.1 (1.6)
	F	30.4 (0.8)	1.0 (6.2)	D	19.5 (3.2)
Área 4	A	11.4 (1.8)	D	ND	18.6 (3.2)
	B	12.3 (0.9)	D	ND	22.1 (1.8)
	C	12.8 (2.2)	D	ND	19.6 (1.5)
	D	13.9 (0.8)	D	ND	22.6 (0.6)
	E	14.6 (1.2)	D	ND	18.9 (2.2)
	F	14.5 (1.5)	D	ND	21.7 (2.0)
Área 5	A	22.7 (0.5)	D	ND	17.0 (0.9)
	B	21.2 (2.7)	D	ND	18.8 (4.1)
	C	23.1 (2.1)	D	ND	19.0 (1.7)
	D	21.6 (0.9)	D	ND	17.4 (0.4)
	E	24.5 (0.3)	D	D	19.8 (1.1)
	F	24.0 (0.8)	D	ND	17.4 (2.5)

RSD (%): desviación estándar relativa; D: detectado ($>\text{LOD}$, pero $<\text{LOQ}$); ND: no detectado ($<\text{LOD}$)

Tabla III.13 cont. Aplicación del método analítico a muestras de *Mytilus galloprovincialis*.

Área	Muestra	Concentración ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) (RSD %)		
		BPA	BPAF	TCC
Área 1	A	157.5 (4.0)	2.7 (9.1)	43.3 (6.5)
	B	172.9 (0.9)	1.3 (4.6)	39.4 (10.5)
	C	73.0 (7.6)	D	35.2 (10.1)
	D	70.6 (4.2)	D	67.6 (4.9)
	E	75.5 (3.5)	D	56.6 (9.1)
	F	75.3 (6.8)	D	61.2 (6.2)
Área 2	A	29.6 (9.6)	1.8 (14.8)	26.9 (13.7)
	B	38.3 (1.2)	D	27.6 (12.5)
	C	26.8 (4.8)	D	32.4 (14.8)
	D	38.9 (7.0)	D	57.2 (9.5)
	E	71.0 (1.1)	D	48.2 (10.9)
	F	28.3 (4.0)	D	50.2 (5.3)
Área 3	A	50.5 (3.0)	1.2 (12.6)	3.7 (8.2)
	B	27.6 (2.6)	D	3.4 (6.5)
	C	24.5 (1.6)	D	4.0 (4.2)
	D	47.2 (1.7)	D	2.3 (6.7)
	E	37.3 (7.8)	D	3.8 (11.7)
	F	23.2 (5.6)	D	4.1 (2.7)
Área 4	A	35.3 (4.3)	D	17.4 (13.6)
	B	36.0 (2.0)	ND	14.1 (9.6)
	C	32.1 (2.3)	D	10.2 (14.5)
	D	38.4 (1.8)	D	7.8 (7.3)
	E	39.7 (39.7)	D	7.7 (7.9)
	F	10.7 (4.0)	ND	14.0 (11.6)
Área 5	A	19.2 (3.5)	D	ND
	B	24.8 (1.0)	D	ND
	C	17.7 (3.9)	D	ND
	D	19.3 (6.9)	ND	ND
	E	24.5 (2.9)	D	ND
	F	27.6 (1.1)	D	ND

RSD (%): desviación estándar relativa; D: detectado (>LOD, pero <LOQ); ND: no detectado (<LOD)

Los resultados obtenidos demuestran la incorporación de varios contaminantes al cuerpo del animal. Se detectaron y cuantificaron MPB, BPB, BPA y TCC en la mayoría de las muestras analizadas. Sin embargo, no se detectaron BPS, PhPB, BPF, BPE, BisPB y BPP en ninguna de ellas. EPB, PPB y BPAF, se detectaron en un gran número de muestras, pero no se pudieron cuantificar en algunas de ellas (<LOD, >LOQ).

Las concentraciones oscilan entre 11.4 y 93.6 ng g⁻¹ para MPB, 17.4 y 43.4 ng g⁻¹ para BPB, 10.7 y 172.9 ng g⁻¹ para BPA y 2.3 y 67.6 ng g⁻¹ para TCC. El análisis de varianza mostró una influencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) de la ubicación del área de muestreo en los valores de EDCs encontrados para MPB, BPA y TCC, con las áreas residenciales urbanizadas 1, 2 y 3, mostrando claramente valores más altos que las áreas más agrícolas 4 y 5. El área 1 de usos mixtos residenciales e industriales mostró los valores más altos para todos los compuestos analizados con valores medios de 63.9, 1.5, 1.2, 26.2, 104.1, 2.0 y 50.6 ng g⁻¹ para MPB, EPB, PPB, BPB, BPA, BPAF y TCC, respectivamente. En la **Figura III.16** se muestra un cromatograma de una de las muestras analizadas.

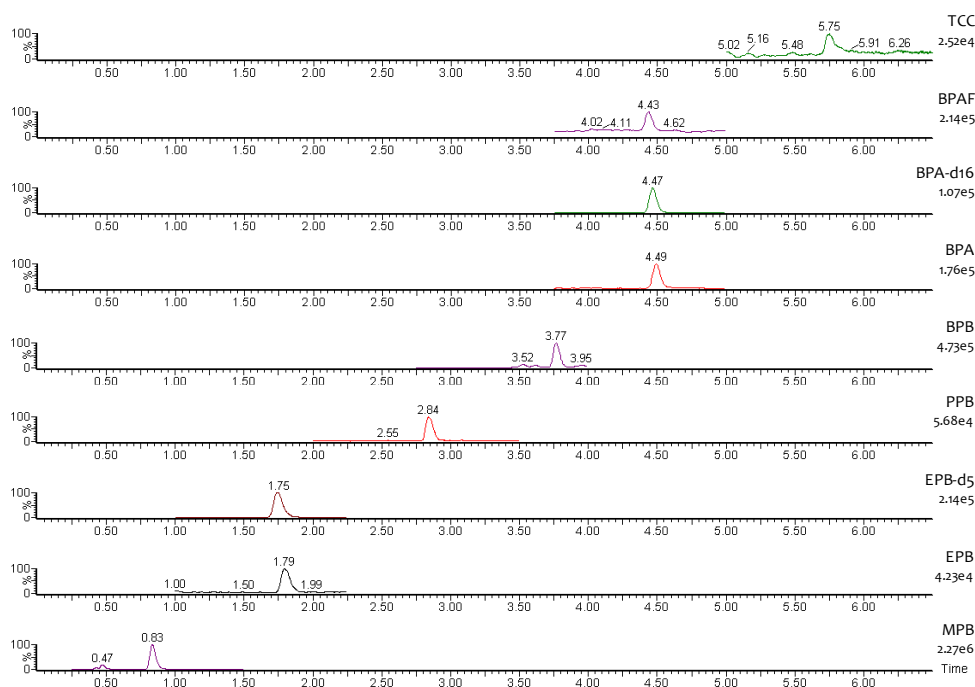


Figura III. 16. Cromatograma de una muestra natural de mejillón mediterráneo.

CAPÍTULO IV
Holothuria tubulosa:
Estudio de bioacumulación

1. OBJETIVO

El objetivo de los trabajos realizados y presentados en este capítulo es:

- Llevar a cabo un estudio de bioacumulación/biodegradación de contaminantes en medios contaminados a propósito con los EDCs objeto de estudio: compuestos orgánicos perfluorados, parabenos, bisfenol A, benzofenona 3, triclosán y triclocarbán. En él, los especímenes de *Holothuria tubulosa* han sido expuestos de forma forzada a los contaminantes tanto de forma puntual como continuada durante 6 meses.

2. BIOACUMULACIÓN DE CONTAMINANTES

La bioacumulación es un proceso en el que una sustancia química se absorbe en un organismo por todas las vías posibles de exposición (respiratoria, digestiva y a través de la piel), de forma que alcanzan concentraciones superiores a las encontradas en el medio ambiente que rodea al individuo o en su fuente de alimentación. Este parámetro va a proporcionarnos datos de gran interés sobre el resultado neto de las tasas de adsorción de sustancias en las vías de exposición y la eliminación química de las mismas.

La acumulación de contaminantes en el organismo puede determinarse a través del denominado factor de bioacumulación (**BAF**) o del factor de bioconcentración (**BCF**). En este trabajo, ambos se calcularon como¹⁰⁴:

$$\mathbf{BAF \text{ o } BCF (L \text{ kg}^{-1}) = C_{hol} / C_w}$$

C_{hol} es la concentración de EDCs en intestino o gónadas de *Holothuria tubulosa* en ng g^{-1} (m.s.)

C_w es la concentración de EDCs libremente disuelta en agua en ng mL^{-1}

La bioacumulación y/o la bioconcentración se clasificaron utilizando tres categorías: si los valores superan los 1000 L kg^{-1} : **no bioacumulativo**; si superan los 2000 L kg^{-1} : **bioacumulativo**; y si superan los 5000 L kg^{-1} : **muy bioacumulativo**. Las clasificaciones se seleccionaron según los criterios establecidos por diferentes pautas / leyes gubernamentales^{104,105}. Un BAF o BCF bioacumulativo se consideró con un valor logarítmico entre 3.0 (1000 L kg^{-1}) y 3.7 (2000 L kg^{-1}), mientras que un valor \log BAF o BCF muy bioacumulativo se estimó cualquier valor ≥ 3.7 (5000 L kg^{-1}).

¹⁰⁴ Arnot, J.A., Gobas, F.A.P.C. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environmental Reviews*, 14 (2006) 257-297.

¹⁰⁵ Wilkinson, J.L., Hooda, P.S., Swinden, J., Barker, J., Barton, S. Spatial (bio) accumulation of pharmaceuticals, illicit drugs, plasticisers, perfluorinated compounds and metabolites in river sediment, aquatic plants and benthic organisms. *Environmental Pollution*, 234 (2018) 864-875.

El factor de acumulación biota-sedimento (**BSAF**) es otro parámetro relevante utilizado para describir y predecir la bioacumulación de contaminantes orgánicos en organismos acuáticos a través de sedimentos^{106,107}. **BSAF** se calculó en este trabajo como:

$$\text{BSAF (g kg}^{-1}\text{)} = C_{hol} / C_{sed}$$

C_{hol} es la concentración de EDCs en intestino o gónadas de *Holothuria tubulosa* en ng g⁻¹ (m.s.)
 C_w es la concentración de EDCs medida en sedimento en ng g⁻¹

Asimismo, resulta importante conocer la migración relativa de contaminantes entre la fase sólida y la fase acuática, la cual se determina a través del **coeficiente de distribución (K_d)**¹⁰⁸. K_d ha sido calculado en este estudio como:

$$K_d = C_{sed} / C_w$$

C_{sed} es la concentración de PFAS medida en el sedimento en ng g⁻¹ (m.s.)
 C_w es la concentración de PFAS medida en la fase acuosa en ng mL⁻¹

De manera adicional, cabe destacar el concepto de **biomagnificación**, que se define como el proceso en el que aumentan sucesivamente los niveles de sustancias químicas persistentes conforme se sube de nivel trófico. Es una transferencia trófica de la contaminación: los animales que pertenecen a los eslabones más altos de la cadena trófica se alimentan de otros más pequeños que contienen compuestos bioacumulados. Estos son difíciles de eliminar y quedan almacenados en los tejidos de los individuos pertenecientes a los

¹⁰⁶ Zhao, Y.G., Wan, H.T., Wong, M.H., Wong, C.K.C. Partitioning behavior of perfluorinated compounds between sediment and biota in the Pearl River Delta of South China. *Marine Pollution Bulletin*, 83 (2014) 148-154.

¹⁰⁷ Labadie, P., Chevreuil, M. Partitioning behavior of perfluorinated alkyl contaminants between water, sediment and fish in the Orge River (nearby Paris, France). *Environmental Pollution*, 159 (2011) 391-397.

¹⁰⁸ Ahrens, L., Yeung, L.W.Y., Taniyasu, S., Lam, P.K.S., Yamashita, N. Partitioning of perfluorooctanoate (PFOA), perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctane sulfonamide (PFOSA) between water and sediment. *Chemosphere*, 85 (2011) 731-737.

niveles tróficos más bajos. Cuando estos últimos son depredados por miembros de niveles tróficos superiores, los compuestos alcanzan niveles muy elevados en sus organismos, provocando un impacto directo sobre su salud. Se expresa como factor de biomagnificación (**BMF**) y se calcula como¹⁰⁹:

$$\mathbf{BMF (g kg^{-1}) = C_B / C_D}$$

C_B es la concentración de EDCs en el organismo en ng g^{-1}

C_D es la concentración de EDCs de la dieta del organismo en ng g^{-1}

¹⁰⁹ Gobas, F., Morrison, H.A. Bioconcentration and biomagnification in the Aquatic Environment. Handbook of property estimation methods for chemicals. *Environmental Health Sciences*. Boca Raton (2000) 189-231 pp.

3. ESTUDIO DE BIOACUMULACIÓN/BIODEGRADACIÓN

3.1. Captura de los animales en su medio

Se recolectaron, con los correspondientes permisos legales, a mano por buzos a 10-15 metros de profundidad, en la playa de San Cristóbal de Almuñécar, Granada ($36^{\circ} 44' 00.7''$ N; $3^{\circ} 42' 17.9''$ W), numerosos ejemplares de *Holothuria tubulosa* Gmelin 1791, con un tamaño similar de alrededor de 200 g. Las muestras se llevaron a la instalación experimental en contenedores refrigerados a 4 °C, sin ningún daño, allí se aclimataron a las condiciones experimentales durante dos semanas. La toma de muestras fue llevada a cabo por buzos experimentados que colaboran en el proyecto y se realizó en las proximidades de emisarios de vertido de aguas residuales. En la **Figura IV.1** se muestra la zona de muestreo.



Figura IV.1. Toma de muestra de los especímenes objeto de estudio.

3.2. Estudio de laboratorio

Se prepararon tres unidades experimentales independientes en las instalaciones del acuario del Departamento de Zoología de la Universidad de Granada. Cada unidad estaba compuesta por nueve tanques de polipropileno con suministro de agua de mar en un sistema de recirculación cerrado, provistos de un filtro biológico (skimmer de proteínas), una unidad de

esterilización UV, un sistema de aireación, un enfriador, un calentador y una bomba de agua. Los tanques (42 x 36 x 25 cm) tenían una capacidad de 25 L y una superficie inferior de 0.15 m². Se colocó una capa de 5 cm de arena de sílice, con un tamaño de partícula de 0.4 a 0.8 mm, en el fondo de los tanques. Se aplicó un fotoperiodo artificial de 12 h de luz / 12 h de oscuridad. En la **Figura IV. 2** se muestra el acuario experimental.

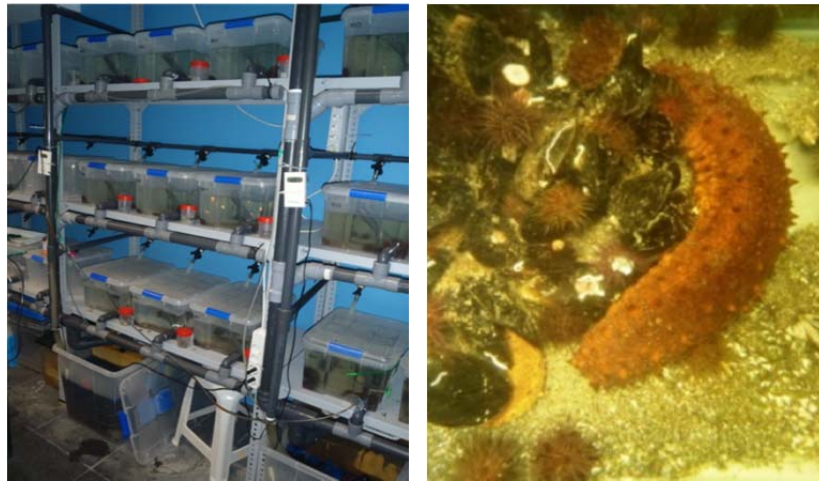


Figura IV.2. Imagen del acuario experimental.

Se realizó un seguimiento diario de las características fisicoquímicas del agua durante todo el período experimental observándose una gran estabilidad con valores medios de: temperatura de 20 ± 2 °C, salinidad alrededor de 37 ± 2 PSU (conductividad = 50.3 ± 0.9 mS cm⁻¹), pH de 8.3 ± 0.5 , concentración de oxígeno disuelto sobre 6.0 ± 0.5 mg L⁻¹ (con un nivel de saturación del 90%), nitratos de 50 ± 4 mg L⁻¹, nitritos de 0.1 ± 0.01 mg L⁻¹ y amonio de 0.25 ± 0.04 mg L⁻¹. El contenido promedio de carbono orgánico de los sedimentos de los bloques fue de 0.5 ± 0.1 %, sin diferencias significativas entre tanques y tratamientos. Para las mediciones se utilizaron los siguientes instrumentos: termómetro digital Hanna Instruments[®] (modelo HI Checktemp 1), medidor portátil de conductividad/TDS HACH[®] sensION™ + EC5 con sonda de conductividad (modelo 50 60), multímetro portátil HACH[®] HQ40d con una sonda de pH (modelo pHC101) y con una sonda luminiscente de oxígeno disuelto (modelo LDO101). Los análisis de nitrato, nitrito y amonio se realizaron

utilizando los kits Hanna Instruments[®] Test (modelos HI 3874, 3873 y 3826, respectivamente). La temperatura del agua se midió con termostatos AKO[®] (modelo 14716) y RENA[®] (modelo TE-2000) conectados a enfriadores de agua HAILEA[®] (modelo HC130A) y calentadores genéricos eléctricos de acuario. Los especímenes de *Holothuria* fueron alimentados una vez por semana con 10 g de alga Laminaria seca picada (Algamar[®] Kombu).

3.2.1. Diseño experimental

Los animales (n = 108) se distribuyeron aleatoriamente en 3 bloques de 36 especímenes cada uno, colocando 4 animales por tanque en las unidades experimentales. Después de un período de aclimatación de dos semanas, alimentándose desde el primer día, se agregaron disoluciones de los compuestos objeto de estudio (PFBuA, PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFOS, MPB, EPB, PPB, TCS, TCC, BP₃ y BPA) a cada unidad experimental para lograr dosis de contaminantes de 1.0 mg L⁻¹ (Bloque 1), 0.5 mg L⁻¹ (Bloque 2) y 0.1 mg L⁻¹ (Bloque 3), con una concentración de agua enriquecida en los tres bloques que difieren en un factor de 2-10. Los niveles de concentración utilizados se seleccionaron en base a los medidos previamente en estos organismos (hasta 3.97 ng g⁻¹ para PFOA)⁷³ y con el fin de observar una clara tendencia y diferencias entre las concentraciones dopadas.

3.2.2. Toma de muestra

El muestreo en los tanques se extendió a lo largo de seis meses. Se tomaron muestras inmediatamente antes de la incorporación de los contaminantes al agua y en los días 1, 8, 15, 22, 27, 38, 53, 86 y 197. Al inicio de los experimentos, se analizaron muestras tomadas antes de la adición de los compuestos a los tanques (control) y se demostró la práctica ausencia de analitos (concentración menor que el límite de detección del método).

En cada muestreo, se recolectaron a mano tres muestras de *Holothuria* y las correspondientes alícuotas de 10 mL de agua y 1 g de sedimento de cada unidad experimental, utilizando botellas de polipropileno ámbar previamente limpiadas con acetona y metanol. Se separó el tracto digestivo y las gónadas de

los animales y se guardó la pared exterior del cuerpo (carcasas) para futuros experimentos (**Figura IV.3**). Este material diseccionado se colocó en bolsas de polietileno estériles y se almacenó a -40 °C hasta su posterior análisis.



Figura IV.3. Imagen de un espécimen diseccionado de *Holothuria tubulosa*.

3.2.3. Tratamiento de muestra

Para el procesamiento y el análisis de las muestras de intestino y gónadas se siguió un método de análisis desarrollado y validado por el grupo de investigación previo a mi incorporación al mismo como doctoranda. En este se lleva a cabo la determinación de estos contaminantes en muestras de *Holothuria tubulosa* y de sedimentos marinos recogidos en el entorno⁷³. A continuación, se resume el tratamiento realizado a cada muestra.

Todas las muestras de *Holothuria tubulosa* (intestino y gónadas) y de sedimento fueron liofilizadas, homogeneizadas y molidas. Se pesaron alícuotas de 0.5 g de las muestras en tubos de vidrio de 12 mL, que contenían 100 µL de una solución de metanol con los patrones internos (PFOA-¹³C₄, BP-d₁₀, EPB-d₅ y BPA-d₁₆) a una concentración de 250 ng mL⁻¹. Se añadieron 7 mL de acetonitrilo, se agitaron durante 2 minutos y se centrifugaron durante 10 min a 4050 x g; el proceso de extracción se realizó por duplicado. Para el proceso de limpieza (*clean-up*) de los extractos, se aplicó una extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE). Los sobrenadantes obtenidos de las dos extracciones de cada muestra se

añadieron a un tubo cónico que contenía 800 mg de C18. La mezcla se agitó a mano durante 2 minutos y se centrifugó durante 5 min a 4050 x g. La fase orgánica se evaporó a sequedad a temperatura ambiente bajo una corriente de nitrógeno, el extracto resultante se reconstituyó en 0.25 mL de metanol:agua (50:50, v/v) y se filtró con un filtro de Nylon de 0.22 μm .

Las muestras de agua se filtraron a través de un filtro de membrana de 0.45 μm . Posteriormente, 2 mL de muestra, conteniendo 100 μL de una solución de metanol con los patrones internos a una concentración de 250 ng mL⁻¹, se evaporaron a sequedad bajo una corriente de nitrógeno a temperatura ambiente, y el residuo resultante se reconstituyó en 0.25 mL de metanol:agua (50:50, v/v) y se filtró con un filtro de Nylon de 0.22 μm .

3.2.4. Análisis de las muestras

Los análisis cromatográficos se realizaron utilizando un sistema LC Agilent serie 1200 acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo 6410, equipado con una fuente de ionización de electrospray (ESI) (Agilent, EEUU). Las condiciones del espectrómetro se muestran en la **Tabla IV.1**.

Tabla IV.1. Condiciones generales del espectrómetro de masas utilizadas.

Voltaje de capilar	-3 kV
Temperatura de la fuente	350 °C
Flujo de gas de cono	9 L min ⁻¹
Presión del gas nebulizador	0.28 MPa
Gas de cono/desolvatación	N ₂ (\geq 99.995%)
Gas de colisión	Ar (99.999%)

Se emplearon dos transiciones para cada analito, una para la cuantificación y otra para la confirmación de los compuestos (**Tabla IV.2**). El espectrómetro de masas funcionó en modo negativo (ESI-).

Tabla IV.2. Condiciones de medida del espectrómetro de masas.

Analito	Transición SRM (m/z)	CV (V)	CE (eV)	IS
PFBuA	213 → 169 ^a	-55	0	PFOA- ¹³ C ₄
	213 → 51.6 ^b	-55	0	
PFPeA	263 → 219 ^a	-68	0	PFOA- ¹³ C ₄
	263 → 69 ^b	-68	0	
PFHxA	313 → 269 ^a	-60	0	PFOA- ¹³ C ₄
	313 → 119 ^b	-60	0	
PFHpA	363 → 318.9 ^a	-68	0	PFOA- ¹³ C ₄
	363 → 168.9 ^b	-68	0	
PFOA	413 → 369 ^a	-68	-4	PFOA- ¹³ C ₄
	413 → 169 ^b	-68	-4	
PFOS	499 → 80 ^a	-145	-40	PFOA- ¹³ C ₄
	499 → 51.5 ^b	-145	-40	
MPB	151.2 → 92.1 ^a	-82	-16	EPB-d ₅
	151.2 → 136.1 ^b	-82	-20	
EPB	165.2 → 92.1 ^a	-79	-20	EPB-d ₅
	165.2 → 137.1 ^b	-79	-20	
PPB	179.2 → 92.1 ^a	-99	-24	EPB-d ₅
	179.2 → 136.1 ^b	-99	-24	
TCS	287 → 141.8 ^a	-60	-10	BPA-d ₁₆
	287 → 35 ^b	-60	-10	
TCC	313 → 160 ^a	-120	-8	BPA-d ₁₆
	313 → 126 ^b	-120	-8	
BPA	227.3 → 133.0 ^a	-126	-32	BPA-d ₁₆
	227.3 → 211.8 ^b	-126	-32	
BP-3	229 → 151.1 ^a	120	16	BP-d ₁₀
	229 → 105 ^b	120	16	
PFOA- ¹³ C ₄	417.1 → 371.9 ^a	-77	-4	-
	417.1 → 172 ^b	-77	-4	
BP-d ₁₀	193 → 110 ^a	60	16	-
	193 → 82 ^b	60	16	
EPB-d ₅	170 → 92 ^a	-80	-24	-
	170 → 138 ^b	-80	-24	
BPA-d ₁₆	241.2 → 141.9 ^a	-113	-28	-
	241.2 → 223 ^b	-113	-28	

CV: Voltaje de cono (V); CE: Energía de colisión (eV); IS: Patrón interno.

^a SRM transición para cuantificación; ^b SRM transición para confirmación.

En la **Tabla IV.3** se muestran los parámetros fijados en el cromatógrafo.

Tabla IV.3. Condiciones cromatográficas utilizadas.

Fase estacionaria	HALO C18 (50 mm x 4.6 mm i.d., 2.7 μ m)		
Fase móvil	A: ácido acético/acetato amónico en agua (pH 4.4) B: ácido acético/acetato amónico en metanol (pH 4.4)		
Gradiente cromatográfico	Tiempo (min)	% A	% B
	0.0	72	28
	14.0	30	70
	19.0	20	80
	25.0	0	100
	27.0	0	100
Flujo	0.6 mL min ⁻¹		
Volumen de inyección	20 μ L		
Temperatura de la columna	30 °C		
Temperatura de la muestra	Ambiente		

3.2.5. Calibración metodológica y control de calidad

Para la calibración, se prepararon patrones en matriz con ocho niveles de concentración diferentes de los analitos. Teniendo en cuenta las respuestas específicas y los niveles de concentración en muestras naturales, se utilizaron diferentes rangos de concentración para cada matriz: de 0.1 a 500 ng g⁻¹ m.s. para muestras de *Holothuria* y de sedimentos, y de 0.01 a 300 ng mL⁻¹ para muestras de agua. La mezcla se agitó en vórtex durante dos minutos y se dejaron reposar durante 24 horas a 4 °C en oscuridad antes de ser analizadas, lo cual permite que los compuestos entren en contacto completo con la muestra.

Se llevaron a cabo además algunas medidas de control de calidad (QA/QC). Se inyectaron muestras de blanco (muestras de un tanque sin contaminación de analitos) para vigilar la contaminación de fondo. Estos blancos se trataron de la misma manera que el resto de muestras y se inyectaron en el sistema LC-MS/MS. No se detectaron cantidades cuantificables de los compuestos objeto de estudio (<LOD). Adicionalmente, para evaluar posibles contaminaciones y la variabilidad del análisis instrumental, se inyectaron por triplicado patrones (muestras de blanco dopadas a concentraciones de 50, 200 y 500 ng g⁻¹ m.s.) y un estándar en la fase móvil inicial (100 ng mL⁻¹) cada 20 muestras.

4. ESTUDIO DE BIOACUMULACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS PERFLUORADOS

4.1. Distribución de PFAS en agua y sedimentos

Las muestras de agua utilizada en los bloques de experimento recogidas antes de la adición de compuestos, revelaron trazas de PFAS ($< 2 \text{ ng mL}^{-1}$), lo que indica una transferencia insignificante de contaminantes al agua durante el proceso de adición. Durante la exposición a contaminantes, se encontraron niveles detectables de los seis compuestos en todas las muestras (**Tablas IV.4a y 4b**). La media de las concentraciones ($n = 3$) de PFAS medidas en muestras de agua se encontraron entre 0.03 ng mL^{-1} para PFOS y 32.7 ng mL^{-1} para PFOA, en el bloque de baja exposición (Bloque 3), entre 0.10 ng mL^{-1} para PFOS y 139 ng mL^{-1} para PFBuA en el bloque de media exposición (Bloque 2), y entre 0.62 ng mL^{-1} para PFOS y 276 ng mL^{-1} para PFBuA en el bloque de alta exposición (Bloque 1). Los perfiles de concentración de PFAS fueron relativamente similares durante la fase de exposición en los tres bloques. En el compartimento de agua, PFBuA fue el compuesto más abundante en todos los experimentos, mientras que PFOS fue el menos abundante.

Como era de esperar y teniendo en cuenta la solubilidad de los analitos, éstos se detectaron en concentraciones más elevadas en las muestras de sedimentos que en las de agua. Estos resultados sugieren que los sedimentos pueden ser una fuente importante de PFAS para la biota bentónica. La media de las concentraciones ($n = 3$) de estos compuestos medidas en muestras de sedimento se encontraron entre 0.42 ng g^{-1} (m.s.) para PFOS y 87.9 ng g^{-1} (m.s.) para PFBuA en el Bloque 3, entre 7.08 ng g^{-1} (m.s.) para PFHxS y 152 ng g^{-1} (m.s.) para PFBuA en el Bloque 2, y entre 17.6 ng g^{-1} (m.s.) para PFHxA y 695 ng g^{-1} (m.s.) para PFOS en el Bloque 1. La cinética de desaparición de C6-C8 y PFOS se ajustó significativamente a un modelo asintótico. También se encontró un perfil similar entre la cantidad de dopaje y la concentración de PFAS en la fase acuosa para todos los compuestos objeto de estudio, lo que sugiere que los niveles de dopaje no tienen influencia en la distribución en el sedimento.

Tabla IV.4a. Valores de concentración (media y desviación estándar) de PFAS medidos en muestras de agua en los tres bloques de exposición.

Bloque	Día	PFBuA		PFPeA		PFHxA	
		Media	SD	Media	SD	Media	SD
Blanco	0	1.2	0.4	--	--	0.25	0.03
Bloque 1	1	156	1	52.4	0.7	86	2
	8	188	0.3	63.8	0.2	83	1
	15	133	2	45.0	0.2	54.9	0.2
	22	144	1	48.4	0.1	49.8	0.6
	27	172	0.3	56.4	0.2	56.1	0.3
	38	155	1	50.6	0.1	45.5	0.4
	53	168	1	52.3	0.3	36.8	0.2
	86	240	2	72.4	0.2	22.7	0.4
	197	276	4	72.9	0.3	14.0	0.3
Bloque 2	1	99.3	0.1	32.1	0.1	36.5	0.3
	8	87.8	0.3	28.3	0.1	23.8	0.2
	15	84.6	0.3	27.2	0.1	18.5	0.2
	22	112	0.2	36.6	0.2	19.1	0.1
	27	81.0	0.9	25.4	0.3	12.1	0.1
	38	92.7	0.3	28.6	0.1	14.5	0.1
	53	151	1	44.4	0.4	17.6	0.3
	86	98.1	0.6	26.8	0.2	4.45	0.03
	197	139	1	34.3	0.2	5.66	0.03
Bloque 3	1	33	2	11.1	0.2	17.5	0.4
	8	21.8	0.3	7.7	0.1	10.8	0.2
	15	18.3	0.3	6.5	0.1	7.8	0.2
	22	19.9	0.4	7.1	0.1	6.7	0.1
	27	18.8	0.3	6.6	0.1	4.9	0.1
	38	25.7	0.1	8.9	0.1	5.9	0.1
	53	25.3	0.1	8.2	0.1	5.0	0.2
	86	26.6	0.3	8.4	0.1	2.9	0.3
	197	27.3	0.2	7.3	0.1	2.4	0.1

Tabla IV.4a cont. Valores de concentración (media y desviación estándar) de PFAS medidos en muestras de agua en los tres bloques de exposición.

Bloque	Día	PFHpA		PFOA		PFOS	
		Media	SD	Media	SD	Media	SD
Blanco	0	2.1	0.1	2.1	0.6	0.06	0.01
Bloque 1	1	126	1	75.8	0.2	0.60	0.01
	8	60.2	0.3	21.0	0.2	--	--
	15	38.6	0.2	22.7	0.2	0.70	0.01
	22	33.7	0.6	33.9	0.3	1.20	0.01
	27	34.8	0.4	18.2	0.3	0.14	0.01
	38	26.8	0.4	13.3	0.1	0.07	0.03
	53	13.1	0.3	9.1	0.1	0.33	0.02
	86	5.4	0.1	7.5	0.2	5.44	0.04
	197	7.2	0.1	5.7	0.2	2.55	0.01
Bloque 2	1	18.9	0.30	10.8	0.1	--	--
	8	16.9	0.21	8.4	1	2.72	0.01
	15	7.5	0.1	7.2	0.1	0.75	0.04
	22	7.3	0.1	7.8	0.1	0.23	0.07
	27	5.2	0.1	7.6	0.3	0.47	0.05
	38	9.9	0.3	8.2	0.2	--	--
	53	8.2	0.3	9.2	0.3	0.53	0.01
	86	2.8	0.1	3.1	0.1	0.10	0.02
	197	5.6	0.1	4.4	0.5	0.37	0.03
Bloque 3	1	20.3	0.2	12.8	0.3	0.03	0.02
	8	9.2	0.2	12.8	0.2	0.19	0.01
	15	6.0	0.7	6.5	0.1	0.39	0.03
	22	4.2	0.5	4.8	0.1	--	--
	27	4.9	0.1	11.7	0.4	0.26	0.01
	38	4.9	0.1	6.6	0.4	0.05	--
	53	4.6	0.3	4.7	0.6	0.04	--
	86	3.3	0.1	4.6	0.1	0.07	0.01
	197	5.2	0.2	5.2	0.4	0.17	0.02

Tabla IV.4b. Valores de concentración (media y desviación estándar) de PFAS medidos en muestras de sedimento en los tres bloques de exposición.

Bloque	Día	PFBuA		PFPeA		PFHxA	
		Media	SD	Media	SD	Media	SD
Blanco	0	1.8	0.3	--	--	2.6	0.1
Bloque 1	1	260	4	95.4	0.3	191	1
	8	202	2	71.0	0.8	101	1
	15	231	1	81.0	0.1	103	2
	22	253	2	88.6	0.3	90	2
	27	211	3	72.8	0.4	71	1
	38	196	2	66.6	0.7	58	1
	53	211	4	66.4	0.2	43	2
	86	194	4	57.3	0.2	18	1
	197	326	2	71.4	0.9	83	1
Bloque 2	1	122	2	40	1	48	2
	8	152	2	53	2	54	3
	15	85	5	26	1	20	1
	22	89	2	27	3	18	1
	27	66	1	20	1	18	2
	38	101	3	31	1	25	1
	53	87	2	25	1	14.1	0.2
	86	26	1	6.6	0.1	8.8	0.1
	197	98	3	21	1	7.1	0.3
Bloque 3	1	29	1	8.7	0.2	18.4	0.5
	8	50	1	16.6	0.3	36.8	0.7
	15	23	2	6.8	0.2	14.6	0.1
	22	21	1	5.5	0.1	9.7	0.9
	27	26	2	7.7	0.2	12.9	0.3
	38	29	2	8.2	0.2	12.0	0.2
	53	34	1	10.1	0.1	11.5	0.1
	86	88	2	23.3	0.3	8.8	0.1
	197	19	1	3.7	0.1	6.3	0.4

Tabla IV.4b cont. Valores de concentración (media y desviación estándar) de PFAS medidos en muestras de sedimento en los tres bloques de exposición.

Bloque	Día	PFHpA		PFOA		PFOS	
		Media	SD	Media	SD	Media	SD
Blanco	0	11.2	0.3	25.7	0.5	--	--
Bloque 1	1	374	2	472	5	206	3
	8	96	1	77	3	20.4	0.9
	15	107	3	122	6	189	3
	22	101	1	240	5	425	10
	27	65	2	63	1	51	1
	38	64	2	60	1	28	1
	53	37	1	48	1	110	3
	86	42	1	75	2	597	13
	197	58	1	31	1	695	15
Bloque 2	1	52	1	46	2	1.8	0.3
	8	97	1	--	--	--	--
	15	33	2	34	3	4.6	0.6
	22	34	1	46	2	33.7	0.7
	27	51	1	79	1	161	5
	38	67	2	89	3	68	1
	53	36	1	49	2	72	1
	86	27.6	0.2	24	1	6.0	0.2
	197	24.6	0.7	119	3	42.9	0.1
Bloque 3	1	38.0	0.9	30.4	0.7	0.40	0.02
	8	--	--	--	--	--	--
	15	37.0	0.3	42.6	0.7	8.7	0.5
	22	27.8	0.3	33	1	8.95	0.3
	27	31.9	0.5	57	0.9	18.1	0.6
	38	32.3	0.4	41.3	0.4	17.8	0.1
	53	32.4	0.3	36.4	0.3	20.6	0.4
	86	30.0	0.4	29.3	0.3	21.8	0.7
	197	26.4	0.9	80.8	2	16.4	0.2

En un estudio similar¹¹⁰, se encontró una distribución semejante de PFAS en agua, sedimentos y biota en el ecosistema del río Llobregat (zona mediterránea, Cataluña). Todas las muestras fueron positivas con al menos uno de los analitos objeto de estudio, siendo los más frecuentes PFBuA, PFOA y PFOS. Las concentraciones medias de estos compuestos medidas en muestras de sedimentos (0.01 – 3.67 ng g⁻¹) y de biota (0.79 – 431 ng g⁻¹) fueron mayores que las encontradas en muestras de agua (0.01 – 233 ng L⁻¹).

4.2. Distribución entre agua y sedimentos marinos

El valor medio de $\log K_d$ entre sedimentos marinos y agua para PFAS en el Bloque 1 estuvo entre 0.11 para PFBuA y 2.46 para PFOS (**Tabla IV.5**). No se observaron diferencias importantes entre los tres bloques dopados. En general, el coeficiente de distribución aumentó con la longitud de la cadena de los PFAS ($R^2 > 0.884$; $p < 0.05$). Los datos experimentales sugieren que, en el medio marino, los PFAS se adsorben principalmente en los sólidos suspendidos en lugar de en la fase disuelta.

Los datos de K_d son esenciales para modelar el transporte y el destino ambiental de los contaminantes^{108,111,112}, pero los datos en PFAS de cadena corta son escasos¹⁰⁷. Yang y col.¹¹³ evaluaron la presencia y distribución de PFAS en agua y sedimentos del río Liao y el lago Taihu en China; las concentraciones de PFOS y ácidos perfluorocarboxílicos de cadena larga en sedimentos fueron mucho más altas que en muestras de agua, lo que indica una distribución preferencial de estos PFAS en sedimentos (el valor promedio de $\log K_d$ se encontró entre 2.16 y 2.88). Estos valores son similares a otro estudio, Higgins

¹¹⁰ Campo, J., Perez, F., Masia, A., Pico, Y., la Farre, M., Barcelo, D. Perfluoroalkyl substance contamination of the Llobregat River ecosystem (Mediterranean area, NE Spain). *Science of the Total Environment*, 503-504 (2015) 48-57.

¹¹¹ Ahrens, L., Siebert, U., Ebinghaus, R. Temporal trends of polyfluoroalkyl compounds in harbor seals (*Phoca vitulina*) from the German Bight, 1999-2008. *Chemosphere*, 76 (2009) 151-158.

¹¹² Higgins, C.P., Mcleod, P.B., Macmanus-Spencer, L.A., Luthy, R.G. Bio-accumulation of perfluorochemicals in sediments by the aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Science & Technology*, 41 (2007) 4600-4606.

¹¹³ Yang, L., Zhu, L., Liu, Z. Occurrence and partition of perfluorinated compounds in water and sediment from Liao River and Taihu Lake, China. *Chemosphere*, 83 (2011) 806-814.

y Luthy¹¹⁴ evaluaron la adsorción de PFAS a sedimentos y encontraron $\log K_{oc}$ de PFOS y PFOA de 2.68 (± 0.09) y 2.11 $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$, respectivamente. También publicaron que la longitud de la cadena de perfluoroalquilo era la característica estructural clave que influye en la adsorción, con cada fracción CF_2 contribuyendo 0.50 - 0.60 unidades logarítmicas a $\log K_{oc}$, y la fracción sulfonato contribuyendo 0.23 unidades logarítmicas en comparación con los análogos de carboxilato. El K_d de campo y los coeficientes de distribución de carbono orgánico normalizado entre sedimento y agua (K_{oc}) también fueron determinados para PFAS en un entorno costero por Ahrens y col.¹⁰⁸ Los resultados sugirieron que las características de los sedimentos tienen una influencia crucial en la capacidad de adsorción de estos compuestos.

4.3. Bioacumulación de PFAS en *Holothuria tubulosa*

Antes de la adición, se detectaron PFAS en muestras de *Holothuria tubulosa* a niveles de concentración entre 26 y 386 ng g^{-1} (m.s.). Estas concentraciones fueron 100 veces más bajas que las encontradas después de ocho días de exposición en el Bloque 1. Todos los PFAS objeto de estudio se detectaron en la biota en niveles más altos que en el agua y los sedimentos, lo que resalta la necesidad de prestar especial atención a los efectos potenciales de estos compuestos en estas especies. Como ocurría con la distribución de PFAS en sedimentos, PFOS y PFOA fueron los más abundantes en las muestras de *Holothuria*. Los organismos bentónicos se exponen con frecuencia a PFAS asociados a sedimentos por ingestión de partículas de los mismos⁷³. La absorción de estos analitos fue rápida y después de sólo 8 días de exposición a 1.0 mg L^{-1} (Bloque 1), la concentración de PFOA en intestino fue 196 mg kg^{-1} (m.s.) y en gónadas fue 37 mg kg^{-1} (m.s.) (**Tabla IV.5**). Para la mayoría de PFAS, las concentraciones en *Holothuria tubulosa* aumentaron con el tiempo hasta el día 38, como se muestra en la **Figura IV.4**.

Las concentraciones medias del día 38 ($n = 3$) para PFOA fueron de hasta 216 y 271 mg kg^{-1} (m.s.) en los Bloques 1 y 2, respectivamente. El día 197 la concentración de PFOA en *Holothuria* disminuyó a 1.6 mg kg^{-1} (m.s.) en el

¹¹⁴ Higgins, C.P., Luthy, R.G. Sorption of perfluorinated surfactants on sediments. *Environmental Science & Technology*, 40:23 (2006) 7251-7256.

Bloque 1 y a 6,6 mg kg⁻¹ (m.s.) en el Bloque 2. Además, no se encontraron diferencias significativas entre el Bloque 2 y el Bloque 3. Estos resultados sugieren que este organismo no tiene un mecanismo activo para excreción de PFAS, como ya se observó para la trucha arcoíris expuesta a PFAS¹¹⁵.

Se detectaron concentraciones más altas de compuestos en el intestino de *Holothuria tubulosa* en comparación con las gónadas. Previamente se estudió que los PFAS se acumulan principalmente en el intestino, la sangre o el hígado, pero no en los tejidos adiposos. Esto puede atribuirse en parte a las propiedades lipofóbicas inherentes de la cadena de perfluoroalquilo¹¹⁵. Hong y col.¹¹⁶ encontraron concentraciones más altas de PFAS en el intestino de los peces en comparación con otros órganos y tejidos como el hígado o las branquias. La larga vida media de los compuestos puede asociarse al hecho de que son metabólicamente inertes y que entran en recirculación enterohepática, un proceso que es más efectivo a medida que aumenta la longitud de la cadena de perfluoroalquilo¹¹⁷. Las concentraciones de los compuestos objeto de estudio fueron significativamente más altas en las gónadas masculinas que en las femeninas. Esto podría explicarse por las diferencias fisiológicas entre machos y hembras que surgen durante los procesos de maduración, así como por el distinto comportamiento alimentario^{118,119}.

¹¹⁵ Martin, J.W., Mabury, S.A., Solomon, K.R., Muir, D.C.G. Bioconcentration and tissue distribution of perfluorinated acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22 (2003) 196-203.

¹¹⁶ Hong, S., Khim, J.S., Wang, T., Naile, J.E., Park, J., Kwon, B.O., Song, S.J., Ryu, J., Codling, G., Jones, P.D., Lu, Y., Giesy, J.P. Bioaccumulation characteristics of perfluoroalkyl acids (PFAAs) in coastal organisms from the west coast of South Korea. *Chemosphere*, 129 (2015) 157-163.

¹¹⁷ Martin, J.W., Mabury, S.A., Solomon, K.R., Muir, D.C.G. Dietary accumulation of perfluorinated acids in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22 (2003) 189-195.

¹¹⁸ Cerveny, D., Grabic, R., Fedorova, G., Grabicova, K., Turek, J., Zlabek, V., Randak, T. Fate of perfluoroalkyl substances within a small stream food web affected by sewage effluent. *Water Research*, 134 (2018) 226-233.

¹¹⁹ Wang, J., Zhang, Y., Zhang, F., Yeung, L.W.Y., Taniyasu, S., Yamazaki, E., Wang, R., Lam, P.K.S., Yamashita, N., Dai, J. Age- and gender-related accumulation of perfluoroalkyl substances in captive Chinese alligators (*Alligator sinensis*). *Environmental Pollution*, 179 (2013) 61-67.

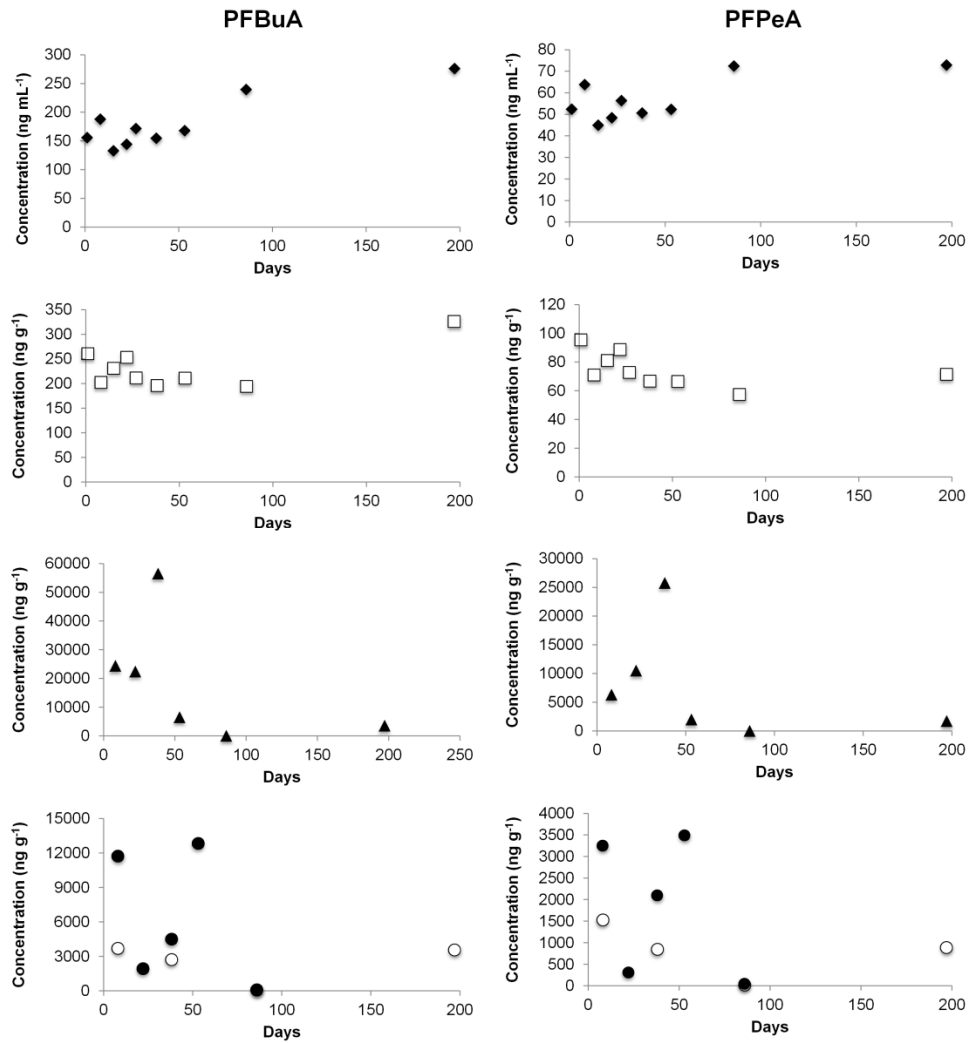


Figura IV.4. Evolución PFAS en el Bloque 1 (mayor exposición) durante los 197 días de experimento. ◆: Muestras de agua; □: muestras de sedimento; ▲: muestras de biota intestinal; ○: muestras de biota de gónadas femeninas; ●: muestras de biota de gónadas masculinas.

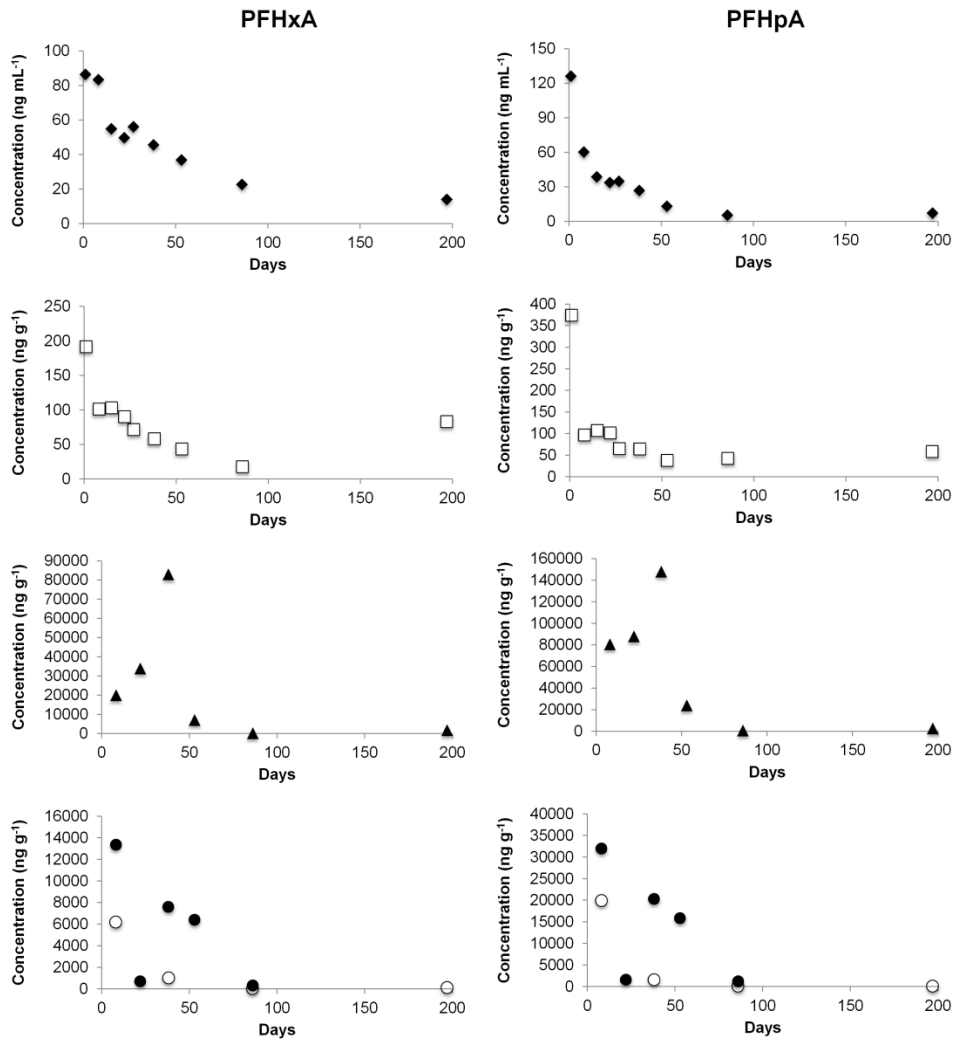


Figura IV.4 cont. Evolución PFAS en el Bloque 1 (mayor exposición) durante los 197 días de experimento. ◆: Muestras de agua; □: muestras de sedimento; ▲: muestras de biota intestinal; ○: muestras de biota de gónadas femeninas; ●: muestras de biota de gónadas masculinas.

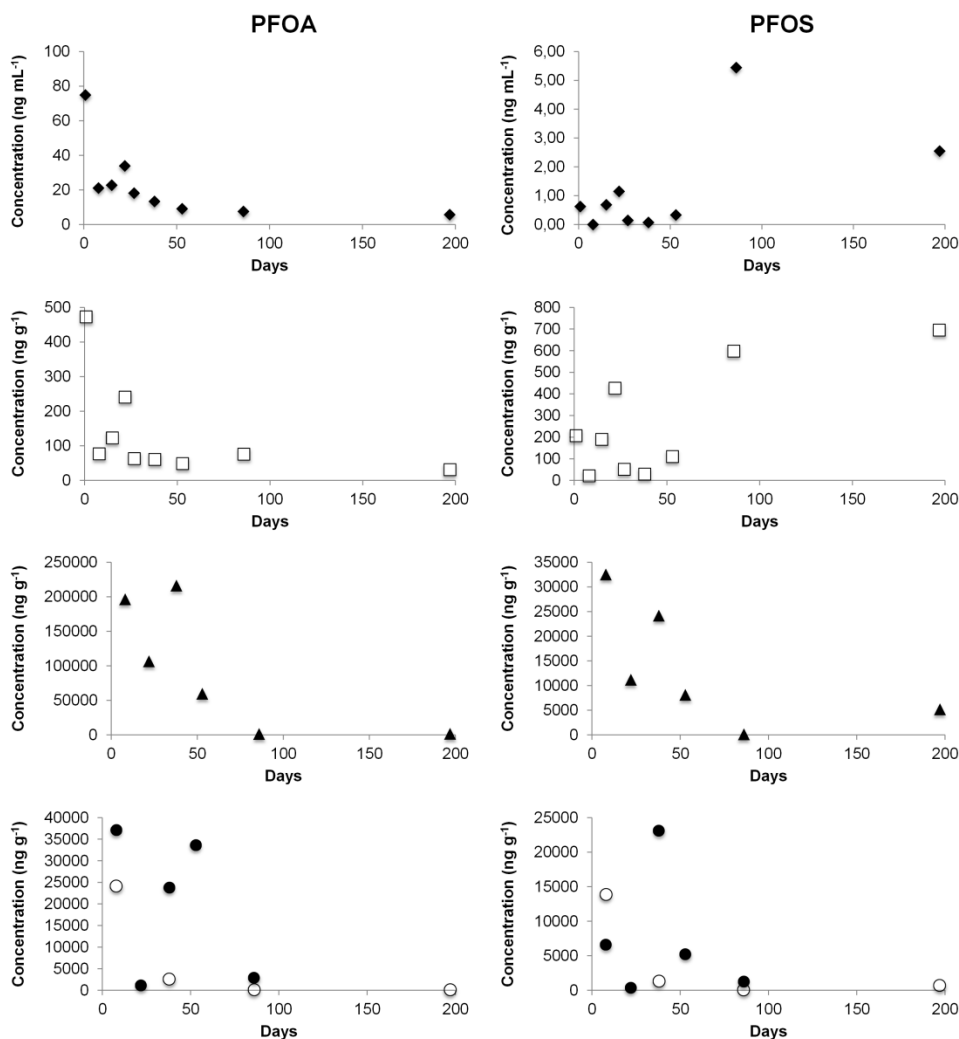


Figura IV.4 cont. Evolución PFAS en el Bloque 1 (mayor exposición) durante los 197 días de experimento. ◆: Muestras de agua; □: muestras de sedimento; ▲: muestras de biota intestinal; ○: muestras de biota de gónadas femeninas; ●: muestras de biota de gónadas masculinas.

4.4. Factor de bioacumulación y factor de acumulación biota-sedimento

Se han encontrado diferencias entre los datos empíricos de BAF disponibles para PFAS individuales en diferentes organismos, probablemente debido a la naturaleza de los datos de campo. Por tanto, más datos biológicos

de campo deberían proporcionar una mejor comprensión de las características de bioacumulación específicas de las especies^{106,116}.

Los resultados de este estudio (**Tabla IV.5**) muestran una clara correlación entre el aumento de BAF y niveles altos de K_{ow} , y, por tanto, también con la longitud de la cadena de perfluoroalquilo. Los valores de \log BAF se correlacionaron positivamente con la longitud de la cadena en todos los órganos ($R^2 > 0.93$; $p < 0.05$), como se muestra en la **Figura IV.4**. Estos hallazgos concuerdan con los observados por Kwadijk y col.¹²⁰ para ácidos C7-C9 y sulfonatos C4/C8 y con los encontrados por Labadie y Chevreuil¹⁰⁷, que calcularon una correlación de $R^2 > 0.86$ para hígado y músculo de pescado.

En algunos casos, el \log BAF estimado para un compuesto dado dependía de las correspondientes concentraciones de PFAS en el agua enriquecida. En concreto, los valores de BAF en el Bloque 1 fueron a veces significativamente más bajos que los encontrados en el Bloque 3. Este fue el caso de los compuestos de cadena corta (PFBuA) en intestino y gónadas. Sin embargo, BAF en el Bloque 3 podría subestimarse debido a la posible sobreestimación de PFAS disueltos libremente en agua¹¹⁶.

Como se muestra en la **Tabla IV.5**, \log BAF para PFAS varió ligeramente entre organismos. Esto podría deberse a las diferentes capacidades para acumular y/o metabolizar compuestos de diferentes especies. Por ejemplo, según los resultados de Hong y col.¹¹⁶, los gasterópodos parecen acumular PFAS de cadena más corta (ácidos perfluorocarboxílicos C6 a C9 y ácidos perfluorosulfónicos C4 a C6), pero los peces o camarones tienden a acumular compuestos de cadena más larga (ácidos perfluorocarboxílicos C10 a C11 y ácidos perfluorosulfónicos C8 a C10). Kwadijk y col.¹²⁰ determinaron BAF de campo para PFAS en anguila europea (*Anguilla anguilla*) y sugirieron que los compuestos con menos de 7 cadenas de perfluoroalquilo no son bioacumulativos, de acuerdo con Xu y col.¹²¹, Lasier y col.¹²² y Conder y col.¹²³.

¹²⁰ Kwadijk, C.J.A.F., Korytar, P., Koelmans, A.A. Distribution of perfluorinated compounds in aquatic systems in The Netherlands. *Environmental Science & Technology*, 44 (2010) 3746-3751.

¹²¹ Xu, J., Guo, C.S., Zhang, Y., Meng, W. Bioaccumulation and trophic transfer of perfluorinated compounds in a eutrophic freshwater food web. *Environmental Pollution*, 184 (2014) 254-261.

Wilkinson y col.¹⁰⁵ evaluaron la bioacumulación espacial de PFAS, fármacos, drogas ilícitas, plastificantes y metabolitos en sedimentos de ríos, plantas acuáticas y organismos bentónicos (crustáceos anfípodos y caracoles acuáticos) con resultados similares a los encontrados en este trabajo. Varios estudios han obtenido resultados de BAF de campo para PFOS y PFOA, pero hay menos literatura disponible sobre datos de BAF para PFAS de cadena corta, detectados principalmente en agua. En cambio, los resultados de este trabajo muestran que los PFAS de cadena corta también son bioacumulativos.

Por otro lado, los valores de \log BSAF de PFAS varían de manera considerable (**Tabla IV.5**), en el Bloque 1 de 1.8 para PFBuA a 2.89 para PFOA en intestino y de 1.37 para PFOA a 1.71 para PFBuA en gónadas. Se encontraron valores de \log BSAF relativamente más altos para PFOS y PFOA en el intestino, mientras que en gónadas los valores más altos observados fueron para PFBuA. PFHxA mostró la acumulación más baja. BSAF también aumentó con la longitud de la cadena de perfluoroalquilo ($R^2 > 0.92$), aunque esta correlación se volvió menos significativa a concentraciones más bajas de PFAS, como se muestra en la **Figura IV.5**. La relación entre la bioacumulación, la longitud de la cadena de perfluoroalquilo y los grupos funcionales finales también se ha observado en otros organismos acuáticos como los mejillones¹²⁴, la trucha arcoíris^{115,117}, la carpa común¹²⁵ y *Lumbriculus variegatus*¹²². Como tendencia general, BSAF aumenta cuando aumenta $\log K_{ow}$.

La evaluación integral de la bioacumulación en agua dulce y el medio marino de contaminantes orgánicos utilizando BAF y BSAF todavía es

¹²² Lasier, P.J., Washington, J.W., Hassan, S.M., Jenkins, T.M. Perfluorinated chemicals in surface waters and sediments from northwest Georgia, USA, and their bioaccumulation in *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30 (2011) 2194-2201.

¹²³ Conder, J.M., Hoke, R.A., Wolf, Wd, Russell, M.H., Buck, R.C. Are PFAs bio-accumulative? A critical review and comparison with regulatory criteria and persistent lipophilic compounds. *Environmental Science & Technology*, 42 (2008) 995-1003.

¹²⁴ Liu, C., Gin, K.Y.H., Chang, V.W.C., Goh, B.P.L., Reinhard, M. Novel perspectives on the bioaccumulation of PFCs e the concentration dependency. *Environmental Science & Technology*, 45 (2011) 9758-9764.

¹²⁵ Inoue, Y., Hashizume, N., Yakata, N., Murakami, H., Suzuki, Y., Kikushima, E., Otsuka, M. Unique physicochemical properties of perfluorinated compounds and their bioconcentration in Carpa común *Cyprinus carpio* L. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 62 (2012) 672-680.

limitada¹²⁶. La **Tabla IV.5** muestra los valores de BAF y BSAF publicados en la literatura para diferentes organismos.

Higgings y col.¹¹² investigaron el BSAF de PFAS por primera vez utilizando oligoqueto para predecir compuestos bioacumulados en condiciones controladas. Los resultados de este trabajo para *Holothuria* fueron en la mayoría de casos ligeramente superiores a oligoqueto (0.08 a 0.49)^{112,122}, ostra (-1.4 a 0) y mejillón (-1.2 a -0.2)¹⁰⁶, o pez (0.4 a 3.0)^{116,127,128}. Estos resultados sugieren que los invertebrados bentónicos pueden tener una mayor capacidad para bioacumular PFAS que otros organismos. Los contaminantes podrían bioacumularse de manera diferente en distintas biotas, por lo que puede ser necesario un sistema de clasificación BAF/BSAF específico de cada especie.

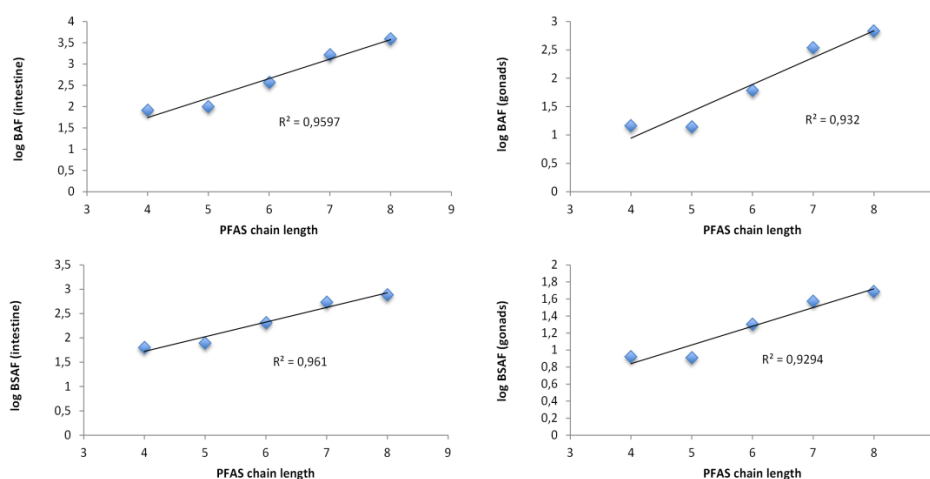


Figura IV.5. Relación entre log BAF (arriba) y log BSAF (abajo) con la longitud de la cadena de carbono de perfluoroalquilo en muestras de intestino y gónadas.

¹²⁶ Zhang, H., Kelly, B.C., 2018. Sorption and bioaccumulation behavior of multi-class hydrophobic organic contaminants in a tropical marine food web. *Chemosphere* 199, 44e53.

¹²⁷ Naile, J.E., Khim, J.S., Hong, S., Park, J., Kwon, B.O., Ryu, J.S., Hwang, J.H., Jones, P.D., Giesy, J.P. Distributions and bioconcentration characteristics of perfluorinated compounds in environmental samples collected from the west coast of Korea. *Chemosphere*, 90 (2013) 387-394.

¹²⁸ Pignotti, E., Casas, G., Llorca, M., Tellbüscher, A., Almeida, D., Dinelli, E., Farre, M., Barcelo, D. Seasonal variations in the occurrence of perfluoroalkyl substances in water, sediment and fish samples from Ebro Delta (Catalonia, Spain). *Science of the Total Environment*, 607-608 (2017) 933-943.

En la **Figura IV.6** se muestra un cromatograma de una de las muestras analizadas.

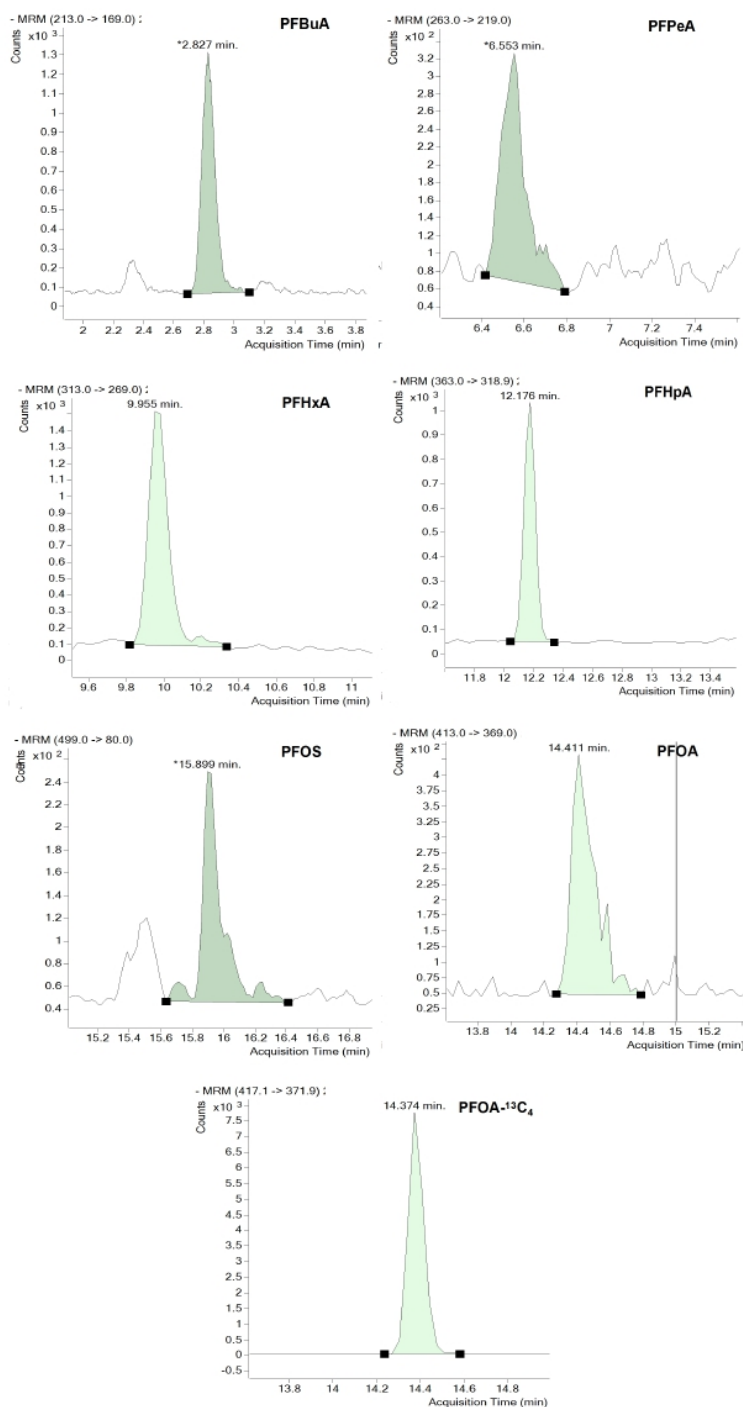


Figura IV.6. Cromatograma de una muestra.

Tabla IV.5. Valores de K_d ($n = 27$) y BAF ($n = 15$) de PFAS medidos en *Holothuria tubulosa* a tres concentraciones de exposición.

	$\log K_d$		$\log \text{BAF (intestino)}$		$\log \text{BAF (gónadas)}$	
	Rango	Media	Rango	Media	Rango	Media
Bloque 1 (1 mg L⁻¹)						
PFBuA	-0.09–0.22	0.11	1.11–2.56	1.91	-0.45–1.88	1.16
PFPeA	-0.10–0.26	0.12	1.37–2.71	2.00	-0.23–1.82	1.14
PFHxA	-0.11–0.35	0.21	2.09–3.26	2.57	1.13–2.24	1.79
PFHpA	0.21–0.90	0.50	2.55–3.74	3.22	1.66–3.08	2.54
PFOA	0.54–1.00	0.73	2.57–4.21	3.59	1.51–3.57	2.83
PFOS	2.04–2.57	2.46	3.31–5.54	4.39	2.48–5.52	3.72
Bloque 2 (0.5 mg L⁻¹)						
PFBuA	-0.58–0.24	-0.09	1.50–2.79	1.82	1.27–1.67	1.54
PFPeA	-0.61–0.27	-0.10	1.52–2.93	1.99	1.38–1.53	1.49
PFHxA	-0.09–0.35	0.13	2.25–3.73	2.86	1.61–2.37	1.89
PFHpA	0.44–1.00	0.74	2.84–4.31	3.34	2.01–2.73	2.34
PFOA	0.63–1.43	0.90	2.52–4.52	3.39	1.68–2.51	2.18
PFOS	0.79–2.54	1.91	3.28–4.91	4.08	2.77–4.06	3.53
Bloque 3 (0.1 mg L⁻¹)						
PFBuA	-0.17–0.36	0.12	1.59–2.97	2.23	1.70–2.69	2.08
PFPeA	-0.30–0.33	0.04	1.63–3.10	2.32	1.54–2.44	1.95
PFHxA	0.02–0.53	0.33	2.06–3.34	2.86	1.45–2.67	2.14
PFHpA	0.27–0.91	0.75	2.33–4.22	3.35	1.61–3.09	2.51
PFOA	0.37–1.19	0.80	2.41–4.38	3.37	1.72–3.07	2.40
PFOS	1.08–1.98	2.00	3.74–4.67	4.23	3.46–4.65	4.11

Tabla IV.5 cont. Valores de BSAF ($n = 15$) de PFAS medidos en *Holothuria tubulosa* a tres concentraciones de exposición.

	log BSAF (intestino)		log BSAF (gónadas)	
	Rango	Media	Rango	Media
Bloque 1 (1 mg L⁻¹)				
PFBuA	1.04–2.08	1.80	1.28–2.25	1.71
PFPeA	1.38–2.59	1.90	1.21–2.14	1.67
PFHxA	1.32–3.16	2.31	1.29–2.07	1.70
PFHpA	1.65–3.36	2.74	1.34–1.73	1.53
PFOA	1.73–3.56	2.89	1.10–1.48	1.37
PFOS	0.87–2.93	2.06	1.26–2.28	1.63
Bloque 2 (0.5 mg L⁻¹)				
PFBuA	1.33–2.75	1.95	1.73–2.07	1.87
PFPeA	1.74–2.89	2.14	1.40–2.48	1.81
PFHxA	2.11–3.49	2.72	1.15–2.22	1.78
PFHpA	2.19–3.48	2.59	0.79–1.85	1.58
PFOA	1.74–3.49	2.59	0.93–1.81	1.51
PFOS	1.79–2.85	2.35	1.32–2.13	1.58
Bloque 3 (0.1 mg L⁻¹)				
PFBuA	1.35–2.96	2.08	-0.56–1.78	0.92
PFPeA	1.62–3.21	2.25	-0.63–1.66	0.91
PFHxA	1.64–3.18	2.49	0.02–2.12	1.30
PFHpA	1.62–3.41	2.55	0.10–2.63	1.57
PFOA	1.21–3.55	2.48	0.13–2.84	1.69
PFOS	1.89–3.39	2.09	-0.09–2.83	1.48

Tabla IV.6. Valores de la literatura de log K_d , log BAF y log BSAF para PFAS medidos en organismos acuáticos.

PFAS	Log K_d	Log BAF	Log BSAF	Organismo	Ref
PFBuA	-0.09 - 0.22	1.11 - 2.56	1.04 - 2.08	Equinodermo (<i>H. tubulosa</i> intestino)	Este trabajo
		-0.45 - 1.88	1.28 - 2.25	Equinodermo (<i>H. tubulosa</i> gónadas)	Este trabajo
	0.70 - 3.23				129
	0.99 - 3.37	0.95 - 3.58		Pez (<i>Barbus graellsii</i> , <i>Cyprinus carpio</i> , <i>Micropterus salmoides</i>)	110
			-1.4 - 0.7	Ostra	106
		-1.2 - 0.3	Mejillón	106	
PFPeA	-0.10 - 0.26	1.37 - 2.71		Equinodermo (<i>H. tubulosa</i> intestino)	Este trabajo
		-0.23 - 1.82	1.21 - 2.14	Equinodermo (<i>H. tubulosa</i> gónadas)	Este trabajo
	1.11				130
	2.44 - 4.82	6.38		Pez y anguila (<i>Salmo trutta</i> , <i>Gobio lozanoi</i> , <i>Pseudochondrostoma polylepis</i> , <i>Micropterus salmoides</i> , <i>Barbus guiraonis</i> , <i>Lepomis gibbosus</i> , <i>Alburnus alburnus</i> , <i>Esox lucius</i> , <i>Anguilla anguilla</i>)	129
	2.37 - 2.43	3.53 - 3.94		Pez (<i>Barbus graellsii</i> , <i>Cyprinus carpio</i> , <i>Micropterus salmoides</i>)	110
PFHxA	-0.11 - 0.35	2.09 - 3.26	1.32 - 3.16	Equinodermo (<i>H. tubulosa</i> intestino)	Este trabajo
		1.13 - 2.24	1.29 - 2.07	Equinodermo (<i>H. tubulosa</i> gónadas)	Este trabajo
	1.18				130
	0.80				107
		1.4		Pez (<i>Cyprinus carpio</i>)	128
		1.3		Pez (<i>Liza</i> sp.)	128
				Pez (<i>Rutilus rutilus</i>)	128
		0.42		Pez (<i>Scardinius erythrophthalmus</i>)	128
		1.1		Pez (<i>Silurus glanis</i>)	128
		0.90		Pez (<i>Squalius laietanus</i>)	128
		1.8		Pez (<i>Alburnus alburnus</i>)	128
		1.8		Pez	116
		2.4		Bivalvo	116
		1.6		Cangrejo	116
	2.2		Gasterópodo	116	
	1.8		Camarón	116	
PFHpA	0.21 - 0.90	2.57 - 4.21	1.65 - 3.36	Equinodermo (<i>Holothuria tubulosa</i> intestino)	Este trabajo
		1.66 - 3.08	1.34 - 1.73	Equinodermo (<i>Holothuria tubulosa</i> gónadas)	Este trabajo
	1.97				129
	1.26				130
	0.8	1.60	-0.50	Pez (<i>Leuciscus cephalus</i>)	107

¹²⁹ Campo, J., Lorenzo, M., Perez, F., Pico, Y., la Farre, M., Barcelo, D. Analysis of the presence of perfluoroalkyl substances in water, sediment and biota of the Jucar River (E Spain). Sources, partitioning and relationships with water physical characteristics. *Environmental Research*, 147 (2016) 503-512.

¹³⁰ Pico, Y., Blasco, C., Farre, M., Barcelo, D. Occurrence of perfluorinated compounds in water and sediment of L'Albufera natural Park (Valencia, Spain). *Environmental Science and Pollution Research*, 19 (2012) 946-957.

		1.9		Pez	116
		1.8		Bivalvo	116
		1.5		Cangrejo	116
		1.9		Gasterópodo	116
		1.8		Camarón	116
		0.75 - 2.26		Cangrejo (<i>Hemigrapsus sanguineus</i> , <i>Sesarma pictum</i> , <i>Hemigrapsus penicillatus</i> , <i>Helice tridens</i> , <i>Philyra pisum</i>)	127
		1.69		Bivalvo (<i>Mytilus edulis</i> , <i>Mactra veneriformis</i> , <i>Nuttallia olivacea</i> , <i>Sinonovacula constricta</i>)	127
		1.14 - 1.61		Cangrejo (<i>Acanthogobius flavimanus</i> , <i>Sebastes schlegeli</i> , <i>Tridentiger obscurus</i> , <i>Hexagrammos otakii</i> , <i>Mugil cephalus</i>)	127
		1.81		Gasterópodo (<i>Littorina brevicula</i> , <i>Monodonta labio</i> , <i>Umbonium thomasi</i> , <i>Glossaulax didyma</i>)	127
			0.18	Oligoqueto (<i>Lumbriculus variegatus</i>)	122
PFOA	0.54 - 1.00	2.57 - 4.21	1.73 - 3.56	Equinodermo (<i>H. tubulosa</i> intestino)	Este trabajo
		1.51 - 3.57	1.10 - 1.48	Equinodermo (<i>H. tubulosa</i> gónadas)	Este trabajo
	1.71 - 4.56				129
	1.27 - 2.91	2.91		Pez (<i>Barbus graellsii</i> , <i>Cyprinus carpio</i> , <i>Micropterus salmoides</i>)	110
	0 - 2.13				131
	1.55				130
	2.28				113
	2.17 - 2.54				132
	2.18 - 2.48				133
	1.83				120
	2.11				114
		2.21	2.76	Caracol de agua dulce (<i>Bithynia tentaculata</i>)	105
		1.75	2.76	Crustáceos anfípodos (<i>Gammarus pulex</i>)	105
		2.2		Pez (<i>Cyprinus carpio</i>)	128
		2.0		Pez (<i>Liza</i> sp.)	128
		2.1		Pez (<i>Rutilus rutilus</i>)	128
		1.9		Pez (<i>Scardinius erythrophthalmus</i>)	128
		2.1		Pez (<i>Silurus glanis</i>)	128
		2.0		Pez (<i>Squalius laietanus</i>)	128
		2.3		Pez (<i>Alburnus alburnus</i>)	128
		1.9		Pez	116
		2.1		Bivalvo	116

¹³¹ Pan, G., Zhou, Q., Luan, X., Fu, Q.S. Distribution of perfluorinated compounds in Lake Taihu (China): impact to human health and water standards. *Science of the Total Environment*, 487 (2014) 778-784.

¹³² Ahrens, L., Taniyasu, S., Yeung, L.W.Y., Yamashita, N., Lam, P.K.S., Ebinghaus, R. Distribution of polyfluoroalkyl compounds in water, suspended particulate matter and sediment from Tokyo Bay, Japan. *Chemosphere*, 79 (2010) 266-272.

¹³³ Zhou, Q., Deng, S.B., Fan, Q., Zhang, Q.Y., Yu, G., Huang, J. Sorption of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate on activated sludge. *Chemosphere*, 81 (2010) 453-458.

2.6		Cangrejo	116
2.5		Gasterópodo	116
1.8		Camarón	116
0.99 - 1.82		Pez	121
1.47		Zooplancton	121
1.94		Fitoplancton	121
	-0.90	Ostra	106
1.95		Crustáceo (<i>Daphnia magna</i>)	134
1.05 - 2.24		Cangrejo (<i>Hemigrapsus sanguineus</i> , <i>Sesarma pictum</i> , <i>Hemigrapsus</i> <i>penicillatus</i> , <i>Helice tridens</i> , <i>Philyra pisum</i>)	127
1.65		Bivalvo (<i>Mytilus edulis</i> , <i>Macra</i> <i>veneriformis</i> , <i>Nuttallia olivacea</i> , <i>Sinonovacula constricta</i>)	127
1.47 - 1.89		Cangrejo (<i>Acanthogobius flavimanus</i> , <i>Sebastes schlegeli</i> , <i>Tridentiger obscurus</i> , <i>Hexagrammos otakii</i> , <i>Mugil cephalus</i>)	127
1.70		Gasterópodo (<i>Littorina brevicula</i> , <i>Monodonta labio</i> , <i>Umbonium thomasi</i> , <i>Glossaulax didyma</i>)	127
2.08		Pez (<i>Carpa plateada</i>)	119
1.93		Gamba	119
1.62		Pez cabeza de serpiente	119
1.77		Anguila huella de neumático	119
1.32		Pez (<i>Carpa Carpína</i>)	119
0.70 - 0.97		<i>Carpa común</i> (<i>Cyprinus carpio L.</i>)	125
1.9 - 3.7		Plantas flotantes	135
1.0 - 2.1		Pez (<i>Leuciscus cephalus</i>)	107
	0.07	Oligoqueto (<i>Lumbriculus variegatus</i>)	122
1.1 - 1.2		Mejillón (<i>Perna viridis</i>)	124
2.43		Zooplancton	136
2.26		Pez	137
	-0.28 - 0.02	Equinodermo (<i>Lytechinus variegatus</i>)	112
1.91		Zooplancton	138
-1.42		Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	115

¹³⁴ Dai, Z., Xia, X., Guo, J., Jiang, X. Bioaccumulation and uptake routes of perfluoroalkyl acids in *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 90 (2013) 1589-1596.

¹³⁵ Shi, Y., Pan, Y., Wang, J., Cai, Y. Distribution of perfluorinated compounds in water, sediment, biota and floating plants in Baiyangdian Lake, China. *J. Environmental Monitoring and Assessment*, 14 (2012) 636-642.

¹³⁶ Loi, E.I.H., Yeung, L.W.Y., Taniyasu, S., Lam, P.K.S., Kannan, K., Yamashita, N. Trophic magnification of poly- and perfluorinated compounds in a subtropical food web. *Environmental Science & Technology*, 45 (2011) 5506-5513.

¹³⁷ FujIII, S., Polprasert, C., Tanaka, S., Lien, N.P.H., Qiu, Y. New POPs in the water environment: distribution, bioaccumulation and treatment of perfluorinated compounds – a review paper. *Journal of Water Supply: Research and Technology*, 56 (2007) 313-326.

¹³⁸ Houde, M., Bujas, T.A., Small, J., Wells, R.S., Fair, P.A., Bossart, G.D., Solomon, K.R., Muir, D.C. Biomagnification of perfluoroalkyl compounds in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) food web. *Environmental Science & Technology*, 40 (2006) 4138-4144.

PFOS	2.04 - 2.57	3.31 - 5.54	0.87 - 2.93	Equinodermo (<i>H. tubulosa</i> intestino)	Este trabajo
		2.48 - 5.52	1.26 - 2.28	Equinodermo (<i>H.a tubulosa</i> gónadas)	Este trabajo
	1.07 - 3.70	5.37		Pez y anguila (<i>Salmo trutta</i> , <i>Gobio lozanoi</i> , <i>Pseudochondrostoma polylepis</i> , <i>Micropterus salmoides</i> , <i>Barbus guiraonis</i> , <i>Lepomis gibbosus</i> , <i>Alburnus alburnus</i> , <i>Esox lucius</i> , <i>Anguilla anguilla</i>)	129
	0.47 - 2.03				110
	1.78 - 2.12	2.3 - 3.80	0.97 - 1.81	Anguila, perca, lucio	139
	2.32 - 3.32				131
	2.4	3.5 - 5.2	-0.3 - 1.5	Pez (<i>Leuciscus cephalus</i>)	107
	2.15				130
	2.88				113
	2.1				132
	2.35				120
	2.30 - 3.60				133
	2.68				114
		2.64	3.46	Caracol de agua dulce (<i>Bithynia tentaculata</i>)	105
		2.77	3.46	Crustáceos anfipodos (<i>Gammarus pulex</i>)	105
		3.0		Pez (<i>Cyprinus carpio</i>)	128
		0.68		Pez (<i>Liza sp.</i>)	128
		2.3		Pez (<i>Rutilus rutilus</i>)	128
		1.9		Pez (<i>Scardinius erythrophthalmus</i>)	128
		2.0		Pez (<i>Silurus glanis</i>)	128
		2.0		Pez (<i>Squalius laietanus</i>)	128
		2.4		Pez (<i>Alburnus alburnus</i>)	128
		2.9		Pez	116
		2.5		Bivalvo	116
		2.5		Cangrejo	116
		2.7		Gasterópodo	116
		2.9		Camarón	116
		2.95 - 3.71		Pez	121
			-0.5 - 0.0	Ostra	106
			-0.8 - 0.2	Mejillón	106
			-1.64	Larvas (<i>Chironomus riparius</i>)	140
		2.25		Crustáceo (<i>Daphnia magna</i>)	134
		2.92 - 4.49		Cangrejo (<i>Hemigrapsus sanguineus</i> , <i>Sesarma pictum</i> , <i>Hemigrapsus penicillatus</i> , <i>Helice tridens</i> , <i>Philyra pisum</i>)	127
		1.89		Bivalvo (<i>Mytilus edulis</i> , <i>Macraa veneriformis</i> , <i>Nuttallia olivacea</i> , <i>Sinonovacula constricta</i>)	127

¹³⁹ Kwadijk, C.J., Kotterman, M., Koelmans, A.A. Partitioning of perfluorooctanesulfonate and perfluorohexanesulfonate in the aquatic environment after an accidental release of aqueous film forming foam at Schiphol Amsterdam Airport. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33 (2014) 1761-1765.

¹⁴⁰ Bertin, D., Ferrari, B.J.D., Labadie, P., Sapin, A., Garric, J., Budzinski, H., Houde, M., Babut, M. Bioaccumulation of perfluoroalkyl compounds in midge (*Chironomus riparius*) larvae exposed to sediment. *Environmental Pollution*, 189 (2014) 27-34.

1.72 - 2.41		Cangrejo (<i>Acanthogobius flavimanus</i> , <i>Sebastes schlegeli</i> , <i>Tridentiger obscurus</i> , <i>Hexagrammos otakii</i> , <i>Mugil cephalus</i>)	127
2.33		Gasterópodo (<i>Littorina brevicula</i> , <i>Monodonta labio</i> , <i>Umbonium thomasi</i> , <i>Glossaulax didyma</i>)	127
3.58		Pez (<i>Carpa plateada</i>)	119
2.65		Gamba	119
3.48		Pez cabeza de serpiente	119
2.26		Pez (<i>Carpa común</i>)	119
3.04		Anguila huella de neumático	119
2.38		Pez (<i>Carpa Carpína</i>)	119
2.85 - 3.11		<i>Carpa común</i> (<i>Cyprinus carpio</i> L.)	125
3.0- 4.1		Plantas flotantes	135
	0.49	Oligoqueto (<i>Lumbriculus variegatus</i>)	122
2.4 - 2.6		Mejillón (<i>Perna viridis</i>)	124
3.82 - 4.66		Pez	137
	-0.08 - 0.09	Equinodermo (<i>Lytechinus variegatus</i>)	112
-0.49		Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	115

5. ESTUDIO DE BIOACUMULACIÓN DE BISFENOLES, PARABENOS, BENZOFENONA-3, TRICLOSÁN Y TRICLOCARBÁN

5.1. Distribución de PCPs en agua y sedimentos

Se determinó la concentración de cada compuesto en cada uno de los bloques. En la **Figura IV.7** se muestra la evolución de los PCPs durante todo el experimento (197 días) en el Bloque 1.

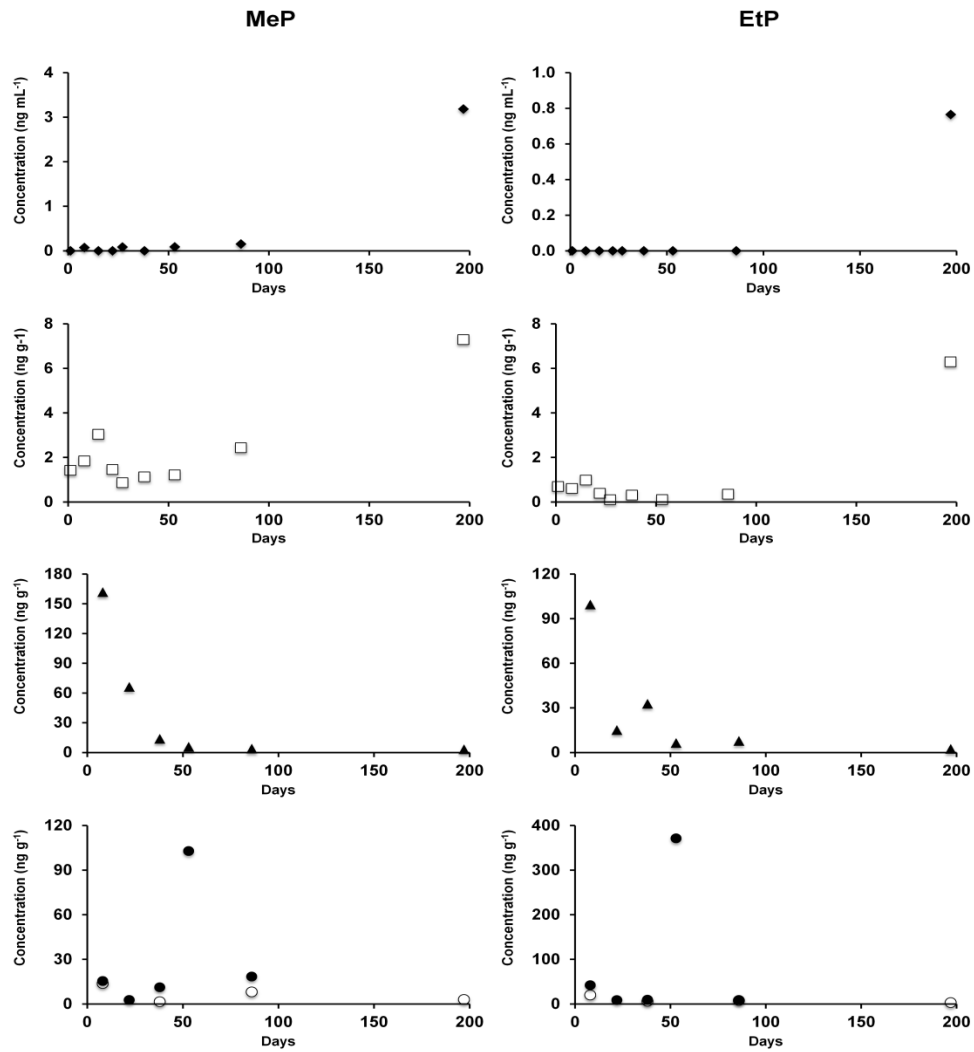


Figura IV.7. Evolución PCPs en el Bloque 1 (mayor exposición) durante los 197 días de experimento. ◆: Muestras de agua; □: muestras de sedimento; ▲: muestras de biota intestinal; ○: muestras de biota de gónadas femeninas; ●: muestras de biota de gónadas masculinas.

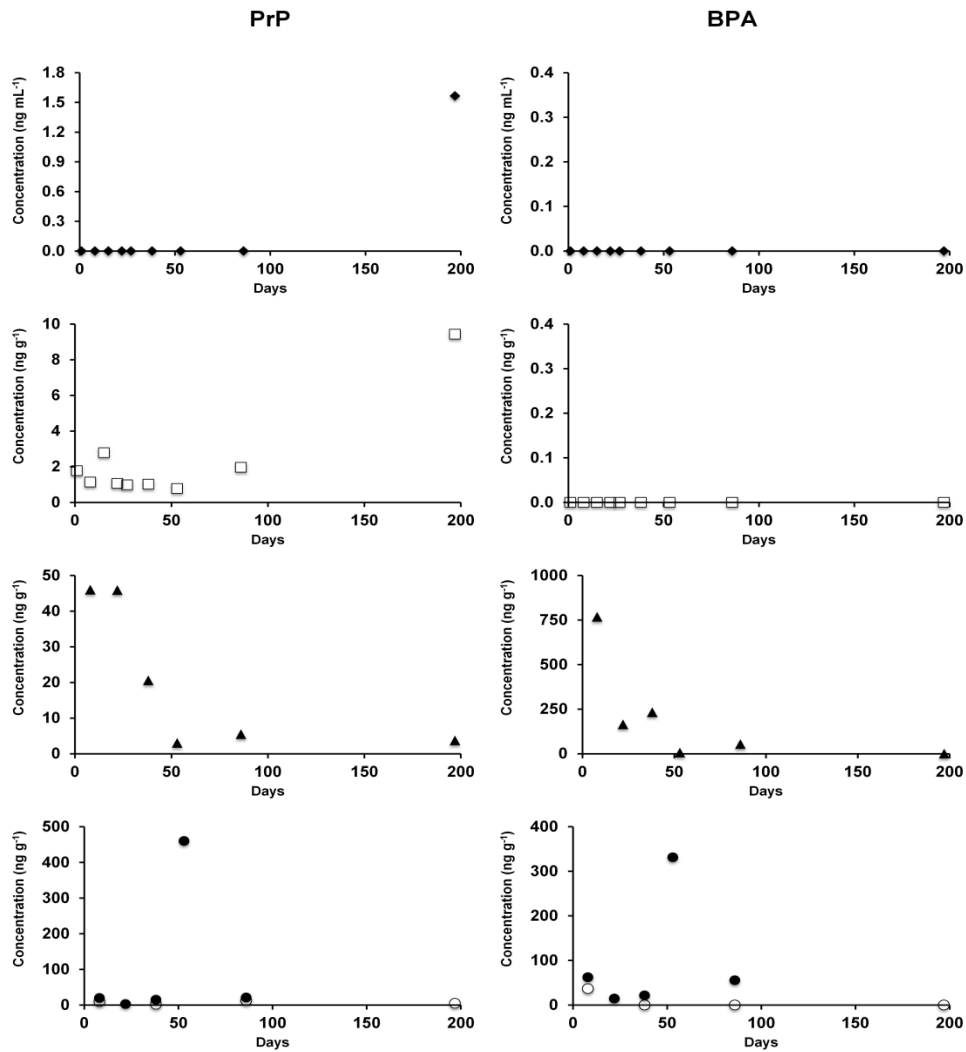


Figura IV.7 cont. Evolución PCPs en el Bloque 1 (mayor exposición) durante los 197 días de experimento. ◆: Muestras de agua; □: muestras de sedimento; ▲: muestras de biota intestinal; ○: muestras de biota de gónadas femeninas; ●: muestras de biota de gónadas masculinas.

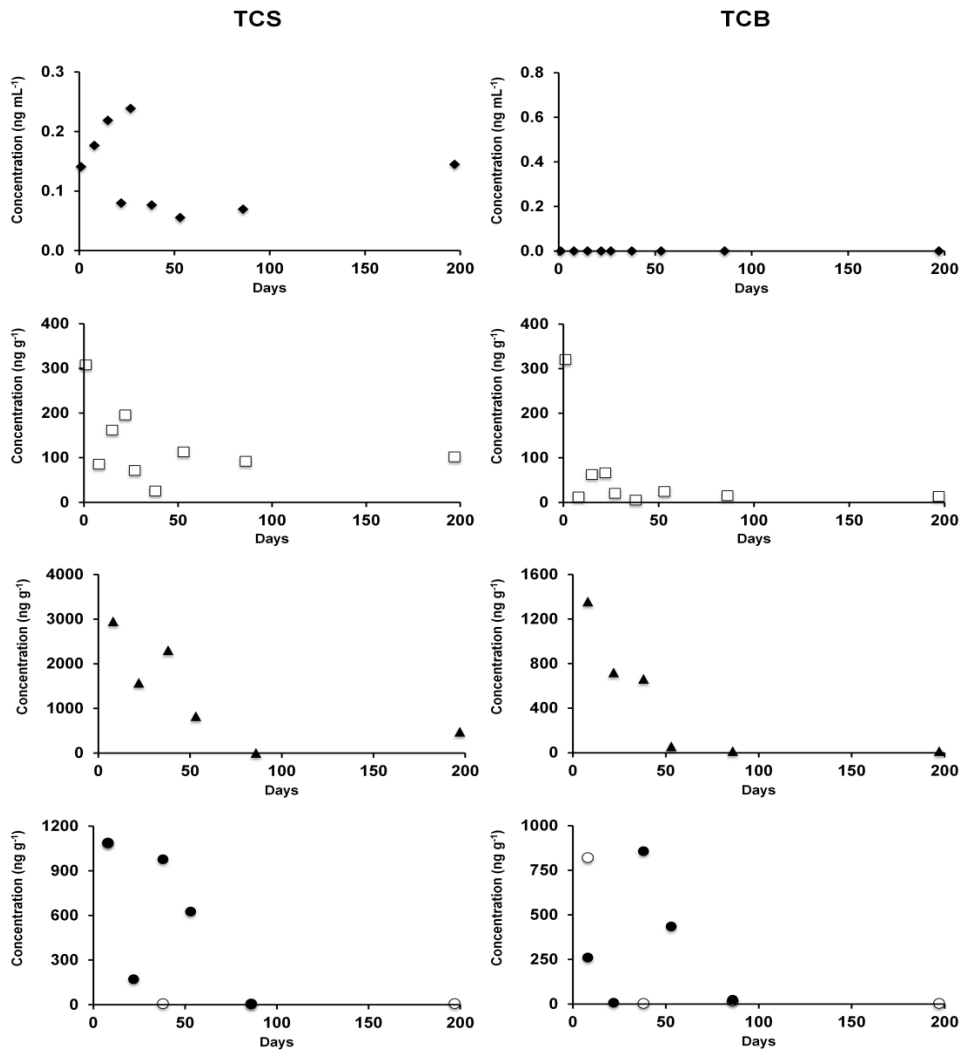


Figura IV.7 cont. Evolución PCPs en el Bloque 1 (mayor exposición) durante los 197 días de experimento. ◆: Muestras de agua; □: muestras de sedimento; ▲: muestras de biota intestinal; ○: muestras de biota de gónadas femeninas; ●: muestras de biota de gónadas masculinas.

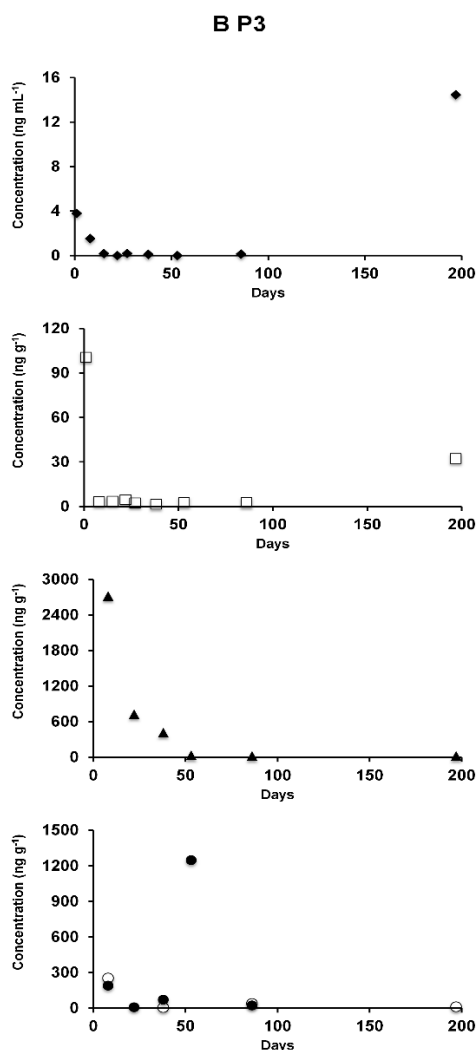


Figura IV.7 cont. Evolución PCPs en el Bloque 1 (mayor exposición) durante los 197 días de experimento. ◆: Muestras de agua; □: muestras de sedimento; ▲: muestras de biota intestinal; ○: muestras de biota de gónadas femeninas; ●: muestras de biota de gónadas masculinas.

En muestras de agua, las concentraciones de MPB oscilaron entre 0.07 y 3.2 ng mL⁻¹, de BP-3 entre 0.05 y 14.4 ng mL⁻¹ y de TCC entre 0.06 y 0.14 ng mL⁻¹, mientras que TCS y BPA no fueron detectados en ninguna muestra de agua. Estos resultados muestran que los compuestos seleccionados exhiben más afinidad por las fases sólidas que por el agua. En el Bloque 1 se detectaron todos los contaminantes en los sedimentos, a excepción de BPA. Se

encontraron las concentraciones más altas para TCC (71 – 308 ng g⁻¹ m.s.) y TCS (5.1 – 320 ng g⁻¹ m.s.), y, en menor medida, parabenos (0.1 – 9.4 g⁻¹ m.s.). Se observó un ligero aumento en los niveles de concentración a lo largo de los 197 días.

El valor promedio de $\log K_d$ revela que TCC tiene una firme tendencia a adsorberse en los sedimentos ($\log K_d = 2.95$ en el Bloque 1), como se muestra en la **Tabla IV.7**. Estos altos ratios de distribución indican la fuerte adsorción de estos compuestos en los sedimentos, a pesar de que en cierta medida se encuentran disueltos en agua. Los parabenos mostraron los valores de $\log K_d$ más bajos (0.78 – 1.02). En general, no se observaron relaciones claras entre K_d y $\log K_{ow}$ (**Figura IV.8**).

5.2. Bioacumulación de PCPs en *Holothuria tubulosa*

La distribución de contaminantes entre el agua y los sedimentos puede resultar en la transferencia de estos a especies de nivel trófico superior que se alimentan de organismos bentónicos¹⁴¹. Las concentraciones medidas en *Holothuria tubulosa* antes de la exposición fueron similares a los niveles encontrados en las áreas costeras de Granada⁷³ y fueron aproximadamente 100 veces más bajas que las encontradas en el día 8 de exposición en el Bloque 1. Este organismo mostró una alta capacidad para bioacumular las sustancias químicas objeto de estudio, con un 100% de frecuencia de detección. En base a las concentraciones de contaminantes detectadas durante los experimentos, el orden de la familia más abundante de PCPs seleccionados a la menos abundante fueron: TCC/TCS > BP-3 > BPA > MPB > EPB > PPB.

Los niveles de concentración de compuestos en las muestras de *Holothuria* fueron ≥ 50 veces más altos que en agua y sedimentos para algunos PCPs como TCS y BP-3. Los pepinos de mar a menudo están expuestos a contaminantes por un medio ambiente contaminado a través de la ingestión; ingieren y defecan grandes cantidades de sedimentos y agua, y digieren y absorben sólo

¹⁴¹ Díaz-Cruz, M.S., Molins-Delgado, D., Serra-Roig, M.P., Kalogianni, E., Skoulikidis, N.Th., Barceló, D. Personal care products reconnaissance in EVROTAS river (Greece): water-sediment partition and bioaccumulation in fish. *Science of the Total Environment*, 651 (2019) 3079–3089.

la materia orgánica y viva. Puesto que estas especies viven en sedimentos blandos, siendo por tanto bentónicos, se encuentran más contaminados por sedimentos que por agua. No obstante, la captación a través de agua también podría ocurrir y no debe descartarse. Para todos los compuestos seleccionados, la acumulación se produjo rápidamente después de sólo 8 días. Se detectó BPA en intestino y gónadas de los organismos, pero no en muestras de agua o sedimentos.

Los perfiles de concentración en el intestino que se muestran en la **Figura IV.7** indican una disminución en la concentración, probablemente debido a un proceso de degradación natural en la biota. Por ejemplo, TCC disminuyó de 2.9 mg kg⁻¹ m.s. en el día 8 a 0.48 mg kg⁻¹ m.s. en el día 197 y BPA desde 0.77 mg kg⁻¹ m.s. en el día 8 a 0.007 mg kg⁻¹ en el día 197; este efecto se observó en el Bloque 1 (enriquecido con las concentraciones más altas). Además, no se encontraron diferencias significativas entre el Bloque 2 y el Bloque 3 (enriquecidos con una concentración más baja) para la mayoría de los compuestos. Un estudio de estas características es bastante complejo, ya que *H. tubulosa* absorbe el contaminante del medio ambiente siendo el resultado neto de ratios competitivos de absorción química en la superficie respiratoria y eliminación química, incluyendo intercambio respiratorio, egestión fecal, biotransformación metabólica del compuesto padre y dilución del crecimiento¹⁰⁴.

En las gónadas de estos ejemplares de *Holothuria* también se observó esta disminución, pero pareció ocurrir al azar durante los experimentos, sin una tendencia clara. No se encontraron diferencias significativas entre las gónadas femeninas y masculinas. Las altas concentraciones de algún contaminante objeto de estudio al final del experimento podrían explicarse por el hecho de que la degradación de los compuestos en intestino se produce de forma más rápida con respecto a las gónadas.

La literatura sobre la bioacumulación de contaminantes ambientales en invertebrados bentónicos es bastante escasa, y este tema merece más investigación. Gatidou y col.⁶⁰ evaluaron el potencial de bioconcentración de TCS y BPA en mejillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*) y encontraron concentraciones entre <LOD y 2578 ng g⁻¹ m.s. para TCS y <LOD y 612 ng g⁻¹ m.s.

para BPA. Durante el período de ingesta (28 días de exposición a $300 \mu\text{g L}^{-1}$) aumentaron las concentraciones tisulares de los compuestos diana. Posteriormente, disminuyó la concentración durante un período de depuración en agua limpia; sin embargo, en el día 56 (final de la depuración), las concentraciones residuales de sustancias químicas fueron más altas que sus concentraciones iniciales. Los cambios en los patrones de bioacumulación y eliminación de algunos contaminantes también sugieren un aumento de los efectos adversos en los seres humanos si persisten el calentamiento global, la acidificación de los océanos y otras condiciones ambientales relacionadas con el cambio climático. Álvarez-Muñoz y col.¹⁴² estudiaron la ocurrencia de parabenos, BPA y TCS en macroalgas, bivalvos y peces de áreas costeras y no encontraron contaminantes en muestras de macroalgas, sin embargo, el análisis reveló su presencia en bivalvos y peces en concentraciones de hasta $16.4 \text{ ng g}^{-1} \text{ m.s.}$ para MPB, $12.5 \text{ ng g}^{-1} \text{ m.s.}$ para BPA y $1.5 \text{ ng g}^{-1} \text{ m.s.}$ para TCS.

Holothuria tubulosa es un centinela extremadamente valioso de la calidad ambiental ya que esta especie cumple con los criterios establecidos por la Comisión OSPAR para la selección de especies que pueden ser monitoreadas para determinar la concentración de contaminantes en el ecosistema circundante.

5.3. Factor de bioconcentración y factor de acumulación de biota-sedimento

BCF se calculó igual que para los compuestos orgánicos perfluorados. Las concentraciones de analitos estudiados en agua y sedimento se determinaron al mismo tiempo y en los mismos lugares donde se recolectaron todas las muestras de biota como parte de un estudio recurrente. El rango y la media de ambos factores calculados en los tres bloques se muestran en la **Tabla IV.7**.

¹⁴² Álvarez-Muñoz, D., Rodríguez-Mozaz, S., Maulvault, A.L., Tediosi, A., Fernández-Tejedor, M., Van den Heuvel, F., Kotterman, M., Marques, A., Barceló, D. Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in macroalgae, bivalves, and fish from coastal areas in Europe. *Environmental Research*, 143 (2015) 56–64.

Tabla IV.7. Valores de K_d ($n = 27$) y BAF ($n = 15$) de PCPs medidos en *Holothuria tubulosa* a tres concentraciones de exposición.

	$\log K_d$		$\log BCF$ (intestino)		$\log BCF$ (gónadas)	
	Rango	Media	Rango	Media	Rango	Media
Bloque 1 (1 mg L⁻¹)						
MPB	0.36-1.40	1.02	0.02-3.34	1.73	-0.03-3.06	1.90
EPB	0.91	0.91	0.51	0.51	0.57	0.57
PPB	0.78	0.78	0.38	0.38	0.47	0.47
TCC	2.48-3.39	2.95	3.52-4.48	4.14	1.71-4.11	2.93
TCS	-	-	-	-	-	-
BPA	-	-	-	-	-	-
BP-3	0.32-1.42	0.98	0.21-3.58	2.35	-0.13-2.81	1.90
Bloque 2 (0.5 mg L⁻¹)						
MPB	1.27-1.84	1.55	1.89	1.89	-	-
EPB	1.49	1.49	1.83	1.83	-	-
PPB	1.19	1.19	1.69	1.69	-	-
TCC	1.45-3.45	2.52	3.12-3.91	3.52	2.08-3.91	3.04
TCS	-	-	-	-	-	-
BPA	-	-	-	-	-	-
BP-3	-0.17-1.91	1.04	0.92-4.83	2.79	1.85-3.38	2.54
Bloque 3 (0.1 mg L⁻¹)						
MPB	0.97-3.08	1.57	0.53-4.06	2.02	1.38-3.89	2.51
EPB	1.01	1.01	0.08	0.08	-	-
PPB	0.91	0.91	-0.42	-0.42	-	-
TCC	1.48-2.33	1.90	1.90-3.50	2.85	1.68-3.89	2.75
TCS	-	-	-	-	-	-
BPA	-	-	-	-	-	-
BP-3	0.34-1.66	1.09	-0.43-4.27	2.40	1.60-3.93	2.98

Los contaminantes con los valores de BCF de más altos a más bajos son TCC > BP-3 > BPA > parabenos. Para la mayoría de los compuestos diana se obtuvieron $\log BCF > 1$, excepto para EPB (0.51 – 0.57) y para PPB (0.38 – 0.47), lo que indica su tendencia a acumularse en tejidos de *H. tubulosa*. No obstante, según las guías de categorías de bioacumulación, teniendo en cuenta la media de $\log BCF$, todos los compuestos se pueden clasificar como no bioacumulativos ($\log BCF < 3$), excepto TCC, que se puede clasificar como muy

bioacumulativo en el intestino ($\log \text{BCF} = 4.14$). Para los parabenes, el $\log \text{BCF}$ estimado dependía de la concentración correspondiente en el agua. En concreto, los valores de BCF en el Bloque 1 fueron a veces significativamente más bajos o más altos que los encontrados en los Bloques 2 y 3. En estos bloques, con menor concentración de sustancias objeto de estudio, los valores de BCF pueden subestimarse debido a la posible sobreestimación del compuesto libremente disuelto en el agua.

El $\log K_{ow}$ proporciona una aproximación teórica del potencial de bioacumulación¹⁴³. Por ejemplo, el valor elevado de $\log \text{BCF}$ encontrado para TCC (4.14) y BP-3 (2.35) se correlaciona con su respectivo $\log K_{ow}$ 4.93 para TCC y 3.79 para BP-3. Sin embargo, no se halló una relación clara entre los valores de $\log \text{BCF}$ y $\log K_{ow}$ para el resto de analitos (**Figura IV.8**).

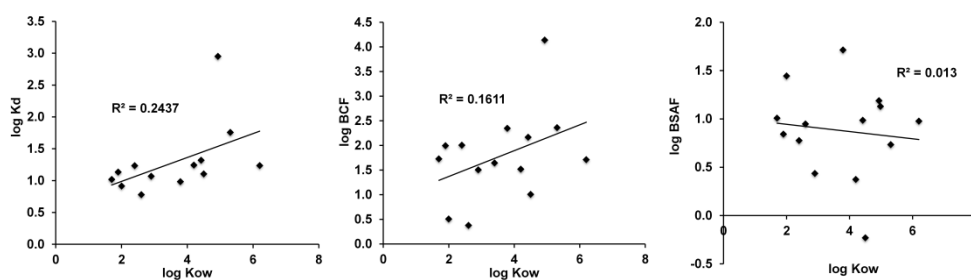


Figura IV.8. Relación entre $\log \text{BAF}$ (izquierda), $\log \text{BCF}$ (centro) y $\log \text{BSAF}$ (derecha) con $\log K_{ow}$ de los compuestos seleccionados.

Dado que *Holothuria tubulosa* es un bioindicador bentónico de contaminación que se alimenta de la materia orgánica absorbida por los sedimentos, el BSAF sería el parámetro más útil para describir y predecir la bioacumulación en biota a través de sedimentos^{106,107}.

¹⁴³ MacKay, D. Correlation of bioconcentration factors. *Environmental Science & Technology*, 16 (1982) 274–278.

Tabla IV.7 cont. Valores de BSAF ($n = 15$) de PCPs medidos en *Holothuria tubulosa* a tres concentraciones de exposición.

Bloque 1 (1 mg L ⁻¹)	log BSAF (intestino)		log BSAF (gónadas)	
	Rango	Media	Rango	Media
MPB	-0.34-1.94	1.01	-0.39-1.93	0.68
EPB	-0.41-2.22	1.44	-0.34-3.55	1.49
PPB	-0.40-1.64	0.95	-0.31-2.77	0.92
TCC	0.67-1.96	1.19	-1.34-1.59	0.02
TCS	0.07-2.12	1.13	-0.99-2.23	0.55
BPA	-	-	-	-
BP-3	-0.14-2.93	1.71	-0.48-2.66	1.15
Bloque 2 (0.5 mg L ⁻¹)	Rango	Media	Rango	Media
MPB	0.34-1.04	0.63	0.30-0.98	0.65
EPB	0.34-2.04	1.15	1.02-2.30	1.55
PPB	0.17-0.90	0.49	0.58-1.49	0.94
TCC	-0.05-1.55	0.87	0.15-1.38	0.67
TCS	0.56-1.63	0.91	-0.10-0.73	0.28
BPA	-	-	-	-
BP-3	0.51-3.45	1.74	0.59-2.00	1.29
Bloque 3 (0.1 mg L ⁻¹)	Rango	Media	Rango	Media
MPB	-0.45-1.45	0.64	0.14-1.44	0.78
EPB	-0.93-2.01	1.09	1.02-3.22	2.11
PPB	-1.33-1.55	0.33	0.28-2.27	1.16
TCC	0.04-1.54	0.84	-0.45-1.90	0.71
TCS	-0.44-1.76	0.76	-0.78-1.92	0.83
BPA	-	-	-	-
BP-3	-0.77-2.68	1.23	-0.05-2.96	1.38

Como se muestra en la **Tabla IV.7**, los valores de log BSAF varían considerablemente, de 0.49 para PPB a 1.75 para BP-3 en intestino y de 0.28 para TCS a 1.55 para EPB en gónadas en el Bloque 1. En general, los valores de BSAF fueron más bajos que los valores de BAF en este trabajo, lo que indica que las concentraciones de agua son simplemente demasiado bajas en este estudio en comparación con las del sedimento para una estimación precisa. Por ejemplo, TCC y TCS, unos de los compuestos seleccionados detectados en

concentraciones más altas en *H. Tubulosa*, no se encontraron ni se detectaron en concentraciones muy bajas en las muestras de agua.

El uso de BCF, BAF y BSAF para la evaluación de la bioacumulación de contaminantes orgánicos en ambientes marinos todavía es limitado y se mide principalmente en peces. La **Tabla IV.8** enumera los valores BAF y BSAF recogidos de bases de datos para diferentes especies marinas. Además, en comparación con BAF, los valores informados de BSAF son muy limitados. Los resultados reportados revelaron el comportamiento diferencial de bioacumulación de contaminantes que ocurren en diferentes biotas. Si bien los datos evaluados todavía contienen fuentes de error, es importante reconocer que también existen fuentes de variabilidad inherente. Algunas fuentes posibles, que dan como resultado la variabilidad observada en el BAF para sustancias químicas individuales entre los experimentos, son: contenido de lípidos, tamaño del organismo, transformación metabólica, carbono orgánico en el agua, temperatura, pH. De acuerdo con un estudio de revisión completo realizado por Arnot y Gobas¹⁰⁴ sobre evaluaciones de BCF y BAF para químicos orgánicos en organismos acuáticos, aquellos organismos con mayor contenido de lípidos tienen una mayor capacidad de almacenar sustancias químicas hidrofóbicas y por tanto pueden exhibir un BAF más alto. Los organismos más grandes tienen tasas de eliminación más lentas y pueden alimentarse a niveles tróficos más altos. La posición trófica es un factor clave que influye en el BAF.

Hay solo unos pocos estudios que han investigado el comportamiento de bioacumulación de TCS y TCC con resultados inconsistentes. Por ejemplo, Vimalkumar y col.¹⁴⁴ encontraron valores de *log* BAF para TCC que van de -1.70 a 1.19 en especies de peces de los ríos de la India, mientras que Yao y col.¹⁴⁵ informaron valores de *log* BAF de 1.31 (tilapia) a 5.35 (carpa común) en diferentes especies de peces silvestres de los ríos chinos. Estos valores se

¹⁴⁴ Vimalkumar, K., Arun, E., Krishna-Kumar, Poopal, R.K., Nikhil, N.P., Subramanian, A., Baburajendran, R., 2018. Occurrence of triclocarban and benzotriazole ultraviolet stabilizers in water, sediment, and fish from Indian rivers. *Science of the Total Environment*, 625 (2018) 1351–1360.

¹⁴⁵ Yao, L., Zhao, J.-L., Liu, Y.-S., Zhang, Q.-Q., Jiang, Y.-X., Liu, S., Liu, W.-R., Yang, Y.-Y., Ying, G.-G. Personal care products in wild fish in two main Chinese rivers: bioaccumulation potential and human health risks. *Science of the Total Environment*, 621 (2018) 1093–1102.

encuentran en el rango de los obtenidos en este estudio (3.52 – 4.48 en intestino y 1.71 – 4.11 en gónadas). No obstante, como se mencionó anteriormente, la comparación de los resultados es difícil porque BAF puede verse afectado por las condiciones de prueba, las especies utilizadas o la concentración de exposición de los compuestos objetivo⁶⁰.

En la **Figura IV.9** se muestra un cromatograma de una de las muestras analizadas.

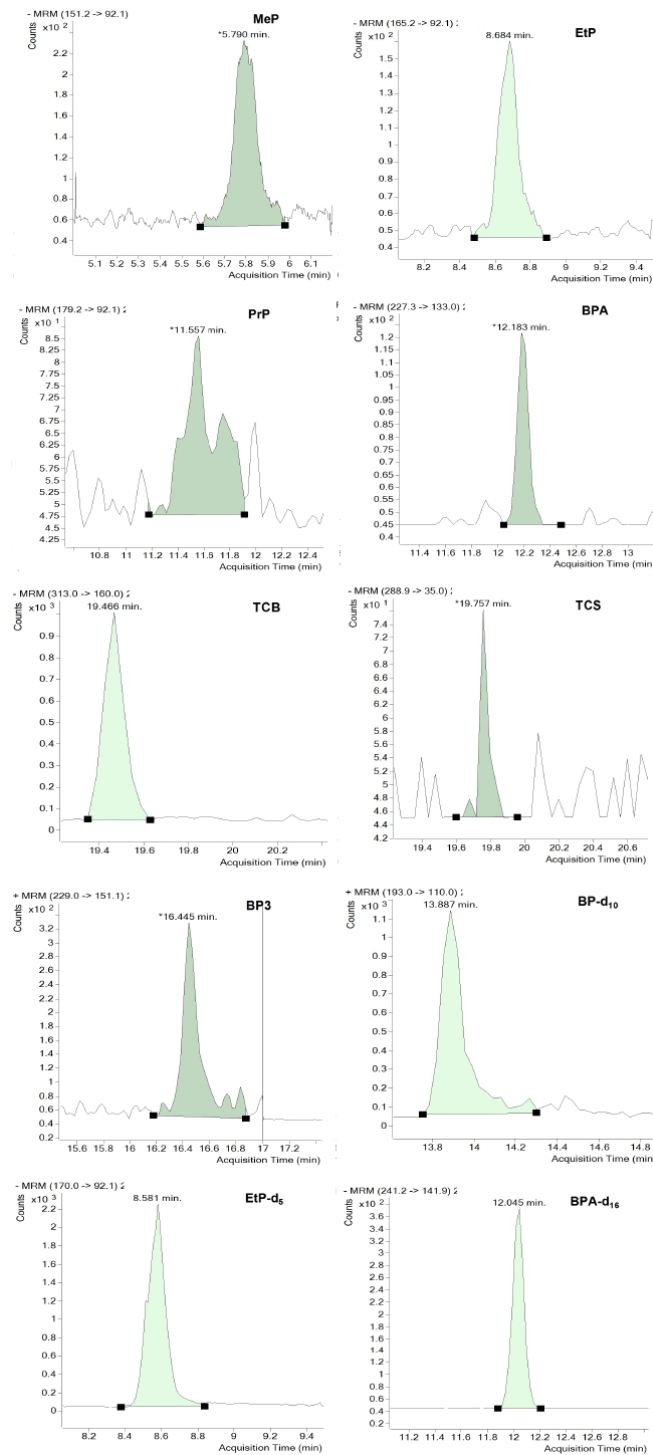


Figura IV.9. Cromatograma de una muestra.

Tabla IV.8. Valores de la literatura de $\log K_d$, $\log BAF$ y $\log BSAF$ para PCPs medidos en organismos acuáticos.

PCPs	Organismos	$\log BAF$	$\log BSAF$	Ref
MPB	Tilapia (músculo)	1.08 - 2.08		145
	Tilapia (hígado)	2.77 - 6.47		145
	Carpa común (músculo)	1.23 - 2.82		145
	Carpa común (hígado)	2.61 - 4.88		145
	Besugo (músculo)	1.19 - 1.75		145
	Besugo (hígado)	3.85 - 6.12		145
	Carpín (músculo)	1.60 - 2.10		145
	Carpín (hígado)	4.58		145
	Cacho (músculo)	1.37 - 2.17		145
	Cacho (hígado)	3.78		145
	Carpa herbívora (músculo)	1.33 - 2.08		145
	Carpa herbívora (hígado)	6.33		145
	Bagre (músculo)	1.35 - 1.68		145
	Siluro (músculo)	1.37 - 1.75		145
	Siluro (hígado)	4.38		145
	Pargo (músculo)	1.24		145
	Pargo (hígado)	4.31		145
	Pez cabeza de serpiente (músculo)	1.61		145
	Carpa de barro (músculo)	1.46		145
	Mújol (músculo)	1.56		145
EPB	Tilapia (músculo)	1.59		145
	Tilapia (hígado)	1.12 - 3.37		145
	Carpa común (músculo)	1.47 - 3.15		145
	Carpa común (hígado)	1.99 - 3.06		145
	Besugo (músculo)	2.40 - 2.70		145
	Besugo (hígado)	1.26 - 2.68		145
	Carpín (hígado)	1.66 - 2.67		145
	Cacho (músculo)	2.48 - 2.56		145
	Cacho (hígado)	2.15 - 2.40		145
	Carpa herbívora (músculo)	2.54 - 2.73		145
	Carpa herbívora (hígado)	2.23 - 2.54		145
	Bagre (músculo)	2.67		145
	Bagre (hígado)	2.14 - 2.43		145
	Siluro (hígado)	2.02 - 2.07		145
	Pargo (hígado)	1.79		145
	Pez cabeza de serpiente (hígado)	2.29		145
	Carpa de barro (hígado)	2.45		145
PPB	Tilapia (músculo)	3.60 - 4.15		145
	Carpa común (músculo)	1.24 - 4.08		145
	Carpa común (hígado)	2.85 - 3.44		145
	Besugo (músculo)	1.60 - 3.60		145
	Besugo (hígado)	2.90 - 3.29		145

	Carpín (músculo)	3.60 - 4.25		145
	Cacho (músculo)	1.55 - 3.60		145
	Cacho (hígado)	3.17		145
	Carpa herbívora (músculo)	1.63 - 4.17		145
	Carpa herbívora (hígado)	2.87		145
	Bagre (músculo)	1.55 - 4.18		145
	Bagre (hígado)	2.94		145
	Siluro (músculo)	1.29		145
	Pargo (músculo)	1.61		145
	Pez cabeza de serpiente (músculo)	3.6		145
	Carpa de barro (músculo)	3.6		145
	Mújol (músculo)	3.6		145
TCC	Pez	-1.70 - 1.19 ^a	-0.79 - 2.37	144
	Tilapia (músculo)	1.31 - 3.75		145
	Tilapia (hígado)	4.14 - 5.42		145
	Carpa común (músculo)	1.77 - 3.13		145
	Carpa común (hígado)	2.09 - 5.35		145
	Besugo (músculo)	1.59 - 1.74		145
	Besugo (hígado)	2.37 - 4.40		145
	Carpín (músculo)	3.28 - 5.49		145
	Carpín (hígado)	4.49		145
	Cacho (músculo)	2.34		145
	Cacho (hígado)	2.37 - 4.61		145
	Carpa herbívora (músculo)	1.71		145
	Carpa herbívora (hígado)	2.51 - 4.74		145
	Bagre (músculo)	2.7		145
	Bagre (hígado)	2.42 - 2.89		145
	Siluro (hígado)	2.23 - 4.47		145
	Pargo (hígado)	2.39		145
	Pez cabeza de serpiente (hígado)	4.55		145
	Carpa de barro (hígado)	5.11		145
	Pez	4.94 ^b	0.97	126
	Carpa común; Carpín	0.47 - 1.54 ^b		146
	Lombriz		0.07 - 0.70	147
	Pez (<i>Gibelion catla</i>)	2.91	0.32	148

¹⁴⁶ Tanoue, R., Nomiyama, K., Nakamura, H., Kim, J.-W., Isobe, T., Shinohara, R., Kunisue, T., Tanabe, S. Uptake and tissue distribution of pharmaceuticals and personal care products in wild fish from treated-wastewater-impacted streams. *Environmental Science & Technology*, 49 (2015) 11649–11658.

¹⁴⁷ Macherius, A., Lapen, D.R., Reemtsma, T., Rombke, J., Topp, E., Coors, A. Triclocarban, triclosan and its transformation product methyl triclosan in native earthworm species four years after a commercial-scale biosolids application. *Science of the Total Environment*, 472 (2014) 235–238.

¹⁴⁸ Shanmugam, G., Ramasamy, K., Selvaraj, K.K., Sampath, S., Ramaswamy, B.R., 2014. Triclosan in fresh water fish *Gibelion Catla* from the Kaveri River, India, and its consumption risk assessment. *Environmental Forensics*, 15:3 (2014) 207–212.

	Alga (<i>Cladophora sp</i>)	3.20 - 3.43 ^a		149
	Caracol	3.2		150
	Pez (<i>Coregonus sp</i>) y cucaracha (<i>Rutilus rutilus</i>)	5.0 - 5.4 ^b		151
TCS	Tilapia (músculo)	1.64 - 5.23		145
	Tilapia (hígado)	1.26 - 3.20		145
	Carpa común (músculo)	1.80 - 4.09		145
	Carpa común (hígado)	1.95 - 2.58		145
	Besugo (músculo)	1.31 - 3.48		145
	Besugo (hígado)	1.84 - 2.44		145
	Carpín (músculo)	2.24		145
	Carpín (hígado)	4.3		145
	Cacho (músculo)	1.93 - 2.46		145
	Cacho (hígado)	1.53		145
	Carpa herbívora (músculo)	1.9		145
	Bagre (hígado)	2.79		145
	Siluro (hígado)	2.09		145
	Pargo (hígado)	2.32		145
	Carpa de barro (músculo)	1.7		145
	Mújol (músculo)	1.71		145
	Pez	3.02 ^b	0.4 - 0.6	126
	Macrófito (<i>Echinodorus horemanIII</i> y <i>Eichhornia crassipes</i>)	3.64 [*]		152
	Carpa común; Carpín	1.23 - 2.41 ^b		146
	Lombriz		0.62 - 1.14	147
	Anfípodo (<i>Ampelisca abdita</i>) y camarón (<i>Americamysis bahía</i>)		-0.92 - (-0.63)	153
	Caracol	2.7 - 3.5 ^a		150
	Alga (<i>Cladophora sp</i>)	2.95 - 3.32 ^a		149
BPA	Plantas (<i>Callitriche sp</i>)	0.71 [*]	1.90	105
	Crustáceos (<i>Gammarus pulex</i>)	0.10 [*]	1.70	105

¹⁴⁹ Coogan, M.A., Edziyie, R.E., La Point, T.W., Venables, B.J. Algal bioaccumulation of triclocarban, triclosan, and methyl-triclosan in a North Texas wastewater treatment plant receiving stream. *Chemosphere* 67:10 (2007) 1911–1918.

¹⁵⁰ Coogan, M.A., La Point, T.W. Snail bioaccumulation of triclocarban, triclosan, and methyltriclosan in a North Texas, USA, stream affected by wastewater treatment plant runoff. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27:8 (2008), 1788–1793.

¹⁵¹ Balmer, M.E., Poiger, T., Droz, C., Romanin, K., Bergqvist, P.A., Müller, M.D., Buser, H.R. Occurrence of methyl triclosan, a transformation product of the bactericide tri- closan, in fish from various lakes in Switzerland. *Environmental Science & Technology*, 38 (2004) 390–395.

¹⁵² Pi, N., Ng, J.Z., Kelly, B.C. Bioaccumulation of pharmaceutically active compounds and endocrine disrupting chemicals in aquatic macrophytes: results of hydroponic experiments with *Echinodorus horemanIII* and *Eichhornia crassipes*. *Science of the Total Environment*, 601–602 (2017) 812–820.

¹⁵³ Perron, M.M., Ho, K.T., Cantwell, M.G., Burgess, R.M., Pelletier, M.C., 2012. Effects of triclosan on marine benthic and epibenthic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31 (2012) 1861–1866.

Caracol de agua dulce (<i>Bithynia tentaculata</i>)	1.29*	2.78	105
Macrófita (<i>Echinodorus horemanii</i> y <i>Eichhornia crassipes</i>)	0.30 - 2.17*		152
Fitoplancton, carpa, carpín, pez serpiente, zooplancton, caracol, camarones blancos, langosta, bagre	-0.40 - 1.32 ^a		154
Macro-invertebrado (<i>Hydropsyche</i>)	4.735		69
Alga	3.25 - 4.09		155
Carpa (<i>Cyprinus carpio</i>)	3.55 - 4.15		155
Mejillón (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	3.65		60
<i>Stephanodiscus hantzschii</i>	2.00 - 2.70		156
Almeja (<i>Pisidium amnicum</i>)	0.110 - 0.144 ^a		157
Huevas de salmón	0.025 - 0.066		158
Trucha arcoíris	0.23 - 1.58		159
BP3 Fish, cephalopoda and crustaceans		0.0-2.3 ^b	160
Fish		0.04-0.3 ^b	161

^a peso húmedo; ^b peso lípidos; * BCF – factor de bioconcentración.

- ¹⁵⁴ Wang, Q., Chen, M., Shan, G., Chen, P., Cui, S., Yi, S., Zhu, L. Bioaccumulation and biomagnification of emerging bisphenol analogues in aquatic organisms from Taihu Lake, China. *Science of the Total Environment*, 598 (2017) 814–820.
- ¹⁵⁵ Yang, J., Li, H., Ran, Y., Chan, K. Distribution and bioconcentration of endocrine disrupting chemicals in surface water and fish bile of the Pearl River Delta, South China. *Chemosphere*, 107 (2014) 439–446.
- ¹⁵⁶ Li, R., Chen, G.-Z., Tam, N.F.Y., Luan, T.-G., Shin, P.K.S., Cheung, S.G., Liu, Y. Toxicity of bisphenol A and its bioaccumulation and removal by a marine microalga *Stephanodiscus hantzschii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72:2 (2009) 321–328.
- ¹⁵⁷ Heinonen, J., Honkanen, J., Kukkonen, V.K., Holopainen, I.J. Bisphenol A accumulation in the freshwater clam *Pisidium amnicum* at low temperatures. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 43 (2002) 50–55.
- ¹⁵⁸ Honkanen, J.O., Heinonen, J., Kukkonen, J.V.K. Toxicokinetics of waterborne bisphenol a in landlocked salmon (*Salmo Salar* M. Sebago) eggs at various temperatures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20 (2001) 2296–2302.
- ¹⁵⁹ Lindholm, C., Pedersen, K.L., Pedersen, S.N. Estrogenic response of bisphenol A in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 48 (2000) 87–94.
- ¹⁶⁰ Peng, X., Fan, Y., Jin, J., Xiong, S., Liu, J., Tang, C. Bioaccumulation and biomagnification of ultraviolet absorbents in marine wildlife of the Pearl River Estuarine, South China Sea. *Environmental Pollution*, 225 (2017) 55–65.
- ¹⁶¹ Gago-Ferrero, P., Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D. UV filters bioaccumulation in fish From Iberian river basins. *Science of the Total Environment*, 518-519 (2015) 518-525.

CAPÍTULO V

Conclusiones

Como resultado de la investigación realizada durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, se han obtenido las siguientes conclusiones principales:

- I. Se han realizado dos estudios de revisión bibliográfica sobre los métodos analíticos para la determinación de contaminantes emergentes en aguas naturales y aguas residuales, y en lodos de depuradora.
- II. Las técnicas de extracción preferidas para analizar EDCs y PPCPs habitualmente en este tipo de muestras son SPE y LLE, mientras que en los últimos años se han utilizado técnicas de microextracción como MEPS, SPME, DLLME o QuEChERS. Las técnicas instrumentales seleccionadas para estos análisis son cromatografía de líquidos o de gases acopladas a diferentes detectores, siendo el más utilizado el detector de espectrometría de masas.
- III. Se ha desarrollado y optimizado un método analítico para la determinación de disruptores endocrinos químicos (parabenos, bisfenoles y triclocarbán) en muestras de mejillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*). En las muestras naturales, se han detectado y cuantificado 2 parabenos (MPB, BPB), un bisfenol (BPA) y TCC en la mayoría de las muestras analizadas. Otros 2 parabenos (EPB, PPB) y un bisfenol (BPAF), se detectaron también en un gran número de muestras, pero no se pudieron cuantificar en algunas de ellas.
- IV. La extracción asistida por ultrasonidos (UAE) ha sido la técnica que se ha empleado, optimizándose las variables que afectan a este proceso a partir de muestras de mejillón mediterráneo utilizando estrategias de optimización multivariante.
- V. El procedimiento final de tratamiento de muestra para mejillones parte de 0.5 g de mejillón liofilizado. Las muestras se extraen mediante dos ciclos de UAE con ACN en el primero y MeOH en el segundo. Tras la extracción el extracto se somete a un proceso de limpieza con ACN y adsorbentes dispersivos (C18).

- VI. La cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem de triple cuadrupolo (UHPLC-MS/MS) ha sido la técnica analítica empleada para el análisis de los extractos obtenidos. EPB-d₅ y BPA-d₁₀ han sido usados como patrones internos.
- VII. El método ha sido validado de manera satisfactoria y demostró ser exacto (veraz y preciso), selectivo y sensible en el rango de concentraciones estudiadas.
- VIII. Se ha llevado a cabo un estudio profundo de bioacumulación en especímenes de *Holothuria tubulosa* en un medio marino contaminado con cantidades elevadas de disruptores endocrinos (compuestos orgánicos perfluorados, parabenos, bisfenol A, benzofenona 3, triclosán y triclocarbán). Se expusieron a los animales durante 6 meses a los contaminantes tanto de forma puntual como continuada.
- IX. La metodología analítica utilizada para la realización de este estudio había sido desarrollada y validada por el grupo de investigación previamente a mi incorporación al mismo como doctoranda en colaboración con el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Sevilla.
- X. La bioacumulación de compuestos perfluorados está influenciada por la estructura de los mismos, es decir, se observa una fuerte correlación entre $\log K_d$ y $\log BAF$ y $\log BSAF$ y la longitud de la cadena de perfluoroalquilo. El $\log BAF$ más alto resultó para PFOS en el intestino del animal. Los valores de $\log BSAF$ fueron ligeramente más altos que los valores de $\log BAF$, lo que puede indicar que la acumulación en el intestino se produce a través de sedimentos en lugar de aguas, mientras que en gónadas se observó lo contrario.
- XI. Los valores de BCF para los disruptores endocrinos restantes de más alto a más bajo son en primer lugar para el TCC, después BP-3 y BPA, y por último parabenos. No obstante, según las guías de categorías de bioacumulación ($\log BCF < 3$), estos compuestos se pueden considerar no bioacumulativos


a excepción del TCC, que es un compuesto altamente bioacumulativo en el intestino.

- XII. Este estudio proporciona nuevos conocimientos sobre la distribución y el potencial de bioacumulación de diferentes tipos de contaminantes. Se observaron niveles más altos de los compuestos objeto de estudio en muestras de intestino y gónadas en comparación con muestras de agua y sedimentos, lo que indica una bioacumulación de los mismos. Los resultados también sugieren que los sedimentos pueden ser una fuente importante de contaminantes para la biota bentónica. Esto resalta la necesidad de prestar especial atención a los posibles efectos de biomagnificación en estas especies.

ANEXO I

Publicaciones de la Tesis

Chromatographic Methods for the Determination of Emerging Contaminants in Natural Water and Wastewater Samples: A Review

M. T. García-Córcoles^a, R. Rodríguez-Gómez^{a,b}, B. de Alarcón-Gómez^a, M. Çipa^c, L. Martín-Pozo, J.-M. Kauffmann^b, and A. Zafrá-Gómez^a 

^aDepartment of Analytical Chemistry, Research Group of Analytical Chemistry and Life Sciences, University of Granada, Granada, Spain;

^bLaboratory of Instrumental Analysis and Bioelectrochemistry, Faculty of Pharmacy, Université libre de Bruxelles, Brussels, Belgium;

^cDepartment of Chemistry, University of Tirana, Tirana, Albania

ABSTRACT

This review is devoted to analytical methods published in the scientific literature in the last 10 years for the determination of emerging contaminants in aquatic media. The article is mainly focused on sample preparation and on instrumental techniques most used for the detection and quantification of the analytes of interest. The sample preparation techniques include classical liquid–liquid extraction and solid-phase extraction, but also recent microextraction techniques such as solid-phase microextraction, stir-bar sorptive extraction, dispersive liquid–liquid microextraction, ultrasound-assisted emulsification microextraction, or microextraction by packed sorbent. Most studies focus on minimizing the number of analysis steps and on the use of the lowest amount of solvents in the sample treatment step. Liquid chromatography and gas chromatography mainly coupled to tandem mass spectrometry are usually the employed analytical techniques. A large number of multiresidue methods are being developed for the determination of several families of these compounds with only one extraction step to minimize sample handling and treatment.

KEYWORDS

Chromatography; emerging contaminants; mass spectrometry; natural water sources; sample treatment; wastewater

Introduction

Water resources are continuously degraded because of human impact in agricultural, industrial, urban, and touristic activities.^[1] High population density, urban expansion, and industrial development involve an increase in water demand. Additionally, this development involves the simultaneous risks of contamination and reduction of the available freshwater storage volume.^[2] A wide variety of substances have been identified as contaminants in water sources, such as organic and inorganic compounds, pathogens, nanoparticles (NPs), and so on.

The industrial development has generated an increase in the number of new chemicals produced and applied in daily activity representing a cause of concern for citizens, research community, and authorities. Pollution of water bodies by emerging contaminants is an ubiquitous phenomenon around the world. The main problems regarding contamination of water sources has been linked with the occurrence of specific pollutants by identifying major chemical stressors, determining emission and transport pathways, and defining solutions for the abatement of pollution-related risks and impacts.^[3] The Water Framework Directive (WFD) of the European Union (EU) requires the determination of several groups of compounds in European freshwater bodies.^[4] The assessment of such chemicals is based on the environmental risks for the health of freshwater ecosystems.^[5,6] Several

studies have been reported in the literature about the presence of anthropogenic substances in environmental water samples. However, a minority of these compounds are currently legislated or regulated from the point of view of environmental pollution.^[7–9]

Emerging contaminants cover a significant range of compounds belonging to different families of chemical species such as pharmaceuticals, personal care products, plasticizers, flame retardants, endocrine-disrupting chemicals (EDCs), and so on; their toxicological effects being relatively unknown.^[10] Pharmaceuticals are a class of emerging environmental contaminants widely used in human and veterinary medicine and essential to modern healthcare. Their potential risk to human health has prompted interest about negative impacts that may result from continuous contamination of the environment with these compounds.^[11] Polybrominated diphenylethers (PBDEs) are additive flame retardants used in a wide range of polymeric materials, such as foams, resins, and adhesives. These compounds are persistent and bioaccumulate in the environment, thus causing adverse effects in the ecosystem.^[12,13] Furthermore, PDBEs have been reported to have potential risks on human health, causing neurotoxicity and disruption of the endocrine system.^[14,15] Endocrine-disrupting chemicals are a group of synthetic and natural substances capable of altering the normal hormone function of wildlife and humans.^[9] These compounds mimic and antagonize the

- [220] Hensley, R. N.; Kerrigan, J. F.; Pang, H.; Erickson, P. R.; Grandbois, M.; McNeill, K.; Arnold, W. A. Triclosan, chlorinated triclosan derivatives, and hydroxylated polybrominated diphenyl ethers (OH-BDEs) in wastewater effluents. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* **2015**, *1*, 316–325.
- [221] Vulliet, E.; Cren-Olivé, C.; Grenier-Loustalot, M. F. Occurrence of pharmaceuticals and hormones in drinking water treated from surface waters. *Environ. Chem. Lett.* **2011**, *9*, 103–114.
- [222] Ningsun Zhou, S.; Reiner, E. J.; Marvin, C.; Helm, P.; Riddell, N.; Dorman, F.; Misselwitz, M.; Shen, L.; Crozier, P.; MacPherson, K.; et al. Development of liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry for analysis of halogenated flame retardants in wastewater. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *396*, 1311–1320.
- [223] Woudneh, M. B.; Benskin, J. P.; Wang, G.; Grace, R.; Coreen Hamilton, M.; Cosgrove, J. R. 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* **2015**, *1400*, 149–155.
- [224] Papageorgiou, M.; Kosma, C.; Lambropoulou, D. Seasonal occurrence, removal, mass loading and environmental risk assessment of 55 pharmaceuticals and personal care products in a municipal wastewater treatment plant in Central Greece. *Sci. Total Environ.* **2016**, *543*, 547–569.
- [225] Langford, K. H.; Thomas, K. V. Determination of pharmaceutical compounds in hospital effluents and their contribution to wastewater treatment works. *Environ. Int.* **2009**, *35*, 766–770.
- [226] Ort, C.; Lawrence, M. G.; Reungoat, J.; Eaglesham, G.; Carter, S.; Keller, J. Determining the fraction of pharmaceutical residues in wastewater originating from a hospital. *Water Res.* **2010**, *44*, 605–615.
- [227] Silva, A. R. M.; Nogueira, J. M. F. New approach on trace analysis of triclosan in personal care products, biological and environmental matrices. *Talanta* **2008**, *74*, 1498–1504.
- [228] Schreder, E. D.; La Guardia, M. J. Flame retardant transfers from U.S. households (dust and laundry wastewater) to the aquatic environment. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 11575–11583.
- [229] Chaves, A. R.; Leandro, F. Z.; Carris, J. A.; Queiroz, M. E. C. Microextraction in packed sorbent for analysis of antidepressants in human plasma by liquid chromatography and spectrophotometric detection. *J. Chromatogr. B* **2010**, *878*, 2123–2129.
- [230] Rocha-Gutierrez, B.; Lee, W. Y. Investigation of polybrominated diphenyl ethers in wastewater treatment plants along the U.S. and Mexico border: A trans-boundary study. *Water. Air. Soil Pollut.* **2013**, *224*, 1398–1411.
- [231] Su, S.; Chen, B.; He, M.; Xiao, Z.; Hu, B. A novel strategy for sequential analysis of gold nanoparticles and gold ions in water samples by combining magnetic solid phase extraction with inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. Atom. Spectrom.* **2014**, *29*, 444–453.
- [232] Popp, M.; Hann, S.; Koellensperger, G. Environmental application of elemental speciation analysis based on liquid or gas chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry – A review. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *668*, 114–129.
- [233] Proulx, K.; Wilkinson, K. J. Separation, detection and characterization of engineered nanoparticles in natural waters using hydrodynamic chromatography and multi-method detection (light scattering, analytical ultracentrifugation and single particle ICP-MS). *Environ. Chem.* **2014**, *11*, 392–401.



Analytical methods for the determination of emerging contaminants in sewage sludge samples. A review



Laura Martín-Pozo^{a,1}, Blanca de Alarcón-Gómez^{a,1}, Rocío Rodríguez-Gómez^a,
María Teresa García-Córcoles^a, Morsina Çipa^b, Alberto Zafra-Gómez^{a,*}

^a Research Group of Analytical Chemistry and Life Sciences, Department of Analytical Chemistry, University of Granada, Campus of Fuentenueva, E-18071 Granada, Spain

^b Department of Chemistry, University of Tirana, St. Bulevardi "Zogu I", 1001 Tirana, Albania

ARTICLE INFO

Keywords:

Emerging contaminants
Sewage sludge
Sample treatment
Chromatography
Mass spectrometry

ABSTRACT

Emerging contaminants are a heterogeneous group of chemicals that includes daily personal care products and pharmaceuticals (PPCPs), flame retardants, endocrine disrupting chemicals (EDCs) and nanoparticles (NPs). The present work is an overview focused in the research published in the scientific literature for the determination of this type of pollutants in sewage sludge samples in the last 5 years. Instrumental and sample preparation methods for the detection and quantification of the analytes of interest are reviewed, with an emphasis on the sample treatment techniques. Liquid chromatography (LC) and gas chromatography (GC) coupled to mass spectrometry are generally employed as the analytical technique of preference. Sample preparation techniques include conventional methods such as Soxhlet, solid-phase extraction (SPE), pressurized liquid extraction (PLE) or ultrasound-assisted extraction (UAE), but also other recent techniques, including novel microextraction techniques such as microextraction by packed sorbent (MEPS) or solid-phase microextraction (SPME).

1. Introduction

In recent years, continuous industrial development has propitiated the generation of a wide variety of new chemicals applied in daily anthropogenic practices. These substances, which range from organic and inorganic compounds to nanoparticles, are considered to be pollutants and represent a cause of concern for society [101]. A number of

families of compounds, such as pharmaceuticals and personal care products (PPCPs), flame retardants, nanoparticles or endocrine disrupting chemicals (EDCs) among many substances, form this heterogeneous group, often referred as "emerging contaminants". These substances are ubiquitous and present potential risks to human health and the environment, although their toxicological effects are not yet fully known in many cases [134]. Research, however, has determined that

Abbreviations: ACN, acetonitrile; AOX, halogenated organic compounds; APs, alkylphenols; BFRs, brominated flame retardants; BPA, bisphenol A; BSTFA, N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide; CID, collision-induced dissociation; DAD, diode array detector; DCM, dichloromethane; DDT, dichlorodiphenyltrichloroethane; decaBDE, decabromodiphenylether; DEHP, bis(2-ethylhexyl) phthalate; ECNI, electron capture negative ion mass spectrometry; EDCs, endocrine disrupting chemicals; EI, electron ionization; ESI, electrospray ionization; EtAc, ethyl acetate; FLD, fluorescence detector; GC-HRMS, gas chromatography–high-resolution mass spectrometry; GC-LRMS, gas chromatography–low-resolution mass spectrometry; GC-MSⁿ, gas chromatography-mass spectrometry; HBCDs, hexabromocyclododecanes; HESI-II, electrospray interface heated electrospray ionization; HS-SPME, headspace solid-phase microextraction; ICP-MS, inductively coupled plasma mass spectrometry; LAS, linear alkylbenzene sulfonates; LC-MSⁿ, Liquid chromatography-mass spectrometry; LOD, limit of detection; MAE, microwave-assisted extraction; MeOH, methanol; MEPS, microextraction by packed sorbent; MRM, multiple reactions monitoring; MS, single mass spectrometry; MS/MS, tandem mass spectrometry; MSTFA, N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide; MTBSTFA, N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide; NCI, Negative chemical ionization; NPs, nanoparticles; NPEs, nonylphenol ethoxylates; NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drugs; octaBDE, octabromodiphenylether; OPES, octylphenol ethoxylates; OPFRs, organophosphorus flame retardants; PBs, parabens; PBBs, polybrominated biphenyls; PBDEs, polybrominated diphenyl ethers; PCBs, polychlorinated biphenyls; PCPs, personal care products; PHWE, pressurized hot water extraction; PLE, pressurized liquid extraction; POPs, persistent organic pollutants; PPCPs, personal care products and pharmaceuticals; QuEChERS, Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged & Safe; QqLIT, hybrid triple quadrupole/linear ion trap; QqQ, triple quadrupole; ROS, Reactive oxygen species; SPE, solid-phase extraction; SPME, solid-phase microextraction; STPs, sewage treatment plants; TCC, trichloroethane; TCS, triclosan; TMCS, trimethylchlorosilane; TMS, methoximated trimethylsilyl; UAE, ultrasound-assisted extraction; WWTPs, Wastewater treatment plants

* Corresponding author.

E-mail address: azafra@ugr.es (A. Zafra-Gómez).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.056>

Received 18 June 2018; Received in revised form 12 September 2018; Accepted 17 September 2018

Available online 19 September 2018

0039-9140/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

- [164] Y. Yu, L. Wu, Analysis of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products in sewage sludge by gas chromatography–mass spectrometry, *Talanta* 89 (2012) 258–263, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.12.023>.
- [165] X. Yu, J. Xue, H. Yao, Q. Wu, A.K. Venkatesanc, R.U. Haldenc, K. Kannan, Occurrence and estrogenic potency of eight bisphenol analogs in sewage sludge from the U.S. EPA targeted national sewage sludge survey, *J. Hazard. Mater.* 299 (2015) 733–739, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.07.012>.
- [166] X. Yuan, Z. Qiang, W. Ben, B. Zhu, J. Liu, Rapid detection of multiple class pharmaceuticals in both municipal wastewater and sludge with ultrahigh performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Environ. Sci.* 26 (2014) 1949–1959, <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.06.022>.
- [167] L. Zeng, R. Yang, Q. Zhang, H. Zhang, K. Xiao, H. Zhang, Y. Wang, P.K.S. Lam, G. Jiang, Current levels and composition profiles of emerging halogenated flame retardants and dehalogenated products in sewage sludge from municipal wastewater treatment plants in China, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 12586–12594, <https://doi.org/10.1021/es503510q>.
- [168] K. Zhang, X. Liu, Mixed-mode chromatography in pharmaceutical and biopharmaceutical applications, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 128 (2016) 73–88, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.05.007>.
- [169] X. Zhao, Z.F. Zhang, L. Xu, L.Y. Liu, W.W. Song, F.J. Zhu, Y.F. Li, W.L. Ma, Occurrence and fate of benzotriazoles UV filters in a typical residential wastewater treatment plant in Harbin, China, *Environ. Pollut.* 227 (2017) 215–222, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.072>.
- [170] L.J. Zhou, G.G. Ying, S. Liu, J.L. Zhao, B. Yang, Z.F. Chen, H.J. Lai, Occurrence and fate of eleven classes of antibiotics in two typical wastewater treatment plants in South China, *Sci. Total Environ.* 452–453 (2013) 365–376, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.03.010>.
- [171] O. Zuloaga, P. Navarro, E. Bizkarguenaga, A. Iparraguirre, A. Vallejo, M. Olivares, A. Prieto, Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: a review, *Anal. Chim. Acta* 736 (2012) 7–29, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.01>.

Environmental Research

Determination of endocrine disrupting chemicals in Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) using ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	ER-21-1497
Article Type:	Research paper
Section/Category:	Environmental Chemistry and Toxicology
Keywords:	Endocrine disruptors; Bisphenols; Parabens; Triclocarban; UHPLC-MS/MS; MYTILUS GALLOPROVINCIALIS
Corresponding Author:	Alberto Zafra-Gómez, PhD University of Granada Granada, Andalucía SPAIN
First Author:	Maria Teresa García-Córcoles, PhD Student
Order of Authors:	Maria Teresa García-Córcoles, PhD Student Laura García-Fernández, Student Felix Hidalgo, PhD Alberto Navalón, PhD Alberto Zafra-Gómez, PhD
Abstract:	There are numerous types of contaminants that pose a health risk to aquatic organisms and consequently also to humans through consumption. Endocrine disrupting compounds are found in daily-use products and have the potential to mimic natural hormones. The main objective of this work is to optimize and validate a method for the determination of bisphenols, parabens and triclocarban in natural samples of Mediterranean mussel (<i>Mytilus galloprovincialis</i>). The procedure involves ultrasound-assisted extraction (UAE), and a subsequent clean-up of the extracts using dispersive solid phase extraction (d-SPE) with C ₁₈ adsorbent, and analysis by ultra-high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UHPLC – MS/MS). Sensitivity, accuracy (trueness and precision), linearity and selectivity of the method were studied. The limits of detection ranged from 0.2 ng g ⁻¹ to 1.5 ng g ⁻¹ . The trueness of the method (estimation of the recovery) was between 90 % for TCC and 109.6 % for BisPhP, with an estimated precision lower than 12.6 % for all the investigated analytes. The application of the method was to specimens of <i>Mytilus galloprovincialis</i> collected along the Mediterranean coast of Granada (South Spain), where the species is abundant. The bioaccumulation study conducted in different sample sites revealed EDC accumulation in this aquatic species.
Suggested Reviewers:	A. Moumen, PhD Researcher, Université Mohammed Premier Oujda: Universite Mohammed Premier Oujda abelm127@hotmail.com Dr. Moumen is an expert in the of <i>Mytilus</i> spp. mussels as bioindicators of pollution in the coastal environment. The research group of this professor has published in the subject of the present research. They are referenced in the bibliographic list. Gabriel Cotrim, PhD Researcher, Centro Interdisciplinar em Energia e Ambiente – CIEnAm, UFBA, Salvador-BA, Brazil gabriel.cotrim.souza@gmail.com Dr. Cotrim has published in the subject of this research. The research group has published in the field of endocrine disruptors and the strategies for determination and occurrence in marine environments. Further, they are also referenced in the bibliographic list of the present manuscript. Julia Martin, PhD Professor, University of Seville: Universidad de Sevilla

jbueno@us.es

Dr. Martin-Bueno has published in the subject of this research. She has work with biological and environmental samples similar to the ones proposed in the present research.

Olga Koba, PhD

Professor, University of South Bohemia, Vodnany, Czech Republic

okoba@frov.jcu.cz

Dr. Koba is a worldwide expert in water protection and exposure to pollutants in aquatic media and marine organisms.

Ana Luisa Maulvaul, PhD

Professor, Portuguese Institute for the Sea and Atmosphere: Instituto Portugues do Mar e da Atmosfera

aluisa@ipma.pt

Dr. Maulvaul is an important specialist in the field of bioaccumulation of emerging chemical contaminants in marine species.

Ewa Szalinska, PhD

Professor, University of Technology, Warszawska, Poland

eszalin@pk.edu.pl

Dr. Szalinska have widely worked in Environmental Chemistry, Protection of Waters and Analytical Chemistry.



Short Communication

Assessing bioaccumulation potential of personal care, household and industrial products in a marine echinoderm (*Holothuria tubulosa*)

Julia Martín^{a,*}, Felix Hidalgo^b, Esteban Alonso^a, María Teresa García-Corcoles^c, Jose Luis Vilchez^c, Alberto Zafra-Gómez^c

^a Department of Analytical Chemistry, Escuela Politécnica Superior, University of Seville, C/ Virgen de África 7, E-41011 Seville, Spain

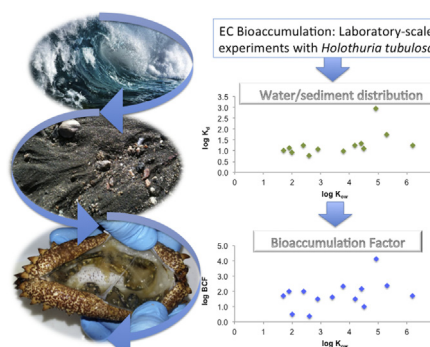
^b Department of Zoology, University of Granada, Campus of Fuentenueva, E-18071 Granada, Spain

^c Research Group of Analytical Chemistry and Life Sciences, Department of Analytical Chemistry, University of Granada, Campus of Fuentenueva, E-18071 Granada, Spain

HIGHLIGHTS

- Bioaccumulation of 16 emerging chemicals in a marine echinoderm was investigated.
- A multi-compartment approach: water, sediments and *H. tubulosa* specimens was used.
- Target compounds were readily detected in intestine and gonads of *H. tubulosa*.
- TCB, AS, and BP3 exhibited the highest degree of bioaccumulation.
- TCB can be classified as a very bioaccumulative compound.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 November 2019

Received in revised form 28 February 2020

Accepted 1 March 2020

Available online 03 March 2020

Editor: Thomas Kevin V

Keywords:

Personal care products

Household and industrial chemicals

Holothuria tubulosa

Environmental partitioning

Bioaccumulation studies

Marine pollution

ABSTRACT

A bioaccumulation study of 16 emerging contaminants including preservatives, UV-filters, biocides, alkylphenols, anionic surfactants and plasticizers, in *Holothuria tubulosa* Gmelin, 1791 specimens was developed. Water and sediments from their coastal habitat were also analyzed. Sediment-water distribution coefficients ($\log K_d$) were in the range 0.78 to 2.95. A rapid uptake and bioaccumulation of pollutants was found. Compounds were detected in intestine and gonads of *H. tubulosa* after only eight days of exposure. Field-based bioconcentration (BCF) and biota-sediment accumulation factors (BSAF) were calculated. $\log BCF > 1$ were obtained for most of the compounds studied, indicating their tendency to accumulate in tissue of *H. Tubulosa*. BCF values decrease as follow: Triclocarban > anionic surfactants > benzophenone 3 > non-ionic surfactants > bisphenol A > parabens. These data provide a detailed accounting of the distribution patterns of some emerging contaminants in organisms at the lower trophic level, representing a potential source of contaminants for organisms in higher levels of the food chain.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Contaminants of emerging concern (CECs) such as preservatives, UV-filters, biocides, surfactants, and others are being increasingly

* Corresponding author.

E-mail address: jbueno@us.es (J. Martín).

- posidonia oceanica ecosystem: body compartment, seasonal, geographical and bathymetric variations. *Environ. Bioindic.* 1, 268–285.
- Wilkinson, J., Hooda, P.S., Barker, J., Barton, S., Swinden, J., 2017. Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water: an overarching review of the field. *Environ. Pollut.* 231, 954–970.
- Wilkinson, J.L., Hooda, P.S., Swinden, J., Barker, J., Barton, S., 2018. Spatial (bio)accumulation of pharmaceuticals, illicit drugs, plasticisers, perfluorinated compounds and metabolites in river sediment, aquatic plants and benthic organisms. *Environ. Pollut.* 234, 864–875.
- Xing, J., Chia, F.S., 1997. Heavy metal accumulation in tissue/organs of a sea cucumber, *Holothuria leucospilota*. *Asia-Pacific Conference on Science and Management of Coastal Environment*, pp. 17–23.
- Xu, J., Guo, C.S., Zhang, Y., Meng, W., 2014. Bioaccumulation and trophic transfer of perfluorinated compounds in a eutrophic freshwater food web. *Environ. Pollut.* 184, 254–261.
- Yang, J., Li, H., Ran, Y., Chan, K., 2014. Distribution and bioconcentration of endocrine disrupting chemicals in surface water and fish bile of the Pearl River Delta, South China. *Chemosphere* 107, 439–446.
- Yao, L., Zhao, J.-L., Liu, Y.-S., Zhang, Q.-Q., Jiang, Y.-X., Liu, S., Liu, W.-R., Yang, Y.-Y., Ying, G.-G., 2018. Personal care products in wild fish in two main Chinese rivers: bioaccumulation potential and human health risks. *Sci. Total Environ.* 621, 1093–1102.
- Zhang, H., Kelly, B.C., 2018. Sorption and bioaccumulation behavior of multi-class hydrophobic organic contaminants in a tropical marine food web. *Chemosphere* 199, 44–53.
- Zhang, X., Gao, Y.J., Li, Q.Z., Li, G.X., Guo, Q.H., Yan, C.Z., 2011. Estrogenic compounds and estrogenicity in surface water, sediments, and organisms from Yundang lagoon in Xiamen, China. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 93–100.
- Zhao, Y.G., Wan, H.T., Wong, M.H., Wong, C.K.C., 2014. Partitioning behavior of perfluorinated compounds between sediment and biota in the Pearl River Delta of South China. *Mar. Pollut. Bull.* 83, 148–154.



Bioaccumulation of perfluoroalkyl substances in marine echinoderms: Results of laboratory-scale experiments with *Holothuria tubulosa* Gmelin, 1791



Julia Martín ^a, Félix Hidalgo ^b, María Teresa García-Corcoles ^c,
Alejandro José Ibáñez-Yuste ^d, Esteban Alonso ^a, Jose Luís Vilchez ^c,
Alberto Zafra-Gómez ^{c,*}

^a Department of Analytical Chemistry, Escuela Politécnica Superior, University of Seville, C/ Virgen de África 7, E-41011, Seville, Spain

^b Department of Zoology, University of Granada, Campus of Fuentenueva, E-18071, Granada, Spain

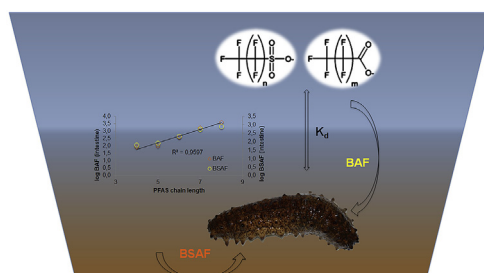
^c Research Group of Analytical Chemistry and Life Sciences, Department of Analytical Chemistry, University of Granada, Campus of Fuentenueva, E-18071, Granada, Spain

^d Agriculture and Fisheries Management Agency of Andalusia (AGAPA), Administrative Central Services, Av. of Greece s/n, 41012, Seville, Spain

HIGHLIGHTS

- PFAS bioaccumulation in *Holothuria tubulosa* was investigated.
- Concentration levels in *Holothuria tubulosa* were higher than in water and sediments.
- log BAF and BSAF suggest potential bioaccumulation of PFAS in *Holothuria tubulosa*.
- PFAS levels were higher in intestine than in gonads of *Holothuria tubulosa* specimens.
- PFAS bioaccumulation is related to perfluoroalkyl chain length.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 July 2018

Received in revised form

5 October 2018

Accepted 6 October 2018

Available online 8 October 2018

Handling Editor: Myrto Petreas

Keywords:

Perfluoroalkyl substances

Holothuria tubulosa

Environmental partitioning

Bioaccumulation studies

ABSTRACT

Bioaccumulation of six perfluoroalkyl substances (PFAS) was assessed using the marine echinoderm *Holothuria tubulosa* Gmelin, 1791. Batch experiments were conducted to establish the relationship between concentrations in water, sediment and biota over 197 days. The sample treatment for the determination of compounds involves steps of lyophilization, solvent extraction and clean-up of the extracts with dispersive sorbents. PFAS were then analysed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. During contaminant exposure, detectable levels of compounds were found in all samples collected. Mean concentrations of selected PFAS were higher in sediments than in water samples. This fact is explained by the strong adsorption of these compounds into sediments. Sediment–water distribution coefficients (log K_d) were in the range 0.11 (PFBuA) to 2.46 (PFOA). Besides this, PFAS accumulation was observed in *Holothuria tubulosa* organisms. The uptake of PFAS was very rapid, reaching the maximum between 22 and 38 days of assay. Bioaccumulation factors (mean log BAF: 1.16–4.39) and biota sediment accumulation factors (mean log BSAF: 1.37–2.89) indicated a high bioaccumulation potential for the target compounds. Both parameters increased with perfluoroalkyl chain length ($R^2 > 0.93$; $p < 0.05$). In organ-specific distributions of PFAS, greater concentrations were found in intestine than in gonads. Also, male specimens showed higher concentration levels than female (student t -test: $t_{cal} = 2.788$, $t_{tab} = 2.262$; $p < 0.05$). These data provide a detailed accounting of PFAS fate and

* Corresponding author.

E-mail address: azafra@ugr.es (A. Zafra-Gómez).

- 2016a. Polar stir bars for isolation and preconcentration of perfluoroalkyl substances from human milk samples prior to UHPLC–MS/MS analysis. *Bioanalysis* 8 (7), 633–647.
- Martín, J., Rodríguez-Gómez, R., Zafra-Gómez, A., Alonso, E., Vílchez, J.L., Navalón, A., 2016b. Validated method for the determination of perfluorinated compounds in placental tissue samples based on a simple extraction procedure followed by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis. *Talanta* 150 (1), 169–176.
- Martín, J., Zafra-Gómez, A., Hidalgo, F., Ibáñez-Yuste, A.J., Alonso, E., Vílchez, J.L., Navalón, A., 2017. Multi-residue analysis of 36 priority and emerging pollutants in marine echinoderms (*Holothuria tubulosa*) and marine sediments by solid-liquid extraction followed by dispersive solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis. *Talanta* 166 (1), 336–348.
- Martin, J.W., Mabury, S.A., Solomon, K.R., Muir, D.C.G., 2003a. Bioconcentration and tissue distribution of perfluorinated acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 196–203.
- Martin, J.W., Mabury, S.A., Solomon, K.R., Muir, D.C.G., 2003b. Dietary accumulation of perfluorinated acids in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 189–195.
- Moon, H.B., Kannan, K., Yun, S., An, Y.R., Choi, S.G., Park, J.Y., Kim, Z.G., Moon, D.Y., Choi, H.G., 2010. Perfluorinated compounds in minke whales (*Balaenoptera acutorostrata*) and long-beaked common dolphins (*Delphinus capensis*) from Korean coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 1130–1135.
- Mudumbi, J.B.N., Ntwampe, S.K.O., Matsha, T., Mekuto, L., Itoba-Tombo, E.F., 2017. Recent developments in polyfluoroalkyl compounds research: a focus on human/environmental health impact, suggested substitutes and removal strategies. *Environ. Monit. Assess.* 189, 402.
- Munoz, G., Labadie, P., Botta, F., Lestremou, F., Lopez, B., Geneste, E., Pardon, P., Dévier, M.H., Budzinski, H., 2017. Occurrence survey and spatial distribution of perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl surfactants in groundwater, surface water, and sediments from tropical environments. *Sci. Total Environ.* 607–608, 243–252.
- Myers, A.L., Crozier, P.W., Helm, P.A., Brimacombe, C., Furdui, V.I., Reiner, E.J., Burniston, D., Marvin, C.H., 2012. Fate, distribution, and contrasting temporal trends of perfluoroalkyl substances (PFASs) in Lake Ontario, Canada. *Environ. Int.* 44, 92–99.
- Naille, J.E., Khim, J.S., Hong, S., Park, J., Kwon, B.O., Ryu, J.S., Hwang, J.H., Jones, P.D., Giesy, J.P., 2013. Distributions and bioconcentration characteristics of perfluorinated compounds in environmental samples collected from the west coast of Korea. *Chemosphere* 90 (2013), 387–394.
- Naille, J.E., Khim, J.S., Wang, T., Chen, C., Luo, W., Kwon, B.O., Park, J., Koh, C.H., Jones, P.D., Lu, Y., Giesy, J.P., 2010. Perfluorinated compounds in water, sediment, soil and biota from estuarine and coastal areas of Korea. *Environ. Pollut.* 158, 1237–1244.
- Pan, C.G., Yu, K.F., Wang, Y.H., Zhang, R.J., Huang, X.Y., Wei, C.S., Wang, W.Q., Bin Zeng, W., Qin, Z.J., 2018. Specific profiles and risk assessment of perfluoroalkyl substances in coral reef fishes from the South China Sea. *Chemosphere* 191, 450–457.
- Pan, G., Zhou, Q., Luan, X., Fu, Q.S., 2014. Distribution of perfluorinated compounds in Lake Taihu (China): impact to human health and water standards. *Sci. Total Environ.* 487, 778–784.
- Pico, Y., Blasco, C., Farre, M., Barcelo, D., 2012. Occurrence of perfluorinated compounds in water and sediment of L'Albufera natural Park (Valencia, Spain). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 946–957.
- Pignotti, E., Casas, G., Llorca, M., Tellbüscher, A., Almeida, D., Dinelli, E., Farré, M., Barceló, D., 2017. Seasonal variations in the occurrence of perfluoroalkyl substances in water, sediment and fish samples from Ebro Delta (Catalonia, Spain). *Sci. Total Environ.* 607–608, 933–943.
- Purcell, S.W., Samyn, Y., Conand, C., 2012. Commercially Important Sea Cucumbers of the World. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. No. 6. FAO, Rome, p. 150, 30 colour plates.
- Renner, R., 2006. The long and the short of perfluorinated replacements. *Environ. Sci. Technol.* 1, 12–13.
- Renzi, M., Guerranti, C., Giovani, A., Perra, G., Focardi, S.E., 2013. Perfluorinated compounds: levels, trophic web enrichments and human dietary intakes in transitional water ecosystems. *Mar. Pollut. Bull.* 76, 146–157.
- Rocha, A.C., Camacho, C., Eljarrat, E., Peris, A., Aminot, Y., Readman, J.W., Boti, V., Nannou, C., Marques, A., Nunes, M.L., Almeida, C.M., 2018. Bioaccumulation of persistent and emerging pollutants in wild sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Environ. Res.* 161, 354–363.
- Schubert, S., Keddig, N., Gerwinski, W., Neukirchen, J., Kammann, U., Haarich, M., Hanel, R., Theobald, N., 2016. Persistent organic pollutants in Baltic herring (*Clupea harengus*)—an aspect of gender. *Environ. Monit. Assess.* 188, 368–380.
- Sedlak, M.D., Benskin, J.P., Wong, A., Grace, R., Greig, D.J., 2017. Per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in San Francisco Bay wildlife: temporal trends, exposure pathways, and notable presence of precursor compounds. *Chemosphere* 185, 1217–1226.
- Shi, Y., Pan, Y., Wang, J., Cai, Y., 2012. Distribution of perfluorinated compounds in water, sediment, biota and floating plants in Baiyangdian Lake, China. *J. Environ. Monit.* 14, 636–642.
- Sturm, R., Ahrens, L., 2010. Trends of polyfluoroalkyl compounds in marine biota and in humans. *Environ. Chem.* 7, 457–484.
- Sugni, M., Mozzi, D., Barboglio, A., Bonasoro, F., Carnevali, M.D.C., 2007. Endocrine disrupting compounds and echinoderms: new ecotoxicological sentinels for the marine ecosystem. *Ecotoxicology* 16, 95–108.
- Thompson, J., Roach, A., Eaglesham, G., Bartkow, M.E., Edge, K., Mueller, J.F., 2011. Perfluorinated alkyl acids in water, sediment and wildlife from Sydney Harbour and surroundings. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2869–2875.
- Tomy, G.T., Budakowski, W., Halldorson, T., Helm, P.A., Stern, G.A., Friesen, K., Pepper, K., Tittlemier, S.A., Fisk, A.T., 2004. Fluorinated organic compounds in an Eastern arctic marine food web. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6475–6481.
- Uthicke, S., 2001. Nutrient regeneration by abundant coral reef holothurians. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 265, 153–170.
- Wang, J., Zhang, Y., Zhang, F., Yeung, L.W.Y., Taniyasu, S., Yamazaki, E., Wang, R., Lam, P.K.S., Yamashita, N., Dai, J., 2013. Age- and gender-related accumulation of perfluoroalkyl substances in captive Chinese alligators (*Alligator sinensis*). *Environ. Pollut.* 179, 61–67.
- Warnau, M., Dutrieux, S., Ledent, G., Rodriguez, A.M., Dubois, P., 2006. Heavy metals in the sea cucumber *Holothuria tubulosa* (Echinodermata) from the mediterranean *Posidonia oceanica* ecosystem: body compartment, Seasonal, geographical and bathymetric variations. *Environ. Bioindic.* 1, 268–285.
- Wilkinson, J.L., Hooda, P.S., Swinden, J., Barker, J., Barton, S., 2018. Spatial (bio) accumulation of pharmaceuticals, illicit drugs, plasticisers, perfluorinated compounds and metabolites in river sediment, aquatic plants and benthic organisms. *Environ. Pollut.* 234, 864–875.
- Wu, Y., Wang, Y., Li, J., Zhao, Y., Guo, F., Liu, J., Cai, Z., 2012. Perfluorinated compounds in seafood from coastal areas in China. *Environ. Int.* 42, 67–71.
- Xia, J., Chia, F.S., 1997. Heavy metal accumulation in tissue/organs of a sea cucumber, *Holothuria leucospilota*. *Hydrobiologia* 352, 17–23.
- Xie, Z., Lu, G., Yan, Z., Liu, J., Wang, P., Wang, Y., 2017. Bioaccumulation and trophic transfer of pharmaceuticals in food webs from a large freshwater lake. *Environ. Pollut.* 222, 356–366.
- Xing, J., Chia, F.S., 1997. Heavy metal accumulation in tissue/organs of a sea cucumber, *Holothuria leucospilota*. In: Asia-Pacific Conference on Science and Management of Coastal Environment, pp. 17–23.
- Xu, J., Guo, C.S., Zhang, Y., Meng, W., 2014. Bioaccumulation and trophic transfer of perfluorinated compounds in a eutrophic freshwater food web. *Environ. Pollut.* 184, 254–261.
- Yang, L., Zhu, L., Liu, Z., 2011. Occurrence and partition of perfluorinated compounds in water and sediment from Liao River and Taihu Lake, China. *Chemosphere* 83, 806–814.
- Zhang, H., Kelly, B.C., 2018. Sorption and bioaccumulation behavior of multi-class hydrophobic organic contaminants in a tropical marine food web. *Chemosphere* 199, 44–53.
- Zhao, Y.G., Wan, H.T., Wong, M.H., Wong, C.K.C., 2014. Partitioning behavior of perfluorinated compounds between sediment and biota in the Pearl River Delta of South China. *Mar. Pollut. Bull.* 83, 148–154.
- Zhao, Y.G., Wong, C.K.C., Wong, M.H., 2012. Environmental contamination, human exposure and body loadings of perfluorooctane sulfonate (PFOS), focusing on Asian countries. *Chemosphere* 89, 355–368.
- Zhou, Q., Deng, S.B., Fan, Q., Zhang, Q.Y., Yu, G., Huang, J., 2010. Sorption of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate on activated sludge. *Chemosphere* 81, 453–458.

ANEXO II

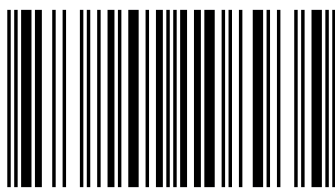
Otras publicaciones

En este Anexo se recogen otros trabajos de investigación desarrollados y publicados a lo largo de estos años, que no forman parte de la línea de investigación de la presente Tesis Doctoral.

Determinación de contaminantes en muestras de Agua Natural y Residual

En el presente trabajo se proporciona una visión general de los métodos analíticos desarrollados en los últimos 10 años para la determinación de contaminantes emergentes en medios acuáticos. Principalmente, el estudio se centra en la preparación de muestra y en las técnicas instrumentales utilizadas para la detección y cuantificación de los compuestos objeto de estudio. Las técnicas de preparación de muestra no solo incluyen técnicas de extracción clásica, sino que también incluyen técnicas modernas de microextracción, como la microextracción en fase sólida (SPME), la extracción por adsorción sobre una barra agitada (SBSE), la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME), la microextracción por emulsión asistida por ultrasonido (USAEME) o la microextracción mediante adsorbente empaquetado (MEPS). La mayoría de los estudios se centran en minimizar el número de pasos y usar la menor cantidad de disolvente posible. En cuanto a las técnicas instrumentales habitualmente empleadas se encuentran la cromatografía de líquidos (LC) y la cromatografía de gases (GC) acopladas principalmente a la espectrometría de masas en tándem.

La Doctora Rocío Rodríguez Gómez, autora principal de la obra, pertenece al grupo de investigación Química Analítica y Ciencias de la vida de la Universidad de Granada. Junto con el Doctor Alberto Zafrá Gómez, coautor de la obra, poseen una amplia experiencia en el desarrollo de métodos analíticos para la determinación de contaminantes emergentes.



978-620-2-10893-5

editorial académica **española**



Rocío Rodríguez C
Teresa García

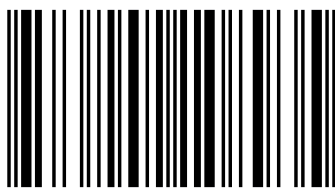
**Determ
contam
muestr
Natur**

Métodos ana
de contami
muestras de

Determinación de contaminantes en muestras de Agua Natural y Residual

En el presente trabajo se proporciona una visión general de los métodos analíticos desarrollados en los últimos 10 años para la determinación de contaminantes emergentes en medios acuáticos. Principalmente, el estudio se centra en la preparación de muestra y en las técnicas instrumentales utilizadas para la detección y cuantificación de los compuestos objeto de estudio. Las técnicas de preparación de muestra no solo incluyen técnicas de extracción clásica, sino que también incluyen técnicas modernas de microextracción, como la microextracción en fase sólida (SPME), la extracción por adsorción sobre una barra agitada (SBSE), la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME), la microextracción por emulsión asistida por ultrasonido (USAEME) o la microextracción mediante adsorbente empaquetado (MEPS). La mayoría de los estudios se centran en minimizar el número de pasos y usar la menor cantidad de disolvente posible. En cuanto a las técnicas instrumentales habitualmente empleadas se encuentran la cromatografía de líquidos (LC) y la cromatografía de gases (GC) acopladas principalmente a la espectrometría de masas en tándem.

La Doctora Rocío Rodríguez Gómez, autora principal de la obra, pertenece al grupo de investigación Química Analítica y Ciencias de la vida de la Universidad de Granada. Junto con el Doctor Alberto Zafrá Gómez, coautor de la obra, poseen una amplia experiencia en el desarrollo de métodos analíticos para la determinación de contaminantes emergentes.



978-620-2-10893-5

editorial académica **española**



Rocío Rodríguez C
Teresa García

**Determ
contam
muestr
Natur**

Métodos ana
de contam
muestras de

Chapter

**BIODEGRADATION OF DRUGS IN
AGRICULTURAL SOIL AMENDED WITH
SEWAGE SLUDGE FROM WASTEWATER
TREATMENT PLANTS. AN OVERVIEW**

*Sergio López Martínez, María Teresa García-Córcoles,
José Luís Vilchez Quero and Alberto Zafra Gómez.*

Research Group of Analytical Chemistry and Life Sciences,
Department of Analytical Chemistry, University of Granada, Campus of
Fuentenueva, Granada, Spain

ABSTRACT

Nowadays, drugs play an essential role in day-to-day life of developed countries and their uses are constantly increasing. This fact carries an important environmental impact that should be taken into account when it comes to human health. Several efforts have been made in order to understand biodegradation of pollutants, mainly heavy metals and pesticides, in both natural and artificial systems. Nevertheless, drugs and their derived metabolites have recently joined the list of emergence contaminants since they are widely spread among natural systems despite their effect over them and human health are unknown. Here, the problem derived from drugs use as well as the routes of entry to the natural systems and the identification of the biodegradation agents that have been isolated and used in different studies are analyzed by means of a bibliographic research on current topics. Residues

E-mail: azafra@ugr.es

- compounds released by decomposing plants. *European Journal of Soil Biology*, 2016, 75, 31–37.
- [89] Gutiérrez, C; Fernández, C; Escuer, M; Campos–Herrera, R; Rodríguez, MEB; Carbonell, G; Martín, JAR. Effect of soil properties, heavy metals and emerging contaminants in the soil nematodes diversity. *Environmental Pollution*, 2016, 213, 184–194.
- [90] Kinney, CA; Furlong, ET; Kolpin, DW; Burkhardt, MR; Zaugg, SD; Werner, SL; Benotti, MJ. Bioaccumulation of drugs and other anthropogenic waste indicators in earthworms from agricultural soil amended with biosolid or swine manure. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(6), 1863–1870.
- [91] Yang, S; Hai, F; Nghiem, L; Price, W; Roddick, F; Moreira, M; Magram, S. Understanding the factors controlling the removal of trace organic contaminants by white–rot fungi and their lignin modifying enzymes: a critical review. *Bioresource Technology*, 2013, 141, 97–108.
- [92] Vasiliadou, IA; Sánchez–Vázquez, R; Molina, R; Martínez, F; Melero, JA; Bautista, LF; Morales, G. Biological removal of pharmaceutical compounds using white–rot fungi with concomitant FAME production of the residual biomass. *Journal of Environmental Management*, 2016, 180, 228–237.
- [93] Zafra–Gómez, A; Juárez–Jiménez, B; Camino–Sánchez, FJ; Cantarero–Malagón, S; Vilchez JL. Biodegradación de contaminantes orgánicos en suelo agrícola enmendado con compost procedente de EDAR urbanas. *Seguridad y Medio Ambiente*, 2014, 136, 24–35.
- [94] Li, J; Ye, Q; Gan, J. Degradation and transformation products of acetaminophen in soil. *Water Research*, 2014, 49, 44–52.

Acknowledgment: to Víctor Manuel Checa López who has carried out the language editon and the revision of the present text.

SCH

Chapter 15

Removal of quinolone antibiotics from wastewaters and sewage sludge

Laura Martín-Pozo, PhD
University of Granada, Granada, Spain

María del Carmen Gómez-Regalado, PhD Student
University of Granada, Granada, Spain

María Teresa García-Córcoles, PhD Student
University of Granada, Granada, Spain

Alberto Zafra-Gómez, PhD
University of Granada, Granada, Spain. E-mail: azafra@ugr.es
Instituto de Investigación Biosanitaria. Ibs.Granada, Spain

Abstract: Antimicrobial agents are one of the most widely used pharmaceuticals in the world. The widespread occurrence of these compounds in the environment is an issue of public concern given the risk they entail for human health and also for terrestrial and aquatic animals. The family of quinolones is a class of synthetic antibiotics, with a potent bactericidal activity, capable of destroying pathogens which are responsible for intestinal, urinary and respiratory infections. However, the total elimination of many of them is difficult due to their powerful sorption properties and poor degradation. Despite the fact that they are detected in low concentrations, that pharmaceuticals cause biological effects at very low doses. Here, wastewater treatment plants play a crucial role in controlling the contamination of antimicrobial agents. This chapter deals a comprehensive overview of the methods for the removal of the target antibiotics from waters, emphasizing the efficiency of removal and the strengths of each methodology.

Key Words: Quinolones; Antibiotics removal; Wastewaters; Sewage Sludge; Sorption; Biodegradation

- Zhang, X., Guo, W., Ngo, H.H., Wen, H., Li, N., Wu, W., 2016. Performance evaluation of powdered activated carbon for removing 28 types of antibiotics from water. *J. Environ. Manage.* 172, 193-200.
- Zheng, X., Xu, S., Wang, Y., Sun, X., Gao, Y., Gao, B., 2018. Enhanced degradation of ciprofloxacin by graphitized mesoporous carbon (GMC)-TiO₂ nanocomposite: strong synergy of adsorption-photocatalysis and antibiotics degradation mechanism. *J. Colloid Interface Sci.* 527, 202-213.
- Zhou, G.J., Ying, G.G., Liu, S., Zhou, L.J., Chen, Z.F., Peng, F.Q., 2014. Simultaneous removal of inorganic and organic compounds in wastewater by freshwater green micro-algae. *Environ. Sci.: Process. Impacts* 16(8), 2018-2027.



Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

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

Determination of bisphenols with estrogenic activity in plastic packaged baby food samples using solid-liquid extraction and clean-up with dispersive sorbents followed by gas chromatography tandem mass spectrometry analysis[☆]



M.T. García-Córcoles^a, M. Cipa^{a,b}, R. Rodríguez-Gómez^a, A. Rivas^c, F. Olea-Serrano^c,
J.L. Vílchez^a, A. Zafra-Gómez^{a,*}

^a Research Group of Analytical Chemistry and Life Sciences, Department of Analytical Chemistry, Campus of Fuentenueva, University of Granada, E-18071 Granada, Spain

^b Department of Chemistry, University of Tirana, St. Bulevardi "Zogu I", 1001 Tirana, Albania

^c Research Group on Nutrition, Diet and Risk Assessment, Department of Nutrition and Food Science, University of Granada, Campus of Cartuja s/n, 18071 Granada, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Endocrine disruptors
Bisphenol
GC-MS/MS
Plastic packaged baby foods

ABSTRACT

Bisphenols (BPs) are a family of chemicals with known endocrine disrupting activity. Bisphenol A (BPA) is the most representative prototype of this group of chemicals. Recently, the use of BPA, a prototype of endocrine disruptors, has been reduced and replaced with structural analogs due to its negative effects on both the environment and consumers. In this work, a new method is presented for the determination of seven BPs, with estrogenic activity in ready-to-eat plastic packaged baby foods. The procedure involves the isolation of the analytes using solid-liquid phase extraction with acetonitrile followed by a clean-up step with a mixture of dispersive-SPE sorbents (C18 and PSA) and magnesium sulphate, to reduce matrix effect from proteins, sugars and lipids. Extraction parameters were optimized using multivariate optimization methods. The compounds were detected and quantified by gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). The limits of quantification were between 0.1 and 1.2 ng g⁻¹ for the studied analytes. The method was validated using matrix-matched calibration and recovery assays with spiked samples. Recovery rates were between 91% and 110% and % RSD was lower than 13% in all cases. The method has been successfully applied for the determination of these endocrine disrupting chemicals (EDCs) in samples of a novel type of food consumed by pre-schoolers. This is the first study to analyze EDCs in plastic packaged foods consumed by this target group.

1. Introduction

Global discussion on the potential long-term risks of dietary exposure to EDCs has been ongoing for the last decade. An EDC is a chemical that mimics and antagonizes the biological function of natural hormones [1–4]. Even at low concentrations, chronic exposure to EDCs represents a toxicological concern. This concern increases when these chemicals are present in food for children [5,6]. The list of EDCs is constantly growing as new chemicals, both synthetic and naturally occurring, are found to have endocrine disrupting properties [7]. Bisphenol analogs, which have two phenolic rings banded together through a bridging carbon or other chemical structures, are EDCs, with the prototype being bisphenol A [2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane,

BPA]. BPA is a chemical produced in large quantities for use primarily in the production of polycarbonate and epoxy resins. This synthetic material is extensively used in food packaging to protect food from contaminants and to keep the integrity of food and beverages [8]. BPA is found in baby bottles, plastic food containers, epoxy coatings in metal cans, kitchenware, and it is also used in manufacturing toys, medical devices and dental composites and sealants [7,9,10]. Through contact with different types of plastic, such as baby bottles, newborns are exposed to BPA (monomers or additives), which can migrate from the plastic into the foodstuff [11–13]. In addition to being especially susceptible due to their growth and development, exposures are often higher in infants due to body weight and the concern about this issue is of high priority [12,14]. Leaching of plasticizers or additives to the food

[☆] In memory of D^ñ. Teresa Córcoles Fuentes.


* Corresponding author.

E-mail address: azafra@ugr.es (A. Zafra-Gómez).

- methodology, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5995–6003.
- [40] Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), (2001).
- [41] A.G. González, M.A. Herrador, A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 227–238.
- [42] Analytical Methods Committee, *Analyst*, 119 (1994), p. 2363.
- [43] Commission Regulation (EU), No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food, *Off. J. Eur. Union* L12 (2011) 1.
- [44] Commission Regulation (EU), No 321/2011 of 1 April 2011 amending regulation (EU) No 10/2011 as regards the restriction of use of bisphenol A in plastic infant feeding bottles, *Off. J. Eur. Union* L87 (2011) 1.



Determination of quinolone residues in raw cow milk. Application of polar stir-bars and ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry

Rocío Rodríguez-Gómez^a, María Teresa García-Córcoles^a, Morsina Çipa^{a,b}, Dolores Barrón^c, Alberto Navalón ^a and Alberto Zafra-Gómez^a

^aResearch Group of Analytical Chemistry and Life Sciences, Department of Analytical Chemistry, Campus of Fuentenueva, University of Granada, Granada, Spain; ^bDepartment of Chemistry, University of Tirana, Tirana, Albania; ^cDepartment of Nutrition, Food Science and Gastronomy, INSA, Torribera Campus, University of Barcelona, Barcelona, Spain

ABSTRACT

Seventeen quinolone antibiotics were determined in cows' milk. A method of high sensitivity, selectivity and accuracy was developed. Accuracy (trueness and precision), linearity, sensitivity, selectivity, decision limit and detection capability were established following the recommendations of the Commission Decision 2002/657/EC and the Food and Drug Administration (FDA) guideline. The use of polar stir-bar sorptive extraction (SBSE) prior to UHPLC-MS/MS analysis is proposed. The variables that affect SBSE were optimised using multivariate optimisation strategies. The ionic strength, the extraction time and the sample volume were studied. pH and stir-bar coating (polydimethylsiloxane, PDMS, and polyethyleneglycol modified silicone, PEG) were studied. PEG showed the best extraction yield at pH 6. For validation, a matrix-matched calibration and a recovery assay were carried out. Limits of quantification from 0.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for nalidixic acid, flumequine and piromidic acid, to 4.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for sarafloxacin were calculated. The precision (% RSD) was lower than 15% for all antibiotics. Recoveries in fortified samples were between 88 and 114%.

ARTICLE HISTORY

Received 9 September 2017
Accepted 13 January 2018

KEYWORDS



Food analysis; quinolone antibiotics; raw cows' milk analysis; polar stir-bar sorptive extraction (SBSE); UHPLC-MS/MS

Introduction


Antibiotics are synthetic or natural agents widely used as antibacterial over the years in human and veterinary medicine (Suh and Lorber 1995). Before 2006, antibiotics were administered at sub-therapeutic doses in food-producing animals as prophylactics or growth promoters (Regulation (EC) No 1831/2003). The improper use of antibiotics can lead to drug residues in edible animal products representing an important risk for consumers. Bacterial resistance, toxicity, liver damage, allergic hypersensitivity and gastrointestinal reactions are some of the problems found (Yao et al. 2015). The EU, with the main objective of protecting consumer health, has established the maximum residue limits (MRLs) in human consumption animal product (Regulation (EC) No 37/2010).

The family of quinolones is a class of synthetic antibiotics, with a potent bactericidal activity,

capable of destroying pathogens which are responsible for intestinal, urinary and respiratory infections in human and animals (Sharma et al. 2009). It is one of the groups of antibiotics most prescribed and used worldwide. It has been reported that quinolones act on bacterial DNA by inhibiting topoisomerase showing a strong and fast antimicrobial effect (Zhang and Cheng 2017). Nalidixic acid was the first quinolone with a clinical application. It was discovered by Lesher et al. in 1962 and flumequine, patented in 1973, was the first fluoroquinolone (Sharma et al. 2009). From then until today, a large number of quinolones have been synthesised based on modifications of the basic structure with the purpose of improving the antimicrobial activity. Quinolones can be classified in four generations, the last refers to fluoroquinolones and the second (e.g. ciprofloxacin) and the third (e.g. moxifloxacin) generations of quinolones are the most commonly used (Andreu

CONTACT Alberto Zafra-Gómez  azafra@ugr.es  Research Group of Analytical Chemistry and Life Sciences, Department of Analytical Chemistry, Campus of Fuentenueva, University of Granada, E-18071 Granada, Spain

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/tfac.

 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2018 Taylor & Francis Group, LLC

- classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Off J Eur Comm*. L15:1–72.
- Robert C, Gillard N, Brasseur PY, Pierret G, Ralet N, Dubois M, Delahaut P. 2013. Rapid multi-residue and multi-class qualitative screening for veterinary drugs in foods of animal origin by UHPLC-MS/MS. *Food Addit Contam*. 30:443–457.
- Rodríguez-Gómez R, Zafra-Gómez A, Camino-Sánchez FJ, Ballesteros O, Navalón A. 2014. Gas chromatography and ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry methods for the determination of endocrine disrupting chemicals in human breast milk after stir-bar sorptive extraction. *J Chromatogr A*. 1349:69–79.
- Ruiz-Viceo JA, Rosales-Conrado N, Guillén-Casla V, Pérez-Arribas LV, León-González ME, Polo-Díez LM. 2012. Fluoroquinolone antibiotic determination in bovine milk using capillary liquid chromatography with diode array and mass spectrometry detection. *J Food Compos Anal*. 28:99–106.
- Saito-Shida S, Sakai T, Nemoto S, Akiyama H. 2017. Quantitative analysis of veterinary drugs in bovine muscle and milk by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Addit Contam*. 34:1153–1161.
- Sharma PC, Jain A, Jain S. 2009. Fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects. *Acta Pol Pharm*. 66:587–604.
- Sismotto M, Paschoal JAR, Teles JA, Rae DR, Reyes FGR. 2014. A simple liquid chromatography coupled to quadrupole time of flight mass spectrometry method for macrolide determination in tilapia fillets. *J Food Compos Anal*. 34:153–162.
- Suh B, Lorber B. 1995. Quinolones. *Med Clin North Am*. 79:869–894.
- U.S. Department of Health and Human Services, FDA. 2001. Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. 1–22.
- WHO Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR). 2016. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine (5th Revision); [accessed 2017 Dec 4]. [http://who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-fifth/en/\(Visited:](http://who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-fifth/en/(Visited:)
- Yan H, Wang H. 2013. Recent development and applications of dispersive liquid-liquid microextraction. *J Chromatogr A*. 1295:1–15.
- Yang K, Wang GN, Liu HZ, Liu J, Wang JP. 2017. Preparation of dual-template molecularly imprinted polymer coated stir bar based on computational simulation for detection of fluoroquinolones in meat. *J Chromatogr B*. 1046:65–72.
- Yao K, Zhang W, Yang L, Gong J, Li L, Jin T, Li C. 2015. Determination of 11 quinolones in bovine milk using immunoaffinity stir bar sorptive microextraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B*. 1003:67–73.
- Zhang Z, Cheng H. 2017. Recent development in sample preparation and analytical techniques for determination of quinolone residues in food products. *Crit Rev Anal Chem*. 47:223–250.

*“Nuestra recompensa se encuentra
en el esfuerzo y no en el resultado.
Un esfuerzo total es una victoria completa”*

Mahatma Gandhi

