



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

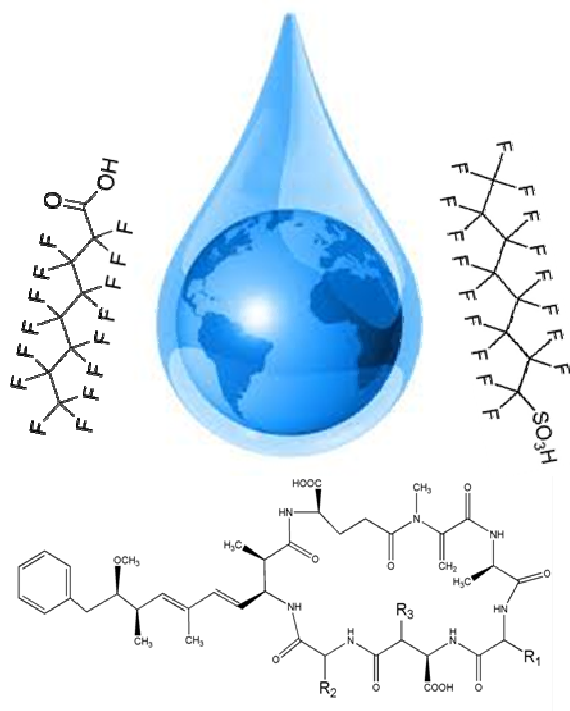
# Espectrometría de masas de alta resolución y en tándem. Análisis de alto rendimiento de contaminantes orgánicos emergentes en agua

Cintia Flores Rubio

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

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

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



**Espectrometría de masas  
de alta resolución y en tándem.**  
Análisis de alto rendimiento de contaminantes  
orgánicos emergentes en agua.

**Cintia Flores Rubio**



**Departament de Química Analítica**

**Facultat de Química**

Programa de Doctorat: Química Analítica del Medi Ambient i la Pol·lució

**ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN Y EN TÁNDEM.  
ANÁLISIS DE ALTO RENDIMIENTO DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS  
EMERGENTES EN AGUA.**

Tesis Doctoral

***Cintia Flores Rubio***

Noviembre 2015



**Departament de Química Analítica**

**Facultat de Química**

Programa de Doctorat: Química Analítica del Medi Ambient i la Pol·lució

**ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN Y EN TÁNDEM.  
ANÁLISIS DE ALTO RENDIMIENTO DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS  
EMERGENTES EN AGUA.**

Memoria presentada por

***Cintia Flores Rubio***

para optar al título de Doctora

por la Universidad de Barcelona

**Director de la Tesis:**

**Dr. Josep Caixach Gamisans**  
Investigador Científico y Director del  
Laboratori d'Espectrometria de Masses/  
Contaminants Orgànics del IDAEA-CSIC

**Tutora de la Tesis:**

**Dra. Encarnación Moyano Morcillo**  
Profesora Titular del Departamento  
de Química Analítica de la Universitat  
de Barcelona

Barcelona, Noviembre del 2015



El Dr. Josep Caixach Gamisans, Investigador Científico y Director del Laboratori d'Espectrometria de Masses/Contaminants Orgànics del Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua (IDAEA) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

#### CERTIFICA

Que la presente memoria, titulada *“Espectrometría de masas de alta resolución y en tándem. Análisis de alto rendimiento de contaminantes orgánicos emergentes en agua”*, ha sido realizada bajo mi dirección por la Sra. Cintia Flores Rubio en el Laboratori d'Espectrometria de Masses/Contaminants Orgànics del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y que todos los resultados presentados son fruto de las experiencias realizadas por la citada doctoranda.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado.

Barcelona, Noviembre del 2015

Dr. Josep Caixach Gamisans





*A mis abuelos, madre y  
a mis dos tesoros Emilio y Laia*



## AGRADECIMIENTOS

Ha llegado el día en que esta tesis ha visto la luz. En el largo camino, ha habido momentos de todo, pero llegado a este punto me gustaría mostrar mi más sincero agradecimiento a todos los que me han apoyado, animado y ayudado y que han enriquecido y han hecho agradable esta aventura. Espero que en este repaso profesional y personal mi mala memoria no me falle. Siempre me ha sido muy difícil plasmar en una hoja en blanco mis pensamientos...

En primer lugar quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. Josep Caixach, la confianza depositada en mí durante todos estos años y la oportunidad brindada conjuntamente con el Dr. Josep Rivera de poder entrar a formar parte del grupo del Laboratori d'Espectrometria de Masses. En este grupo guiada por el Dr. Caixach me he formado en el fascinante mundo de la Espectrometría de Masas, el análisis medio ambiental y los contaminantes orgánicos.

También quiero agradecer a mi tutora, la Dra. Encarnación Moyano, el estar siempre pendiente de que esta tesis llegará a buen puerto, su colaboración en la redacción de esta memoria, su apoyo y ánimo, sus buenos consejos y acertados comentarios y su afable actitud en todo momento.

Parte de este trabajo se ha realizado en el marco de convenios de colaboración y proyectos de investigación con organismos públicos y empresas. Por ello quiero agradecer la colaboración, soporte económico y suministro de muestras a: Aigües de Barcelona; Aigües de Girona, Salt i Sarrià Ter; Canal de Isabel II; Laboratori Coma; Agència Catalana de l'Aigua; Centro de Estudios Hidrográficos del CEDEX; y, a los Proyectos SOSTAQUA y ALARMTOX. Muy especialmente a Ll. Matia, M. Paraira, J. Martin, R. M<sup>a</sup> Boleda, A. M<sup>a</sup> Alonso, L. Villén, M. Campàs, J.-L. Marty, V. Dumont y D. Garibo por las interesantes reuniones, visitas y viajes.

Al Dr. A. Quesada, Dr. F. Cobo, Dr. E. Costas, y Dr. A. Bueres agradecer el suministro de muestras de floraciones de cianobacterias de algunos embalses españoles.

A la Dra. Olga Jáuregui y al Dr. Isidre Casals dels Serveis Científico-técnicos de la Universitat de Barcelona en el Parc Científic por guiarme en mi iniciación en el análisis mediante Espectrometría de Masas en tándem y por hacerme sentir como en casa en su laboratorio. Al Dr. J. A. Allué (Araclon Biotech, Zaragoza) y a la Dra. I. Fernández (Universidad de Barcelona) por su ayuda y soporte científico-técnico en el análisis MALDI-TOF-MS.

Al Dr. F. Ventura por su ayuda y consejos en la redacción de artículos. Siempre nos tienes al día de la literatura científica publicada más recientemente.

A todos mis compañeros del laboratorio, Óscar, Julià, Arantxa, Marta, Montse, Núria Soto, Núria Cortés, Stefania, Carles, Elisenda, Bárbara, Marc, María, Mónica Barco, Mónica Calvo, Beth, Gene, Miquel Àngel, Jordi Sauló, Jordi Parera, Karell, Joan, Laura, Esteban y Manoli. Y espero no dejarme a nadie, son ya tantos años en el CSIC.... Gracias por hacerme tan agradable el día a día y por vuestra ayuda siempre que lo he solicitado. Muy especialmente: Montse t'agraixo de tot cor l'atenció mostrada; Marta ets molt especial; Arantxa y Núria Cortés gràcies per l'ajuda; Núria Soto, agraderce siempre tu buena predisposición y amabilidad. Óscar y Julià, gracias por vuestro apoyo y cariño y en definitiva por poder contar siempre con vosotros, la amistad surgida en estos años ha sido un regalo.

Gracias a todos los familiares y amigos que durante este tiempo se han interesado por el desarrollo de esta tesis y me han apoyado.

A Abigail por tenerme en tan alta estima, por sus palabras de aliento, por cuidarme y por escucharme. A Mar porque a pesar del tiempo y la distancia seguimos manteniendo el contacto y la amistad. A Óscar, Merçè, Martí, Berta, Julià, Paqui, Alex, y Jùlia por esas barbacoas, casas rurales, salidas y risas. Y a mis compis de Químicas, las Montses, Eli y Ana, va por vosotras!

A mis abuelos y lo que significaría este momento para ellos. Nada habría podido ser sin vosotros, cuanto os echo de menos. A mi madre que me dio la vida y tan orgullosa se siente siempre de mí. A mis padrinos y primos (Juan, Nelida, Ana, David, Miguel, Vanesa y mi sobrino Miquel...un dulce!) por tantas palabras amables y momentos compartidos.

A mi familia política (Sra. Concha, Sandra, Óscar, Conchi, Alberto, Pili, Satur, Sonia, David, Noelia, Joaquín y los peques más guapos, Lucía, Alba, Paula, Alex, Héctor y...Valentina) por su gran apoyo, ayuda y hacerme sentir una más de la familia.

Y finalmente, y lo más importante a Emi y Laia, mis *amores*. A los que en primer lugar tengo que pedir disculpas por tantas ausencias, en especial en los últimos meses de escritura de esta memoria. A Emi mi media naranja, por apoyarme y acompañarme siempre en todo lo que me propongo, por la paciencia y por confiar en mí. A Laia que me llena de felicidad cada día, me ilumina el corazón y alegra cada despertar. Os quiero y por fin os puedo dedicar esta tesis!!!!

## ÍNDICE

ÍNDICE .....	i
RESUMEN .....	iii
ACRÓNIMOS .....	v
OBJETIVO Y ESTRUCTURA DE LA TESIS .....	ix
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Contaminantes emergentes.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2.Sustancias perfluoroalquiladas y polifluoroalquiladas .....</b>	<b>7</b>
1.2.1. Tipos, estructuras y propiedades físico-químicas.....	7
1.2.2. Historia de su producción y aplicaciones.....	12
1.2.3. Presencia en el medio ambiente.....	17
1.2.4. Exposición humana y toxicidad.....	19
1.2.5. Normativa .....	26
1.2.6. Métodos de análisis .....	31
<b>1.3.Microcistinas .....</b>	<b>34</b>
1.3.1. Algas y cianobacterias.....	34
1.3.2. Cianotoxinas.....	37
1.3.3. Variantes de microcistinas .....	38
1.3.4. Estructura, propiedades físico-químicas y estabilidad .....	46
1.3.5. Toxicidad, vías de exposición y efectos sobre la salud .....	49
1.3.6. Normativa... ..	52
1.3.7. Métodos de análisis .....	56
<b>1.4. Contaminación hídrica.....</b>	<b>62</b>
<b>2. DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS DE ALTO RENDIMIENTO MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS .....</b>	<b>69</b>
<b>2.1. Introducción.....</b>	<b>71</b>
<b>2.2. Estándares y reactivos .....</b>	<b>95</b>
<b>2.3. Metodologías analíticas.....</b>	<b>96</b>
2.3.1. Pre-tratamiento .....	96
2.3.2. Tratamiento: extracción y purificación.....	99
2.3.3. Análisis instrumental.....	101
<b>2.4. Caracterización de compuestos orgánicos emergentes por espectrometría de masas .....</b>	<b>108</b>
2.4.1. ESI y MALDI .....	109
2.4.2. Estudios de fragmentación .....	119

2.5.	<b>Análisis dirigido mediante SPE en línea a LC-ESI-MS/MS</b> .....	131
2.5.1.	Ácidos perfluoroalquilados (PFAAs) .....	134
2.5.2.	Microcistinas.....	141
2.6.	<b>Desarrollo de metodologías de <i>screening</i> basadas en HRMS para la determinación de cianotoxinas</b> .....	143
2.7.	<b>Comparación de técnicas MS</b> .....	151
2.8.	<b>Conclusiones</b> .....	154
3.	<b>ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE PFAAs EN AGUAS SUPERFICIALES Y SUBTERRÁNEAS Y SU COMPORTAMIENTO EN DIFERENTES TRATAMIENTOS DE POTABILIZACIÓN</b> .....	157
3.1.	<b>Introducción</b> .....	159
3.2.	<b>Análisis de aguas superficiales, subterráneas y tratadas</b> .....	168
3.2.1.	Presencia de PFOS y PFOA en aguas superficiales y estudio de su comportamiento en una ETAP .....	171
3.2.2.	Análisis de PFAAs de cadena corta en aguas superficiales y subterráneas y estudio de su comportamiento en una ETAP .....	180
3.3	<b>Conclusiones</b> .....	197
4.	<b>ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE MICROCISTINAS EN AGUAS SUPERFICIALES Y TRATADAS</b> .....	199
4.1.	<b>Introducción</b> .....	201
4.2.	<b>Análisis de muestras de agua, cultivos y materiales de referencia</b> .....	209
4.2.1.	Toma de muestra.....	209
4.2.2.	Análisis cualitativo y cuantitativo de microcistinas por espectrometría de masas .....	211
4.2.3.	Monitorización de la presencia de microcistinas en aguas superficiales y tratadas en una ETAP.....	213
4.2.4.	Estudio de la presencia de microcistinas en diferentes embalses españoles.....	218
4.2.5.	Estudio de la presencia de microcistinas en cultivos y materiales de referencia.....	271
4.3.	<b>Conclusiones</b> .....	289
	<b>CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	291
	<b>REFERENCIAS</b> .....	297
	<b>ANEXO A. Standard Operation Procedure “Analysis of microcystins by on-line solid phase extraction-liquid chromatography tandem mass spectrometry” in CYANOCOST - Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis</b> .....	347
	<b>ANEXO B. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS RELACIONADOS CON LA TESIS</b> .....	361

## RESUMEN

En los últimos años, los contaminantes emergentes (ECs) están recibiendo una creciente atención debido a los efectos nocivos que suponen para los organismos vivos y al riesgo ambiental que representan. La consideración de un contaminante como emergente es difícil de establecer, porque lo que está emergiendo es una cuestión de perspectiva. En resumen, como EC se entiende todo contaminante previamente desconocido o no reconocido como tal, cuya presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva, pero sí la preocupación por las posibles consecuencias de la misma. En algunos casos, la liberación de estos ECs en el medio ambiente puede ser que se haya producido durante un largo tiempo, pero que no se haya reconocido hasta que se han desarrollado nuevos métodos de detección. Existen una gran cantidad de productos considerados como ECs presentes en el medio ambiente acuático, que cubren una amplia gama de sustancias químicas, incluyendo compuestos antropogénicos como los ácidos perfluoroalquilados (PFAAs) y de origen natural como las cianotoxinas (microcistinas, MCs), objeto de estudio de la presente tesis.

Los PFAAs son una familia de contaminantes orgánicos considerados como emergentes, persistentes y bioacumulables. Se ha demostrado que se transportan a largas distancias, se biomagnifican en la cadena trófica y pueden tener efectos nocivos inmediatos o a largo plazo sobre el medio ambiente y la salud humana. Por su parte, las MCs se producen como metabolitos secundarios en el interior de las células de las cianobacterias y están consideradas como hepatotóxicas. En las últimas décadas, la formación masiva de floraciones de cianobacterias está emergiendo a nivel global y cada vez con mayor frecuencia. Ambas familias de compuestos están incluidas en diferentes normativas, convenios internacionales y son objeto de programas de vigilancia a nivel global.

Debido a que la información actual que se dispone relativa a la presencia y eliminación en el medio acuático de estas dos familias de ECs es aun limitada, es de interés disponer de métodos de análisis rápidos y fiables que permitan su determinación con una elevada sensibilidad y selectividad. En este sentido, en esta tesis se han desarrollado metodologías analíticas de alto rendimiento, sensibles, selectivas y robustas para el análisis en agua de las dos familias de ECs en estudio. Por un lado, se han utilizado técnicas de extracción en fase sólida (SPE) en línea, inyección directa e ionización por desorción por láser y asistida por la matriz (MALDI). Estas técnicas han permitido el análisis rápido, automatizado y sencillo, minimizando el tratamiento de la muestra y evitando posibles fuentes externas de contaminación, todo ello mejorando la eficiencia económica del análisis. Por otro lado, se ha estudiado, la potencialidad de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) y de alta resolución (HRMS) mediante métodos de LC-ESI-MS/MS (triple cuadrupolo, QqQ), MALDI-TOF/TOF y LC-ESI-HRMS (Orbitrap-Exactive HCD) para la identificación y cuantificación fiable de los analitos. Los diferentes métodos desarrollados se han combinado y comparado poniendo de manifiesto sus ventajas, desventajas y su complementariedad.



La integración de la información proporcionada por las fuentes de ionización electroesprai (ESI) y MALDI, los modos de ionización positivo y negativo, la alta resolución y la medida de masa exacta y los estudios de fragmentación han demostrado ser muy útiles para el análisis de ECs. Para una adecuada identificación, se han propuesto protocolos exhaustivos de confirmación y se ha aplicado el concepto de puntos de identificación (IPs) descrito en la Decisión 2002/657/CE, minimizando la probabilidad de falsos positivos y negativos.

Los métodos *non-target* con los analizadores TOF/TOF y Orbitrap son capaces de la determinación simultánea de cualquier compuesto en HRMS y del análisis retrospectivo de las muestras sin la necesidad de re-inyectarlas. Destacar que en esta tesis se ha realizado por primera vez el análisis directo de la biomasa de cianobacterias sin extracción previa por MALDI-TOF/TOF.

Los métodos desarrollados se han aplicado al estudio de la presencia de los analitos en muestras acuosas. Por un lado, se ha estudiado la presencia de PFAAs en aguas superficiales, subterráneas y tratadas y su eliminación en una estación de tratamiento de aguas potables (ETAP) que combina tratamientos convencionales y avanzados en líneas paralelas, lo que ha permitido el estudio de ambos tipos de tratamientos simultáneamente y a escala real. Los tratamientos convencionales como la pre-oxidación, sedimentación, filtración con arena y ozonización han tenido un efecto irrelevante en estos compuestos. En cambio, los niveles de PFAAs en el agua tratada han disminuido después de la filtración con carbón y del tratamiento de ósmosis inversa, que han resultado efectivos para la eliminación de los PFAAs en estudio.

Por otro lado, se ha estudiado la presencia de MCs en aguas superficiales y tratadas y se han caracterizado diversos cultivos y materiales de referencia de cianobacterias. Se ha trabajado con la muestra total de agua, analizando la fracción disuelta y sestónica independientemente y se han descrito las cianobacterias y variantes de MCs presentes. Las metodologías desarrolladas mediante HRMS y MS/MS y los estudios de fragmentación han demostrado su aplicabilidad para la identificación de MCs y péptidos relacionados. La mayoría de los embalses estudiados están destinados a riego, agua potable y recreo. La presencia de las distintas floraciones y el potencial de las cianobacterias tóxicas en los embalses estudiados indican la necesidad de programas de vigilancia para evitar el riesgo para la salud humana y los animales. Además, sería conveniente utilizar *a priori* mecanismos de prevención para impedir la proliferación de cianobacterias en los embalses. También se muestran los resultados de la monitorización de la presencia de MCs a la entrada y salida de una ETAP. Durante los años en que se ha realizado el control, no se ha observado la presencia de proliferación masiva de cianobacterias y el tratamiento realizado en la ETAP ha sido efectivo para la eliminación de las MCs a niveles traza ( $< 1 \mu\text{g/L}$ ). Por último, la caracterización de cultivos de cianobacterias permite establecer las bases del desarrollo tecnológico y la producción de estándares analíticos de toxinas y materiales de referencia para la cuantificación e identificación individual de variantes de MCs y su utilización en estudios de validación y ejercicios de intercomparación.

## ACRÓNIMOS

Adda:	Ácido (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4E,6E-dienóico
AIF:	<i>All Ion Fragmentation</i>
AMM:	Medida de masa exacta ( <i>Accurate Mass Measurement</i> )
APCI:	Ionización química a presión atmosférica
APPI:	Fotoionización a presión atmosférica
Arg:	Arginina
CDI:	Ingesta diaria crónica
CE:	Electroforesis capilar; energía de colisión
CID:	Disociación inducida por colisión
CRM:	Material de referencia certificado
CYN:	Cilindrospermopsina
EC:	Contaminante emergente
EDAR:	Estación de tratamiento de agua residual
ELIPA:	Ensayo competitivo de enzima ligada a inmunopartículas
ELISA:	Inmunoensayo de adsorción ligado a enzimas ( <i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i> )
ESI:	Ionización por electrospray
ETAP:	Estación de tratamiento de agua potable
FAB:	Bombardeo con átomos rápidos ( <i>Fast Atom Bombardment</i> )
FASAs:	Sulfonamidas perfluoroalquiladas
FASEs:	Sulfonamidoetanoles perfluoroalquilados
FD:	Detección por fluorescencia
FT-ICR:	Resonancia ciclotrónica iónica con transformada de Fourier
FTOHs:	Alcoholes fluorotelómeros
FTS:	Fluorotelómeros sulfonatos
FWHM:	Resolución al 50% del valle ( <i>Full Width at Half Maximum</i> )

GAC:	Carbón activado granulado
GC:	Cromatografía de gases
GC-MS:	Cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas
HCD:	Disociación por colisión de alta energía
HDPE:	Polietileno de alta densidad
H-ESI:	Ionización por electroespray asistido térmicamente
HILIC:	Cromatografía de líquidos de interacción hidrofílica ( <i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i> )
HPLC:	Cromatografía de líquidos de alta eficacia
HR:	Alta resolución
HRMS:	Espectrometría de masas de alta resolución
H-SRM:	<i>High-Selected Reaction Monitoring</i>
IPs:	Puntos de identificación
ISO:	<i>International Standardisation Organisation</i>
IT:	Trampa de iones
LC:	Cromatografía de líquidos
LC-ESI-HRMS:	Cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución con ionización por electroespray
LC-ESI-MS/MS:	Cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas en tándem con ionización por electroespray
LC-HRMS:	Cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución
LC-MS:	Cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas
LC-MS/MS:	Cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas en tándem
LC <sub>50</sub> /LD <sub>50</sub> :	Concentración/Dosis letal que causa la mortalidad del 50% de la población expuesta
LIT:	Trampa de iones lineal
LLE:	Extracción líquido-líquido
LOD:	Límite de detección
LOQ:	Límite de cuantificación

LR:	Baja resolución
LRMS:	Espectrometría de masas de baja resolución
MALDI:	Ionización /desorción mediante láser asistida por matriz ( <i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation</i> )
MALDI-TOF:	Ionización /desorción mediante láser asistida por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo
MALDI-TOF/TOF:	Ionización /desorción mediante láser asistida por matriz acoplada a un analizador híbrido de tiempo de vuelo/tiempo de vuelo
MC:	Microcistina
MIP:	Polímero de impresión molecular ( <i>Molecularly Imprinted Polymer</i> )
MP:	Partículas magnéticas
MS:	Espectrometría de masas
MS <sup>n</sup> :	Espectrometría de masas en tándem en múltiples etapas
MS/MS:	Espectrometría de masas en tándem
NOAEL:	<i>No observable adverse effect level</i>
NOM:	Materia orgánica natural
OMS:	Organización mundial de la salud
PCC:	<i>Pasteur Culture Collection</i>
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PEC/PNEC:	Concentración ambiental prevista / Concentración ambiental prevista sin efecto
PFAAs:	Ácidos perfluoroalquilados
PAPs:	Esteres polifluoroalquilados de ácido fosfónico
PFASs:	Sustancias perfluoroalquiladas y polifluoroalquiladas
PFBA:	Ácido carboxílico perfluorobutanoico
PFBS:	Ácido sulfónico de perfluorobutano
PFCAs:	Ácidos carboxílicos perfluoroalquilados
PFDA:	Ácido carboxílico perfluorodecanoico
PFHpA:	Ácido carboxílico perfluoroheptanoico
PFHxA:	Ácido carboxílico perfluorohexanoico

PFHxS:	Ácido sulfónico de perfluorobutano
PFNA:	Ácido carboxílico perfluorononaico
PFOA:	Ácido carboxílico perfluorooctanoico
PFOS:	Ácido sulfónico de perfluorobutano
PFOSA/FOSA:	Perfluorooctanosulfonamidas
PFPA:	Ácidos fosfónicos perfluorados
PFPeA:	Ácido carboxílico perfluoropentanoico
PFPrA:	Ácido carboxílico perfluoropropanoico
PFSAs:	Ácidos sulfónicos perfluoroalquilados
PPIA:	Ensayo/test de inhibición de proteína fosfatasa
PTFE:	Politetrafluoroetileno
Q:	Cuadrupolo
QqQ:	Triple cuadrupolo
RMN:	Resonancia magnética nuclear
RSD:	Desviación estándar relativa
RO:	Ósmosis inversa ( <i>Reverse Osmosis</i> )
SIR/SIM:	Registro selectivo de iones ( <i>Selected Ion Recording/Monitoring</i> )
SOP:	Procedimiento normalizado de trabajo ( <i>Standard Operation Procedure</i> )
SPE:	Extracción en fase sólida
SRM:	Registro selectivo de transiciones/reacciones ( <i>Selected Reaction Monitoring</i> )
TDI:	Ingesta diaria tolerable
TIC:	<i>Total Ion Current</i>
TOF:	Tiempo de vuelo
TOF/TOF:	Analizador híbrido de tiempo de vuelo/tiempo de vuelo
UHPLC:	Cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia
UV(/Vis):	Ultravioleta(/Visible)

## OBJETIVO Y ESTRUCTURA DE LA TESIS

El objetivo principal de esta tesis es el estudio de la potencialidad de técnicas de identificación y caracterización estructural recientes basadas en la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) y la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) para el análisis de contaminantes orgánicos emergentes en agua en combinación con la utilización de métodos de análisis de alto rendimiento como la extracción en fase sólida (SPE) en línea, la inyección directa y la ionización por desorción por láser y asistida por la matriz (MALDI). Para ello, se ha trabajado con dos familias de compuestos emergentes: los ácidos perfluoroalquilados (PFAAs) antropogénicos; y unos metabolitos tóxicos de cianobacterias de origen natural que incluyen más de 90 variantes diferentes, las microcistinas (MCs).

Los objetivos específicos de esta tesis son:

Establecer metodologías analíticas rápidas, sensibles y selectivas para el análisis de los contaminantes orgánicos emergentes en estudio basadas en MS/MS y HRMS:

- ◆ Desarrollar, optimizar y validar metodologías para el análisis dirigido (*target*) de los contaminantes orgánicos emergentes en estudio mediante SPE en línea a LC-ESI-MS/MS.
- ◆ Desarrollar, optimizar y validar una estrategia integrada de *screening* basada en HRMS para la determinación rápida y precisa de MCs y péptidos relacionados en muestras naturales (fracción sestónica y acuosa) por LC-ESI-HRMS y MALDI-TOF/TOF.

Aplicar las metodologías analíticas optimizadas al análisis de muestras de agua:

- ◆ Estudio de la presencia de PFAAs en aguas superficiales y de su eliminación en una planta de tratamiento de agua potable (ETAP), que combina tratamientos convencionales y avanzados en líneas paralelas.
- ◆ Monitorización de la presencia de MCs en aguas superficiales y tratadas en una ETAP.
- ◆ Estudio de la presencia de MCs en diferentes embalses españoles, con la finalidad de realizar un inventario de las toxinas presentes en cada embalse.
- ◆ Caracterización de cultivos y materiales de referencia de cianobacterias.

La tesis se ha estructurado en cinco capítulos. El **capítulo 1** consiste en una breve introducción sobre los contaminantes orgánicos emergentes, las dos familias de compuestos en estudio, los PFAAs y las MCs, así como de la contaminación en el medio acuático, matriz en estudio. En el **capítulo 2** se muestra la metodología analítica que se ha utilizado para el análisis en agua de PFAAs y MCs. Los contaminantes orgánicos emergentes en estudio se han caracterizado por espectrometría de masas con

ionización por electrospray y MALDI y mediante estudios de fragmentación por disociación inducida por colisión (CID). Por un lado, se presentan metodologías de alto rendimiento para el análisis de muestra acuosas. Y, también se pone de manifiesto la disyuntiva entre la utilización de metodologías para el análisis dirigido (*target*) de contaminantes orgánicos emergentes basadas en MS/MS o metodologías de *screening* (*non-target*) mediante HRMS. Se han desarrollado, optimizado y validado metodologías de ambos tipos y se han comparado sus resultados. En el **capítulo 3** se estudia la presencia de PFAAs en aguas superficiales y su comportamiento en diferentes tratamientos de potabilización. En una primera etapa se utilizó un método de extracción líquido-líquido (LLE) para el análisis de los dos PFAAs más ampliamente determinados en agua, el ácido perfluorooctanoico (PFOA) y el perfluorooctanosulfonato (PFOS) por LC-ESI-MS/MS. En una segunda fase, se amplió la lista de PFAAs en estudio, 8 ácidos carboxílicos perfluoroalquilados (PFCAs, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>) y 3 ácidos sulfónicos perfluoroalquilados (PFSAs, C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub> y C<sub>8</sub>) en total, y se actualizó el método de extracción, pasando de una LLE a una SPE en línea. En el **capítulo 4** se presenta el trabajo realizado sobre la presencia de MCs en aguas superficiales de diferentes embalses españoles y algunos estudios de caracterización de cultivos y materiales de referencia de cianobacterias. También se muestran los resultados de la monitorización de la presencia de MCs a la entrada y salida de una ETAP. Finalmente, en el **capítulo 5**, se resumen las principales conclusiones del trabajo presentado en esta tesis.







## 1.1. Contaminantes emergentes

El foco principal en el impacto que causan los productos químicos en el medio ambiente, hasta hace muy poco, estaba dirigido a los nutrientes, metales pesados, ingredientes activos "tradicionales" de productos como plaguicidas y contaminantes orgánicos persistentes. Sin embargo, en los últimos años, existe una creciente preocupación por los riesgos ambientales de los llamados "contaminantes emergentes" (ECs). Hasta el momento, existe un listado a nivel europeo de más de 700 ECs, sus metabolitos y productos de transformación, que están presentes en el medio ambiente acuático ([www.norman-network.net](http://www.norman-network.net)).

El diccionario define "emergente" como la descripción de algo que está en proceso creciente o es prometedor y capaz (que nace, sale y tiene principio de otra cosa). La definición de un contaminante como emergente es difícil de establecer, porque lo que está emergiendo es una cuestión de perspectiva, así como de sincronización (Alvarez-Cohen y Sedlak, 2003; Field y col., 2006). Como EC se entiende todo contaminante previamente desconocido o no reconocido como tal, cuya presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva, pero sí la preocupación por las posibles consecuencias de la misma, por lo que también se habla de contaminante de interés emergente (*emerging concern*). No hay una definición internacionalmente aceptada para un EC, pero diferentes regiones o sectores han propuesto una serie de definiciones que se exponen a continuación. Algunas de estas definiciones podrían aplicarse a muchos de los contaminantes ambientales que hemos estado estudiando durante muchos años.

La *Agencia de Protección Medioambiental* de los EEUU (USEPA) define a los ECs como nuevos productos químicos sin estatus reglamentario que tienen un impacto sobre el medio ambiente y la salud humana poco conocido.

"Sustancias que se han detectado en el medio ambiente, pero que actualmente no están incluidas en los programas de vigilancia de rutina de la UE y cuyo destino, comportamiento y efectos (eco)-toxicológicos no se conocen bien" (definición de la red NORMAN de la Unión Europea).

"Esos productos químicos para los que ha sido recientemente demostrado que se encuentran ampliamente distribuidos en los recursos hídricos e identificados como un riesgo potencial para la salud pública o ambiental, pero que sin embargo, de los que no existen datos suficientes para determinar su riesgo" (definición del Consorcio para la Investigación y Educación sobre los ECs).

"Un producto químico o material introducido en el medio ambiente que presenta un potencial inaceptable para la salud humana o un elevado riesgo ambiental, y, o bien no cumple los estándares de salud humana revisados por pares reguladores o las normas reguladoras están evolucionando debido a la ciencia, la capacidad de detección, o nuevas vías"(definición de Material Químico de Gestión de Riesgos).

"Cualquier sustancia química sintética o de origen natural o de cualquier microorganismo que no se controla habitualmente en el medio ambiente, pero tiene el potencial de entrar en él y causar efectos ecológicos y/o sobre la salud humana adversos conocidos o sospechosos. En algunos casos, la liberación de los ECs químicos o microbianos en el medio ambiente puede ser que se haya producido durante un largo tiempo, pero que no se haya reconocido hasta que se desarrollaron nuevos métodos de detección. En otros casos, la síntesis de nuevas sustancias químicas o cambios en el uso y disposición de productos químicos existentes puede crear nuevas fuentes de ECs" (definición de la *US Geological Survey*).

Una propiedad característica de estos grupos de contaminantes es que no necesitan estar constantemente en el ambiente (ser persistentes) para causar efectos negativos, puesto que en algunos casos sus altas tasas de transformación/remoción puede ser compensada por su introducción continua en el ambiente.

Una vez que una sustancia se considera un EC, la longevidad de su condición de EC está determinado en gran medida, y razonadamente, por si el agente químico o biológico es persistente y/o tiene potencialmente efectos tóxicos en humanos o (eco)-toxicológicos. Por otra parte, nuevas observaciones o informaciones sobre los contaminantes pueden propiciar que un contaminante ya conocido se designe como contaminante (re)-emergente (por ejemplo, el carácter de disruptor endocrino del nonilfenol). Desafortunadamente, los avances analíticos que provocan la atención pública sobre contaminantes, no ofrecen las herramientas para conocer si el contaminante recién detectado es de interés (eco)-toxicológico. La evaluación de los efectos de estos contaminantes en el medio ambiente sigue siendo un desafío que requiere tiempo y recursos. Por lo tanto, no es sorprendente que, para muchos de los miles de productos químicos que se producen o ya hay en el mercado y los muchos de nuevos microorganismos que se están descubriendo, los avances en nuestra comprensión de sus propiedades (eco)-toxicológicas son a menudo lamentablemente de evolución lenta y pueden muchas veces quedarse por detrás de la demanda de información necesaria. Como resultado, un contaminante puede ser considerado durante muchos años como emergente.

Existen una gran cantidad de tipos de productos considerados como EC y cubren una amplia gama de familias de compuestos químicos, incluyendo los compuestos antropogénicos perfluorados y las toxinas (microcistinas) de origen natural, objeto de estudio en la presente tesis. Según su origen, los ECs se han clasificado en más de 20 categorías diferentes ([www.norman-network.net](http://www.norman-network.net)). Las clases más destacadas son: fármacos (de aplicación en humanos o en ganadería), productos de cuidado y de higiene personal, drogas de abuso, plaguicidas (agricultura), productos de desinfección (urbanos, industria), sustancias perfluoradas, hormonas, pinturas y recubrimientos, productos de uso para la conservación de la madera y químicos industriales. En los últimos 5-7 años se ha tomado también conciencia de una nueva clase de ECs: los nanomateriales. Por último, algunos ECs, tales como las toxinas naturales y los productos de degradación de sustancias químicas artificiales también se pueden formar en el medio natural por los animales, plantas y microorganismos.

Como se describirá más detalladamente en el apartado de contaminación hídrica, la principal fuente de entrada de estos compuestos en el medio ambiente acuático son las aguas residuales de tipo doméstico e industrial, los residuos de las plantas de tratamiento, los efluentes hospitalarios y los tanques sépticos, aunque también cabe destacar el papel de la agricultura y ganadería como fuentes de contaminación difusa de pesticidas y antibióticos, respectivamente (Geissen y col., 2015). En la mayoría de los casos su eliminación en las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs) convencionales no es completa. Actualmente existen nuevas tecnologías de mayor eficacia para su eliminación, desde las más conocidas como son los birreactores de membrana a otras de mayor coste como la osmosis inversa, la microfiltración o los procesos de oxidación avanzada. Sin embargo, la aplicación de este tipo de tecnologías supone un alto coste en el tratamiento del agua que aún pocas empresas gestoras de servicios del agua están dispuestas a asumir. En ocasiones, con estas tecnologías no se alcanza una mineralización completa del contaminante. En consecuencia, se pueden acumular al final del proceso productos de transformación persistentes que en algunos casos pueden ser más perjudiciales que los compuestos de partida. Estos compuestos se encuentran diseminados en el medio ambiente y se han detectado también en aguas superficiales, en fuentes de abastecimiento de agua, aguas subterráneas e incluso en el agua potable. En la columna de agua, los compuestos pueden ser degradados en condiciones abióticas vía fotodegradación y/o hidrólisis o bióticamente por organismos aeróbicos o anaeróbicos. Las sustancias con un alto poder de absorción pueden llevar a cabo un proceso de partición con el lecho de sedimento.

En vista, a menudo del impacto potencial de estas sustancias en la vida acuática y la salud humana, la falta de conocimiento respecto a su comportamiento en el medio ambiente y la deficiencia en las técnicas de análisis y muestreo, se requiere una acción urgente a múltiples niveles. Se necesitan nuevos mecanismos para realizar un control adecuado y obtener los niveles de concentración de los ECs más relevantes para la valoración de riesgos a lo largo de las diferentes cuencas de los ríos. En la Unión Europea, se ha elaborado una lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión en el ámbito de la política de aguas (Decisión Ejecución UE 2015/495) de los ECs a partir de los programas nacionales de vigilancia, debido a que es un requisito de la Directiva Marco del Agua (Directiva, 2000; Directiva 2008/105/CE). Esta lista representa las sustancias emergentes que requieren una atención adicional debido a su alta frecuencia de aparición, el riesgo potencial para la salud humana y/o de la vida acuática, y/o por la falta de datos y técnicas analíticas fiables. Anteriormente, la WFD (Directiva, 2000) ya presentó 33 sustancias o clases de compuestos designadas como la lista de contaminantes prioritarios para la UE. Por su parte, la USEPA propone 40 compuestos (38 químicos y 2 virus) en una Lista de Contaminantes Candidatos (UCMR3; USEPA, 2011) para el agua potable, con el objetivo de recoger datos sobre la presencia de estos compuestos y de esta manera ayudar en el desarrollo de futuras regulaciones, en caso de ser necesario. Como gestionar estas sustancias sigue siendo un desafío, con el objetivo de mantener los costes de control a niveles razonables, cualquier aproximación o mecanismo se suele ajustar a un número limitado de compuestos.

Además, en la actualidad, los organismos reguladores suelen actuar respecto a la identificación de los contaminantes y abordar la preocupación pública en base a una perspectiva reactiva, en lugar de proactiva. La USEPA ha promovido un programa voluntario de Alto Volumen de Producción (*HPV Challenge Program*). En EE.UU., existen pocos, si los hubiere, vehículos de financiación competitivos para el descubrimiento de nuevos contaminantes. Además, no existe un plan coherente para detectar de forma proactiva e identificar todos los contaminantes de potencial preocupación. En cambio, tanto en Canadá como en la Unión Europea (UE) se están desarrollando activamente planes para poder alcanzar una posición de anticipación ante las cuestiones ambientales futuras. Siguiendo la aproximación proactiva del Registro, Evaluación, y Autorización de Productos Químicos (REACH) de la UE, es necesario que los fabricantes de sustancias y formulaciones registren y proporcionen datos prescritos (eco)-toxicológicos para todas las sustancias con un volumen > 1 tonelada métrica por año.

En la pasada década, con el rápido incremento en el número de publicaciones científicas referentes al impacto de los ECs en el medio ambiente y la aparición de numerosos artículos en la prensa de todo el mundo, se ha puesto de manifiesto el creciente interés sobre los ECs y sus riesgos.

Normalmente, los datos sobre ECs son escasos y su detección en el medio ha sido posible sólo recientemente gracias al desarrollo de tecnologías analíticas nuevas y más sensibles (Richardson, 2008, 2012; Richardson y Ternes, 2014). La determinación de ECs en el medio ambiente puede ser un reto difícil ya que normalmente se producen en el medio ambiente a niveles muy bajos y, para muchos ECs, no se dispone de materiales de referencia y patrones certificados, que son necesarios para validar los métodos analíticos. El análisis es también a veces lento y costoso y requiere acceso a equipos altamente sofisticados. Avances analíticos, como la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), en la actualidad permiten el análisis de rutina de productos químicos orgánicos polares que no podían ser observados con los enfoques de cromatografía de gases (CG) que llevaron al descubrimiento anterior de muchos contaminantes orgánicos persistentes. Por lo tanto, algunos métodos robustos y fiables ya están disponibles para detectar muchos de estos ECs (por ejemplo, sustancias perfluoradas, productos farmacéuticos y de cuidado personal, medicamentos veterinarios y productos de transformación, así como la identificación de nuevos agentes biológicos de interés, incluyendo patógenos no cultivables) en aguas, suelos y sedimentos. Si bien muchos de estos métodos no pueden considerarse todavía como "de rutina", ya están empezando a ser utilizados en numerosos laboratorios de todo el mundo.

## 1.2. Sustancias perfluoroalquiladas y polifluoroalquiladas

Las sustancias perfluoroalquiladas y polifluoroalquiladas (PFASs) son contaminantes orgánicos considerados como emergentes, persistentes y bioacumulables. Se ha demostrado que se transportan a largas distancias, se biomagnifican en la cadena trófica y pueden tener efectos nocivos inmediatos o a largo plazo sobre el medio ambiente y la salud humana.

### 1.2.1. Tipos, estructuras y propiedades físico-químicas

Las PFASs incluyen un diverso grupo de ECs antropogénicos, con un grupo funcional hidrofílico y que tienen en común una columna vertebral hidrofóbica formada por carbonos alifáticos cuyos átomos de hidrógeno han sido completamente (prefijo: per-) o parcialmente (prefijo: poli-) substituidos por flúor. La parte lipofílica puede ser lineal o ramificada. En la presente memoria se sigue la terminología recomendada por Buck y col. (2011) usando el término PFAS en lugar del acrónimo ampliamente utilizado PFC (compuesto perfluorado).

Las PFASs se caracterizan por su grupo funcional (ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos, sulfonamidas, sulfonamidoetanolos y alcoholes fluorotelómeros, entre otros). En la *Figura 1.1* se han incluido los diferentes tipos de PFASs más ampliamente estudiados y se muestra una visión general de la estructura jerárquica entre estos compuestos (Tesis Doctoral Ullah, 2013).

Se pueden dividir en dos grandes sub-grupos: 1) los ácidos perfluoroalquilados (PFAAs); y 2) los llamados precursores, incluyendo las PFASs que potencialmente pueden transformarse a PFAAs en el medio ambiente o en el metabolismo animal. Se incluyen como PFASs: en el grupo de los PFAAs, los ácidos carboxílicos perfluoroalquilados (PFCAs) y los ácidos sulfónicos perfluoroalquilados (PFSAs) con diferente longitud de cadena (típicamente C<sub>4</sub>-C<sub>14</sub>); y compuestos no-iónicos (volátiles) como los alcoholes fluorotelómeros (FTOHs), las sulfonamidas perfluoroalquiladas (FASAs) y los sulfonamidoetanolos perfluoroalquilados (FASEs). Recientemente se han publicado trabajos sobre la presencia de PFASs con grupos fosfatos y ácidos fosfónicos (PFPAAs) en aguas superficiales, de bebida y residuales (D'Eon y col., 2009; Ding y col., 2012). A su vez también se pueden clasificar en iónicos y neutros. Los PFAAs son PFASs iónicos que tienen una solubilidad en agua moderada y p<sub>ka</sub>s bajos, por lo que a los pH típicos en el medio ambiente suelen presentarse disociados. Los FTOHs, FASAs y las FASEs son compuestos neutros, con una presión de vapor moderada.

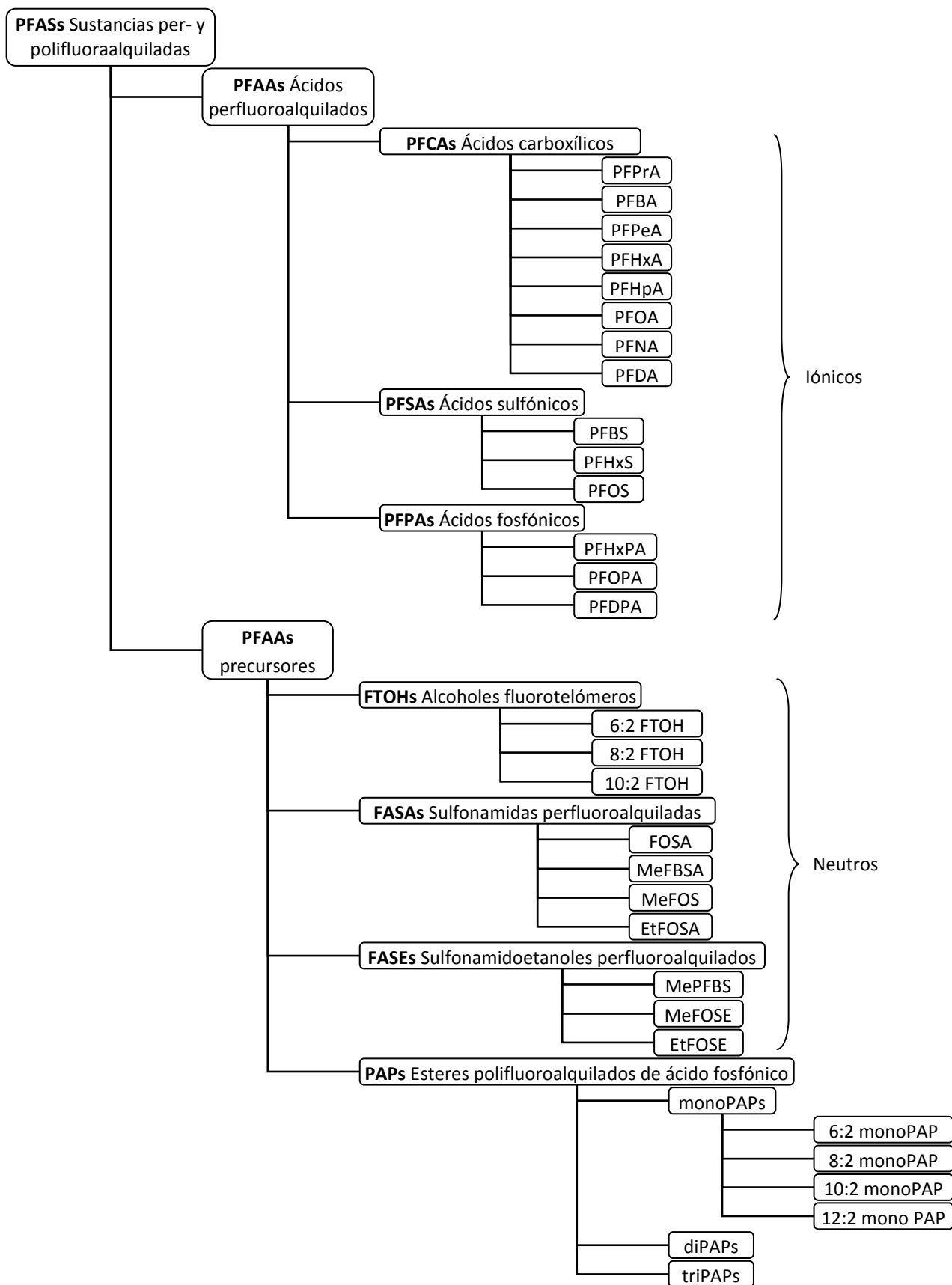


Figura 1.1. Tipos de PFASs más ampliamente estudiadas.

Inicialmente los estudios se centraron en el ácido sulfónico de perfluorooctano (PFOS) y el ácido carboxílico perfluorooctanoico (PFOA), y, por lo tanto, estos han recibido una mayor atención. Sin embargo, otras PFASs muy variadas (por ejemplo: compuestos perfluoroalquilados y/o fluorotelómeros iodados, acrilatos, metacrilatos y aldehídos) están recibiendo una creciente atención debido a que se producen como alternativos a PFOS y PFOA, son productos intermedios de su producción, y subproductos o productos de bio-degradación (Washington y col., 2014). Sha y col. (2015) describen en su trabajo diferentes estrategias para sintetizar compuestos alternativos al PFOA y al PFOS no bio-acumulables: (1) reducir la longitud de la cadena perfluorocarbonada; (2) introducir heteroátomos (I, O, P, S) en la cada perfluorocarbonada; (3) introducir ramificaciones en su estructura.

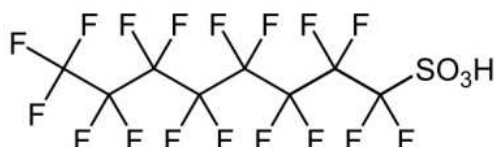
En la *Tabla 1.1* se presentan las estructuras y algunas de las propiedades físico-químicas de carácter medioambiental más importantes de los compuestos en estudio: PFCAs y PFSA. Existe una amplia gama de perfiles según la longitud de la cadena perfluoroalquílica y las ramificaciones. Como las PFASs normalmente se aplican como mezclas técnicas, en el medio ambiente se encuentran tanto isómeros lineales como ramificados.

Los PFCAs son un subgrupo de PFAAs con una cadena carbonada perfluorada típicamente de entre tres y 15 átomos de carbono y un grupo ácido carboxílico terminal. Su fórmula química general es  $C_nF_{2n+1}COOH$ . El PFOA más ampliamente estudiado es el PFOA, cuya estructura química se muestra a continuación a modo de ejemplo (*Figura 1.2*).



**Figura 1.2.** Estructura química del PFOA.

Los PFSA son el segundo grupo de PFASs más ampliamente estudiado, con una cadena carbonada perfluorada típicamente de número par de átomos de carbono (4, 6, 8 y 10) y un grupo ácido sulfónico terminal. Tienen la fórmula química general  $C_nF_{2n+1}SO_3H$ . La *Figura 1.3* muestra la estructura química del PFSA más representativo, el PFOS.



**Figura 1.3.** Estructura química del PFOS en solución.



**Tabla 1.1.** Estructuras y propiedades físico-químicas de carácter medioambiental más importantes de los compuestos en estudio, PFAAs.

Ácidos perfluoroalquilados (PFAAs)									
Nombre del compuesto	Acrónimo	CAS Number	Fórmula molecular	MW <sup>a</sup>	log K <sub>oc</sub> (L/kg)	Solubilidad (mg/L)	Presión de Vapor (Pa)	pk <sub>a</sub> <sup>g</sup>	Constante de Henry (atm.m <sup>3</sup> /mol)
Ácidos carboxílicos perfluoroalquilados (PFCAs)									
Ácido carboxílico perfluoropropanoico	PFPrA (C <sub>3</sub> )	422-64-0	CF <sub>3</sub> CF <sub>2</sub> COOH	164,1		1560,000			
Ácido carboxílico perfluorobutanoico	PFBA (C <sub>4</sub> )	375-22-4	CF <sub>3</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	214,1			851 <sup>b</sup> (25°C)	0,1	
Ácido carboxílico perfluoropentanoico	PFPeA (C <sub>5</sub> )	2706-90-3	CF <sub>3</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	264,1					
Ácido carboxílico perfluorohexanoico	PFHxA (C <sub>6</sub> )	307-24-4	CF <sub>3</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH	314,1				0,2	
Ácido carboxílico perfluoroheptanoico	PFHpA (C <sub>7</sub> )	375-85-9	CF <sub>3</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> COOH	364,1		118,000 <sup>c</sup> (21,6°C)	20,89 <sup>b</sup> (25°C)	0,31	
Ácido carboxílico perfluorooctanoico	PFOA (C <sub>8</sub> )	335-67-1	CF <sub>3</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COOH	414,1	1,47 <sup>d</sup>	4340 (24,1°C)	4,17 <sup>b</sup> (25°C)	0,35	9,1 x 10 <sup>-2</sup>
Ácido carboxílico perfluorononaico	PFNA (C <sub>9</sub> )	375-95-1	CF <sub>3</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	464,1	2,06 <sup>d</sup>		1,29 <sup>b</sup> (25°C)	0,36	
Ácido carboxílico perfluorodecanoico	PFDA (C <sub>10</sub> )	335-76-2	CF <sub>3</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> COOH	514,1	2,37 <sup>d</sup>	260 <sup>c</sup> (22,4°C)	0,23 <sup>b</sup> (25°C)	0,37	
Ácido carboxílico perfluoroundecanoico	PFUnDA (C <sub>11</sub> )	2058-94-8	CF <sub>3</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> COOH	564,1	2,32 <sup>d</sup>	92,3 <sup>c</sup> (22,9 °C)	0,10 <sup>b</sup> (25°C)		
Ácido carboxílico perfluorododecanoico	PFDoDA (C <sub>12</sub> )	307-55-1	CF <sub>3</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> COOH	614,1			0,008 <sup>b</sup> (25°C)	3,8	
Ácidos sulfónicos perfluoroalquilados (PFSAs)									
Ácido sulfónico de perfluorobutano	PFBS (C <sub>4</sub> )	375-73-5	CF <sub>3</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> H	300,1		510 <sup>e</sup>		-3,57	1,4 x 10 <sup>-5</sup>
Ácido sulfónico de perfluorohexano	PFHxS (C <sub>6</sub> )	355-46-4	CF <sub>3</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> SO <sub>3</sub> H	400,1	0,97 <sup>d</sup>			-3,34	4 x 10 <sup>-4</sup>
Ácido sulfónico de perfluorooctano	PFOS (C <sub>8</sub> )	1763-23-1	CF <sub>3</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> SO <sub>3</sub> H	500,1	2,10 <sup>d</sup>	570 <sup>f</sup>	3,31 x 10 <sup>-4</sup> (25°C) <sup>f</sup>	-3,27	1,1 x 10 <sup>-2</sup>

<sup>a</sup> Rahman y col., (2014); <sup>a</sup> United States National Library of Medicine (2011); <sup>b</sup> Bhatarai y Gramatica (2011); <sup>c</sup> Kaiser y col., (2006); <sup>d</sup> Awad y col., (2011); <sup>e</sup> Jensen y col., (2008); <sup>f</sup> Stock y col., (2009); <sup>g</sup> Scifinder.

El enlace C-F tiene un carácter parcialmente iónico debido a la electronegatividad del flúor, y es un enlace corto y de los más fuertes en química orgánica y es tanto más fuerte cuantos más hidrógenos son substituidos por flúor en cada átomo de carbono. Por lo tanto cuanto más substituida por flúor está la PFASs menos reactiva es, es decir más químicamente inerte es. Como resultado, muchas PFASs son inertes frente al calor, ácidos, bases, agentes oxidantes y reductores y frente a procesos de hidrólisis, fotólisis, degradación microbiana y del metabolismo (Kissa, 2001; Schultz y col., 2003). Esta extraordinaria estabilidad química y térmica favorece sus aplicaciones industriales, pero también hace que algunas PFASs sean persistentes en el medio ambiente.

Las diferentes propiedades físico-químicas son relevantes para estimar la compartimentación de las PFASs en el medio ambiente, afectando a su comportamiento y distribución en él. Los datos experimentales disponibles sobre hidrofobicidad, constantes de acidez (pKa), y constantes de partición son limitados (Rayne y Forest, 2009) y normalmente se refieren únicamente a las formas lineales de las PFASs.

En general, las PFASs neutras como FASAs, FASEs y FTOHs son menos solubles en agua y más volátiles que las PFASs iónicas. Una vez liberadas en el medio ambiente, las PFASs neutras pueden ser (bio)-degradadas en la atmósfera o en condiciones aerobias a PFCAs y PFSAs (Ahrens, 2011). PFCAs y PFSAs son persistentes frente a los procesos típicos de degradación medioambiental y han sido encontrados de forma ubicua en el agua, aire, alimentos, fauna y humanos (Ahrens, 2011).

Los valores de pKa disponibles experimentales y calculados, indican que PFCAs y PFASs son ácidos fuertes que a los valores de pH del medioambiente predominan en su forma disociada, cargada negativamente (Kaiser y col., 2006; Rayne y Forest, 2009; Buck y col., 2011), como ya hemos indicado anteriormente. La acidez disminuye a medida que la longitud de la cadena aumenta (por ejemplo, los valores de pKas varían desde 0,1 a 3,8 para el PFBA y el PFDoDA, respectivamente).

Los PFCAs y PFSAs tienen bajas presiones de vapor que disminuyen con el aumento de la longitud de la cadena de carbonos. Esto sugiere un bajo potencial para la volatilización (Prevedouros y col., 2006). FTOHs, FASAs y FASEs como el 8:2 FTOH, con una presión de vapor relativamente alta, son mucho más volátiles que los PFAAs. Por otra parte, la constante de Henry indica la tendencia de las PFASs a volatilizar desde el agua o el suelo húmedo al aire. Valores de esta constante  $> 10^{-3}$  atm m<sup>3</sup>/mol indican que estas sustancias tienen una alto potencial para volatilizarse desde el suelo húmedo.

La solubilidad en agua de las PFASs aumenta cuando la longitud de la cadena disminuye, por ejemplo de 0,1 a 100 g/L para PUnDA y PFHpA (Bhatarai y Gramatica, 2011). PFCAs y PFSAs con un grupo funcional iónico tienen solubilidades en agua altas, mientras que FTOH, perfluorooctanosulfonamida (FOSA/PFOSA), y N-EtFOSE tienen una solubilidad en agua mucho menor (Ahrens, 2011), ya que sus grupos funcionales hidrófilos no están cargados (*Tabla 1.1*).

Por último, como las PFAAs son tensioactivos, tienen tendencia a agregarse en la interfase octanol-agua, y los valores de  $\log K_{OW}$ , que son un indicador de la hidrofobicidad de cada compuesto son difíciles de determinar experimentalmente (Tolls y col., 1994; Tolls y Sijm, 1995). Además, este comportamiento como tensioactivo se debe tener en cuenta en la interpretación de los valores de  $\log K_{OW}$  obtenidos mediante modelos. Estudios de sorción de PFAS de cadena larga en sedimentos han revelado que los valores de  $K_{OC}$  registran un aumento al aumentar la longitud de la cadena de fluorocarbonada (Higgins y Luthy, 2006; Ahrens y col., 2010b). Además, de forma general los sulfonatos son más lipófilos que los carboxilatos correspondientes para una misma longitud de la cadena.

### 1.2.2. Historia de su producción y aplicaciones

Las PFASs son compuestos químicos fabricados por el hombre que han estado en uso desde los años 1950s. Es difícil describir con precisión la historia de su producción debido al carácter confidencial y a la protección de la propiedad de esta información y a que la integran acontecimientos de diferente índole como son la respuesta de la industria a las diversas formas de regulación, y el cambio de las líneas de productos, que además a veces coinciden, están interrelacionados e incluso se superponen. La *Figura 1.4* resume algunos de los eventos claves en la historia de los sustancias perfluoradas (Lindstrom y col., 2011).

La compañía 3M, que fue la mayor productora de fluoruro de sulfonilo perfluorooctano (POSF), empezó la producción en 1949, con una producción acumulada total en los años de apogeo, 1970-2002, estimada en aproximadamente 96000 toneladas (Paul y col., 2009). Después de que 3M interrumpiera la producción en el año 2002, otras compañías comenzaron la fabricación para satisfacer la demanda del mercado existente, con una producción estimada de 1000 toneladas al año desde el 2002 (Paul y col., 2009). En el año 1949 la empresa Dupont, una de las principales productoras de PFOA, introdujo la marca Teflon<sup>®</sup>. Otras de las principales empresas productoras en el mundo de PFOA son Arkema, Ashahi, Ciba, Clariant, Daikin, 3M/Dyneon, DuPont, y Solvay Solexis.

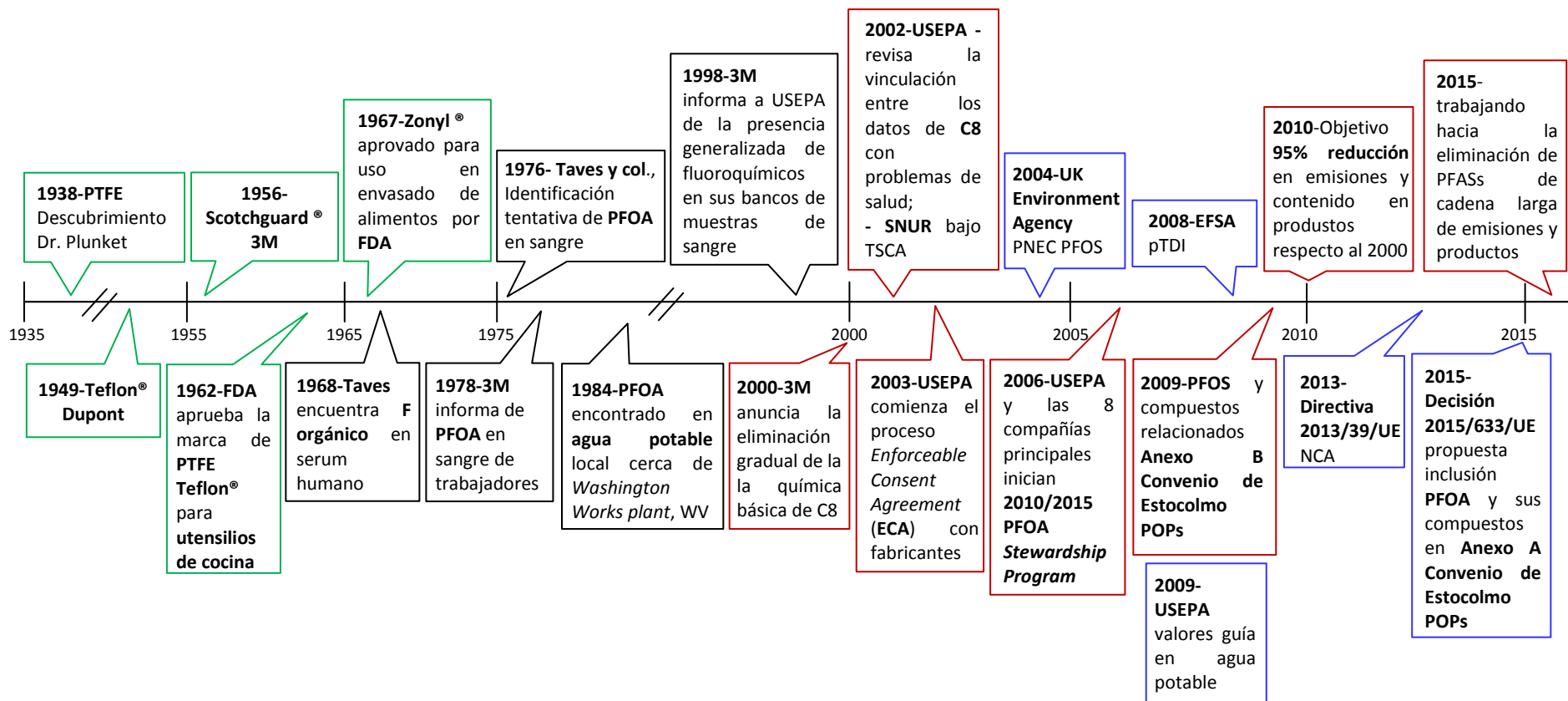


Figura 1.4. Cronología de algunos acontecimientos significativos en la historia de las PFASs (adaptado de Lindstrom y col., 2011)

Entre las muchas formas que se usan para producir PFASs, existen dos rutas sintéticas destacables: el proceso de fluoración electroquímica (ECF) y la telomerización. Los esquemas de ambas rutas se detallan en las Figuras 1.5 y 1.6.

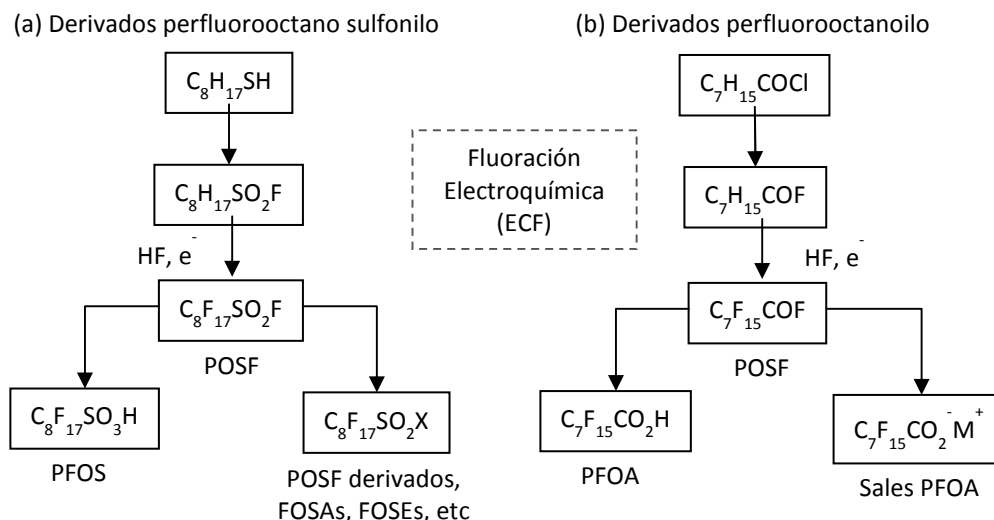


Figura 1.5. Proceso de síntesis general de ECF para producir PFOS, derivados POSF, PFOA y sus sales (adaptado de Buck y col., 2011)

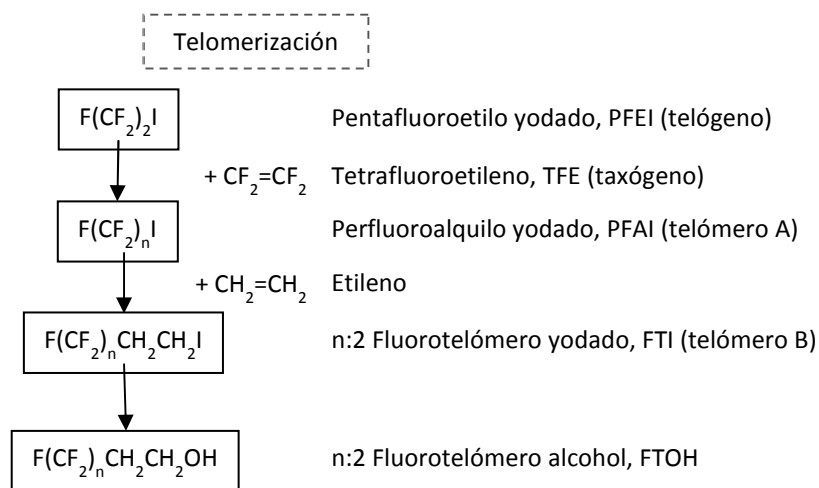


Figura 1.6. Proceso general de telomerización para producir FTOHs (adaptado de Buck y col., 2011)

En el proceso ECF, concebido por Joseph Simons en 1940, un hidrocarburo de cadena lineal reacciona con HF y electricidad para sustituir todo los átomos de hidrógeno por flúor (Figura 1.5) (Kissa, 2001). La naturaleza radical de este proceso conduce a un reordenamiento y rotura de la cadena de carbonos, dando lugar a una mezcla de isómeros perfluorados y homólogos de la materia prima, además de PFASs y otras especies (Alsmeyer y col., 1994). La relación entre los isómeros ramificados y lineales formados por ECF varía dependiendo de cómo el proceso se controla, pero es

alrededor del 70-80% de cadena lineal y del 20-30% de cadena ramificada en el caso de la síntesis de PFOS y PFOA (Buck y col., 2011). El POSF ( $C_8F_{17}SO_2F$ ) ha sido el principal compuesto producido de esta manera, la principal materia prima para la producción de PFOS y otros derivados como las FOSAs y FOSEs (Tesis Doctoral Ullah, 2013). Todos los compuestos producidos a partir de POSF han sido considerados como "equivalentes a PFOS" ya que estos materiales tienen el potencial en última instancia, de degradarse o transformarse a PFOS. De igual forma, la ECF del octanoilo fluorado ( $C_7H_{15}COF$ ) es el proceso más ampliamente utilizado históricamente para producir perfluorooctanoilo fluorado ( $C_7F_{15}COF$ ), que se hace reaccionar adicionalmente para hacer PFOA y sus sales (*Figura 1.5b*) (Kissa, 1994). Cuando la compañía 3M paró voluntariamente la producción de PFOA durante los años 2000-2002, la reemplazó por la línea alternativa mediante ECF de productos de cadena corta utilizando perfluorobutano (Buck y col., 2011).

El otro proceso principal para la producción de PFASs es la telomerización (Kissa, 2001), que implica la reacción de perfluoroetileno (un telógeno,  $CF_2=CF_2$ ) y yoduro de perfluoroetilo (un telógeno  $CF_3-CF_2I$ ) para producir una mezcla de cadenas largas prefluoroalquil yodadas (telómero A) con longitudes de cadena que son generalmente divisibles por 2. Estos yoduros perfluorados se utilizan a continuación como materia prima para hacer PFCAs, alcoholes y olefinas fluorotelómeros y telómeros fluorados que son casi exclusivamente de cadena lineal, sin los isómeros ramificados o cíclicos que son característicos del proceso de síntesis ECF. En este segundo paso el telómero A se hace reaccionar adicionalmente con etileno para formar el fluorotelómero yodado (telómero B). Los productos resultantes del telómero A y B son los principales bloques de construcción para otras reacciones, que producen tensioactivos y polímeros basados en estos telómeros fluorados. Este proceso se muestra en la *Figura 1.6* para la síntesis de los FTOHs. Los materiales basados en fluorotelómero se utilizan para producir polímeros, revestimientos de superficies, tratamientos textiles, tensioactivos y envases en contacto con alimentos, con una producción anual estimada en el año 2004 de entre 11 000 y 13 000 toneladas por año (DuPont, 2005). El PFOA ha sido ampliamente utilizado como una emulsión y ayuda en la polimerización para la producción de politetrafluoroetileno (PTFE), un polímero inerte utilizado en una amplia variedad de aplicaciones, incluidos los recubrimientos antiadherentes en utensilios de cocina, recipientes de reactivos para materiales corrosivos, aisladores, lubricantes, y muchos otros usos.

Es importante tener en cuenta que miles de diferentes compuestos polifluorados se han sintetizado y han sido utilizados por la industria. Por ejemplo, los ésteres polifluoroalquilados de ácido fosfónico (PAP) y ácidos fosfónicos perfluorados (PFPA) son otros dos grupos que recientemente han ido ganando atención (Begley y col., 2008; D'Eon y col., 2009).

En el año 1968 Taves encontró flúor orgánico en muestras de suero humano. A medida que se han desarrollado métodos de análisis y la investigación ha demostrado que muchas de las PFASs de cadena larga son tóxicas, persistentes y bioacumulativas, diferentes organismos gubernamentales y reguladores han estado trabajando a nivel mundial para lograr acuerdos y reglamentos que limiten la producción de estas PFASs (Zushi y col., 2011). De forma que para las aplicaciones pertinentes se van buscando

sustitutos que sean más inocuos. En la *Figura 1.4*, se indican algunos de estos procesos de control que se describen detalladamente en el apartado sobre normativa de PFASs y en la *Tabla 1.6*.

Las PFASs contienen por una parte una cadena fluorocarbonada hidrofóbica y por la otra un grupo funcional polar hidrofílico. Algunas de sus características como la baja polarizabilidad molecular, cortas longitudes de enlace C-F y altas energías de enlace C-F, son inherentes a su cadena fluoroalquilada. Estas características les confieren gran variedad de propiedades interesantes y útiles, son: repelentes al agua, al aceite y al polvo; estables químicamente y físicamente; y capaces de reducir la tensión superficial. Por todo ello se utilizan en una amplia gama de aplicaciones industriales, comerciales y en productos de consumo (Clara y col., 2009).

Se utilizan para proteger superficies del agua, el aceite y el polvo en la industria textil y papelera. En la industria textil, las PFASs se usan en la ropa impermeable, paraguas, bolsas, tiendas de campaña, tapicería, cuero, calzado, alfombras, mantas, etc. Bien conocido es el uso de las prendas y utensilios con Gore-Tex<sup>®</sup> (Teflon). En la industria papelera, se han obtenido papeles y cartones impermeables y repelentes a la grasa, utilizando PFASs. Las PFASs se han empleado en aplicaciones directas con la comida como utensilios de cocina, platos, recipientes para alimentos, sartenes, y otras indirectas como materiales utilizados en el envasado de alimentos, cajas plegables y papel de filtro. Antes del año 2000, la industria textil y papelera correspondían al 47% y el 32% del uso del PFOS en Europa, pero después de las prohibiciones impuestas en muchos países que se describen en el apartado de normativa, el PFOS se ha reemplazado principalmente por fluorotelómeros y otros análogos de cadena corta, como el PFBS, y también por productos químicos que no contienen flúor. Actualmente en Europa, el uso de PFOS en productos de papel y cartón no está autorizado y se ha sustituido por otras sustancias químicas fluoradas.

Las PFASs se han utilizado históricamente como agentes de limpieza, y cosméticos de consumo humano, en el hogar y para vehículos (aerosoles de protección, limpiadores de dentaduras postizas y champús, pulimentos de parquet y azulejos, lavavajillas, ceras para coches y de esquí (Moody y col., 2001, 2002).

Antes del año 2000, el uso de PFOS como recubrimientos y barnices de superficies representaba el 18% de su producción en Europa. Se aplican en grasas y lubricantes, agentes humectantes y dispersantes, pinturas, esmaltes, revestimientos, barnices y adhesivos (Moody y Field, 1999).

Los tensioactivos fluorados son ampliamente utilizados en las espumas anti-incendios aplicadas en aeropuertos y refinerías de petróleo. De hecho se han producido diversos episodios de contaminación debido al vertido incontrolado en incendios o accidental en actividades formativas de lucha contra-incendios y/o simulacros (Moody y col., 2001, 2002; Moody y Field, 1999).

Las PFASs pueden usarse en la producción de petróleo para incrementar su recuperación y la de gas en los pozos, como inhibidores de la evaporación de la gasolina, combustible del motor jet y disolventes de hidrocarburos (Moody y col., 2002), y en la minería para la extracción de metales en las minas de oro y cobre.

También se utilizan en dispositivos médicos, en la industria fotográfica y electrónica. Algunos endoscopios de video contienen una pequeña cantidad de PFOS en el *Charge-Coupled Device (CCD) color filter*. Como las PFASs repelen el polvo, minimizan la fricción y reducen la electricidad estática, se emplean en los procesos de fabricación de las películas y el papel fotográfico. También se utilizan en la fabricación de muchos dispositivos electrónicos (cámaras digitales, teléfonos, impresoras, escáneres y sistemas de radar).

Por último, mencionar que algunas PFASs se incorporan como aditivos en formulaciones de herbicidas e insecticidas (Moody y Field, 1999).

### 1.2.3. Presencia en el medioambiente

Las PFASs son persistentes frente a los procesos típicos de degradación del medio ambiente y se han encontrado de forma ubicua en el agua, el aire, los alimentos, la fauna en humanos (Ahrens, 2011).

En el año 2001 se observó por primera vez contaminación global por PFOS y PFOA (Giesy y Kannan, 2001) en muestras de tejidos y sangre de animales, incluyendo peces, pájaros y mamíferos marinos. A raíz de esta constatación, muchos estudios han descrito contaminación por PFASs en el medio ambiente, incluyendo ecosistemas acuáticos, agua potable, aire y productos alimenticios. Hoy en día se considera que existe una propagación global de estos contaminantes en el medio ambiente incluyendo la fauna silvestre y los seres humanos.

La mayor parte de la liberación de estos compuestos al medio ambiente es en el agua (98%) y el resto en el aire (Paul y col., 2009). De una parte, los compuestos precursores neutros y volátiles como los telómeros, los alcoholes y las sulfonamidas pueden someterse a un transporte atmosférico de largo alcance (Ahrens, 2011). En el aire de diferentes ciudades japonesas (Harada y col., 2006b), se ha detectado particulado conteniendo PFOA a niveles de 0,07–0,9 ng/m<sup>3</sup> y en un área de muestreo cercana a una planta de fabricación de fluoropolímero en los Estados Unidos (Barton y col., 2006) los niveles detectados fueron de entre 0,12–0,9 µg/m<sup>3</sup>. Dos precursores de PFOS se han medido en el aire de Canada, N-etilperfluorooctano-sulfonamido etanol (N-EtFOSE) y N-metil-perfluorooctano-sulfonamido etanol (Martin y col., 2002). Y por otra parte, las PFASs iónicas, debido a su alta solubilidad en agua, la simultaneidad de propiedades hidrofóbicas/hidrofílicas y su baja volatilidad se encuentran presentes en todos los ambientes acuáticos. La tendencia a absorberse al suelo, fango o sedimento es baja, migran fácilmente del suelo al agua subterránea y son solubles en agua. Estas propiedades difieren a las de otros contaminantes orgánicos persistentes como las dioxinas, furanos y PCBs que debido a su alto coeficiente de partición octanol/agua tienen gran afinidad por los sedimentos y baja solubilidad en agua. Es probable que las PFASs encontradas en estas matrices estén asociadas a la fase acuosa o débilmente absorbidas mediante interacciones electrostáticas (Gannon y col., 2006). No obstante,



Higgins y col. (2005) proporcionaron una evaluación cuantitativa de PFAAs en sedimentos y lodos de depuradora principalmente de residuos domésticos en los EEUU, encontrando estos compuestos a niveles de ng/g. Aunque alrededor de 40 PFASs diferentes han sido detectadas en agua (Ahrens, 2011), la mayoría de los estudios se han centrado en la determinación de PFOA y PFOS, ya que, en muchos casos en los que diferentes PFASs se habían monitoreado en el agua, el PFOS y el PFOA habían sido los que se detectaron con mayor frecuencia y a las concentraciones más altas (Quinones y Snyder, 2009; Thompson y col., 2011; Yamashita y col., 2005). Otros compuestos detectados con frecuencia son PFBA, PFHxA, PFHpA, PFNA, PFDA, PFBA, PFHxS, y FOSA. En estudios recientes (Ahrens y col, 2010a; *Minnesota Department of Health*, 2008; Möller y col, 2010) se encontró como PFAS mayoritarios al PFBS y al PFBA, dos posibles compuestos sustitutos de PFOS y PFOA de cadena corta (Renner, 2006; USEPA, 2012a). Como los reglamentos acerca del PFOA y del PFOS se vuelven más rigurosos, es probable que incrementemente el uso de otros compuestos orgánicos fluorados. Además, muchos otros PFAS son utilizados actualmente. Un ejemplo son los compuestos orgánicos fluorados que contienen fósforo tales como los PAPs, PFPAs y ácidos fosfónicos perfluorado (PFPIAs) que se han detectado recientemente en aguas superficiales, efluentes de aguas residuales y aguas potables (D' Eon y col., 2009; Ding y col., 2012).

Se ha detectado la presencia de PFOS y otras PFASs en sangre y órganos como el hígado y los riñones, unidos a proteínas de suero como las  $\beta$ -lipoproteínas y la albúmina y a proteínas hepáticas transportadoras de ácidos grasos (L-FABP), así como en tejidos del músculo de diferentes especies de fauna (por ejemplo en organismos marinos, peces, mejillones, bivalvos, cangrejos, tortugas, pingüinos, etc.; en los osos polares en Groenlandia; en los pandas gigantes en China; en los albatros en el medio del Océano Pacífico (EHP 2007) y en los huevos de algunos tipos de pájaros en muchos lugares del mundo. Este hecho contrasta con otros contaminantes orgánicos persistentes como los bifenilos policlorados (PCBs) que tienden a acumularse en tejidos grasos debido a que son liposolubles. Un interés particular ha despertado el hecho de que son omnipresentes en humanos y que se han encontrado en mamíferos árticos, pájaros marinos y otras especies en zonas remotas. La presencia de tensioactivos perfluorados en la biota ártica, lejos de fuentes antropogénicas, demuestra el potencial de estos analitos a ser transportados largas distancias. La acumulación de PFASs en fauna y en humanos prueba que son persistentes en el medio ambiente y pueden ser tóxicos en estos organismos. Para el PFOA y el PFOS, estudios en animales han demostrado que se absorben bien por vía oral pero que se eliminan poco, no se metabolizan, son sometidos a prolongadas absorciones vía circulación enterohepática y se bioamagnifican en la cadena trófica, los animales en niveles tróficos más elevados presentan mayores concentraciones de estas sustancias que los animales de niveles inferiores. La eliminación es vía orina y defecación y en los experimentos con animales en condiciones controladas de laboratorio es dependiente de la especie y del sexo. Por ejemplo, las ratas hembras los eliminan más rápidamente. La bioconcentración de estos compuestos es altamente dependiente de la estructura. Por ejemplo, las PFASs con una longitud de cadena perfluoroalquilada (número de carbonos con flúor enlazado)  $\geq 8$  son generalmente más bioacumulativas que aquellos con  $\leq 7$  (Lindstrom y col. 2011). Hay que tener en cuenta que aunque el PFOA tiene ocho átomos de carbono totales, sólo siete son carbonos de perfluoroalquilo con un

carbono adicional carboxilato, dándole una menor tendencia a ser retenido en muchas matrices biológicas. Los seres humanos parecen ser una importante excepción a esta observación, como pone de manifiesto el hecho de que el PFOA se acumula fácilmente en el serum humano (Lindstrom y col. 2011). El grupo funcional también tiene un efecto sobre la bioacumulación, algunos estudios llegan a la conclusión de que los tensoactivos perfluorados sulfonados se bioacumulan más que los correspondientes carboxilatos con el mismo número de carbonos (Lindstrom y col. 2011). Por último, mencionar que la determinación de PFASs en alimentos, piensos y comestibles, también está recibiendo una creciente atención (De Voogt y Sáez, 2006; Haug y col., 2010). Así como, en sus múltiples aplicaciones debido a sus propiedades como repelentes de agua y de aceite en productos de consumo (ceras, pinturas, selladoras, productos de limpieza, pulimentos de suelo, tapicería, productos de protección en alfombras, agentes de imprimación en prendas de vestir y zapatos, recubrimientos de sartenes, películas protectoras en papel y productos de embalaje en contacto con alimentos y plásticos resistentes) (De Voogt y Sáez, 2006). Estos productos de consumo, durante su utilización pueden producir la exposición a estos compuestos y finalizada su vida útil es importante controlar su interacción con el medio ambiente y gestionar correctamente sus residuos. Por ejemplo, los precursores lábiles como los telómeros y los alcoholes FOSE son volátiles, y algunos estudios han mostrado que se encuentran en ambientes interiores a niveles de  $\text{pg/m}^3 - \text{ng/m}^3$  (Shoeib y col., 2011) y que una contaminación en el intervalo de 10 a 100 ng/g en el polvo doméstico es bastante común (Shoeib y col., 2005; Strynar y Lindstrom, 2008), sugiriendo que la inhalación del material en el aire o el contacto mano boca (sobre todo para los niños) puede contribuir a la exposición humana.

#### **1.2.4. Exposición humana y toxicidad**

Desde la primera identificación de PFASs en sangre humana (Olsen y col.1999), la exposición humana interna para estos compuestos (generalmente medida y expresada como concentraciones en suero, plasma y sangre entera) se ha investigado en diversos estudios a escala mundial (Haug y col. 2011, Hölzer y col. 2011, Kannan y col. 2004, Vestergren y col. 2009). En particular el PFOA y el PFOS se han detectado en personas de todo el mundo (Kannan y col., 2004; Post y col., 2012; Tesis Doctoral Ullah, 2013). Adicionalmente, un número limitado de estudios recientes han detectado la presencia de PFASs en otras matrices como la leche materna, la orina, el pelo, el plasma seminal, y la sangre de cordón umbilical (Bloom y col., 2009; Croes y col., 2012; Guerranti y col., 2013; Guruge y col., 2005; Kubwabo y col., 2013; Lau y col., 2007; Li y col., 2012; Perez y col., 2012; Post y col., 2012; Raab y col., 2013; Toft y col., 2012; Valsecchi y col., 2013; Vested y col., 2013; Wan y col., 2013;

El hecho de que prácticamente todas las personas que viven en países industrializados presenten PFASs en su suero sanguíneo indica la exposición generalizada a estos compuestos. Se consideran como principales vías de exposición

humana a PFASs: el agua, la comida (peces, mejillones, bivalvos, cangrejos), los utensilios de cocina y la migración de PFAS de materiales utilizados en el envasado de alimentos (Begley y col. 2008), los productos de consumo, la leche materna, el contacto dérmico de los tejidos tratados (alfombras, tapicería y ropa), el uso de aerosoles de protección, las ceras de esquí, la inhalación de polvo a nivel doméstico y de aire en general. También, recientes estudios han indicado que los cultivos en suelos contaminados pueden acumular PFASs. Esto puede ser de especial preocupación en las zonas agrícolas que reciben aportaciones de biosólidos de EDARs, ya que estos efluentes pueden contener precursores de PFASs y compuestos degradados (Lindstrom y col. 2011). En concreto, la exposición a PFAAs probablemente es el resultado de una combinación de exposición directa a PFAAs y de exposición a los precursores, que posteriormente se pueden bio-transformar en PFAAs (D'Eon y col. 2011). De entre todas las posibilidades, la ingesta alimentaria directa (agua y alimentos) ha sido identificada como la principal vía de exposición humana a PFASs para la población general (Ericson y col. 2008, Fromme y col. 2007 y 2009; Vestergren y col. 2012b, Yamaguchi y col. 2013; Zushi y col. 2012). La migración a la comida desde utensilios de cocina con recubrimientos de PTFE como las sartenes no se considera una fuente de exposición significativa (Trudel y col., 2008). Sin embargo, el patrón de exposición parece variar en función del tipo de PFASs, la ubicación geográfica, el tipo de alimento y el patrón de consumo de alimentos. Por ejemplo, en algunos trabajos, el consumo de pescado y otros organismos marinos, unos de los alimentos más ampliamente estudiados, se consideran como una importante vía de exposición para el PFOS y un número creciente de estudios han empezado a sugerir que los peces de cuerpos de agua contaminados pueden dominar la exposición a PFOS y posiblemente a otros PFCAs de cadena larga (Berger y col. 2009, Falandysz y col. 2006, Haug y col. 2010, Vestergren y col. 2012b, Yamaguchi y col. 2013). Una vez ingeridos por animales y/o personas, son absorbidos y distribuidos principalmente en la sangre, el hígado y el riñón. Cabe diferenciar que debido a que las PFASs son a la vez hidrofóbicas y lipofóbicas, no siguen un patrón clásico de partición en tejidos grasos seguidos de acumulación, típico de muchos contaminantes. Se unen preferentemente a proteínas del plasma, como la albúmina y las  $\beta$ -lipoproteínas, y del hígado, como las proteínas hepáticas transportadoras de ácidos grasos.

Los niveles de concentración de PFASs en suero y tejidos humanos son típicamente bajos, ng/mL, con concentraciones hepáticas varias veces superiores a las concentraciones en suero. Aunque, está claro que hay un número pequeño de individuos que han estado expuestos a niveles mucho más altos que la mayoría de la población, por ejemplo trabajadores ocupacionalmente expuestos y personas expuestas a aguas contaminadas, en accidentes o en zonas próximas a fuentes de fabricación o utilización de estos compuestos. La exposición ocupacional se cree que ocurre primariamente por inhalación (ATSDR, 2009; Vestergren y Cousins, 2009). La ingesta diaria de PFOS para los trabajadores que han sido altamente expuestos excedería el valor provisional de ingesta tolerable (pTDI; Zushi y col., 2012). Datos recientes en EE.UU. han indicado que personas que vivieron cerca de una instalación que utilizaba PFOA, tenían concentraciones séricas de este compuesto mucho más altas que las normalmente determinadas para la población general (Emmett y col., 2006; Lau y col., 2007). Normalmente, en la mayoría de los casos, los trabajadores ocupacionalmente expuestos han presentado niveles séricos de PFOA y PFOS

aproximadamente un orden de magnitud superior a los encontrados en la población general. En concreto, en el suero de las personas de dos comunidades de Ohio expuestas a agua de bebida contaminada con PFOA se detectó este compuesto en concentraciones medias de  $122 \pm 81$  y  $424 \pm 333$  ng/mL (Bartell y col., 2010). También, los niños son una población que recibe una atención especial por considerarse vulnerables a la exposición a PFASs. Existen estudios que encuentran niveles sensiblemente mayores de PFOA en el suero de niños (3-11 años) que en adultos (2001-2002 *National Health and Nutrition Examination Survey*, NHANE; Kato y col., 2009). En los niños pequeños se puede esperar una mayor exposición a PFOA que en las personas mayores por acumulación a través de la leche materna y el cordón umbilical y debido a los comportamientos específicos de la edad, como un mayor consumo de agua potable y alimentos de consumo en un peso corporal base más pequeño, el comportamiento de la mano a la boca que provoca una mayor ingestión de polvo de la casa, y más tiempo de contacto con el suelo donde hay alfombras tratadas (Trudel y col., 2008).

En concreto, el agua potable ha sido identificada como una ruta importante de exposición para los PFCA y PFSA homólogos de cadena corta (Vestergren y col. 2012b). Para los residentes en zonas altamente contaminadas, el consumo de agua potable contaminada ha sido considerado como la vía de exposición principal (Karrman y col., 2009), aunque incluso en estos casos, el consumo de PFOS y PFOA a través del agua, no se ha estimado como un riesgo significativo para la salud de la población general adulta. Emmett y col. (2006) por su parte habían demostrado previamente que el agua potable contaminada con PFOA (liberado de obras hidráulicas cercanas a DuPont Washington) fue la principal vía de exposición y que la "fuente de agua residencial fue el principal determinante de las concentraciones de PFOA en suero" (Rahman y col, 2014). Post y col. (2012) en su trabajo han revisado la información disponible respecto a las fuentes, la detección en agua potable, la toxicocinética y los efectos sobre la salud del PFOA. Los niveles de PFOA en suero incrementan debido a la exposición continua a agua de bebida en una proporción media de 100:1. Por ejemplo, una exposición continua a una concentración en agua de bebida de 10, 40, 100 o 400 ng/L se espera que incremente una media de un 25, 100, 250 y 1000%, respectivamente, para un nivel de fondo de 4 ng/mL en la población general. Es importante señalar que los datos disponibles indican que la exposición continuada a concentraciones en agua potable incluso relativamente bajas, que es más generalizada, aumenta sustancialmente la exposición humana total y también puede dar como resultado cargas corporales elevadas que pueden potenciar el riesgo de efectos sobre la salud.

Durante la última década, se han realizado diversos estudios de laboratorio sobre la toxicidad de las PFASs en animales (en su mayoría organismos acuáticos, roedores o mamíferos) y su modo de acción, identificado efectos graves para la salud, así como para caracterizar sus efectos sobre el desarrollo, los efectos hormonales y el potencial inmunotóxico (Lau y col., 2007; Martin y col., 2010). Algunos de los resultados obtenidos se muestran en las *Tablas 1.2-1.4*. La mayoría de los primeros estudios se centraron en el PFOA y el PFOS, aportando resultados de toxicidad en extremos tales como disminución del peso corporal, aumento del peso del hígado y trastornos hormonales (Lau y col. 2006) como se resume en la *Tabla 1.5*. De hecho, la toxicidad de PFOS y PFOA ha sido extensivamente revisada (Lau y col., 2007) y

recientemente, Post y col. (2012) repasan la literatura más actual sobre los efectos de salud del PFOA. Se observó que, por ejemplo, la exposición subcrónica en ratas y monos a PFOS puede conducir a la pérdida de peso significativa, el aumento de peso del hígado y la reducción del colesterol sérico y de la hormona tiroidea (Lau y col., 2007). Además, se ha demostrado que el PFOS es tóxico para los organismos acuáticos. En cambio, la exposición a PFOA se asoció con la alteración del metabolismo de los ácidos grasos, la producción de la hepatotoxicidad, la reducción de hormonas tiroideas circulantes y andrógenos, y la hipotermia en rata (Lau y col. 2004). En cambio, existe muy poca información disponible sobre la toxicidad de los fluorotelómeros (FTOH) y las perfluorosulfonamidas (PFOSA, N-ETFOSA), ver *Tabla 1.2*. De hecho, no son demasiado estables y se biodegradan a PFCAs en biota. Por lo tanto, se espera que tengan los mismos efectos toxicológicos típicos de los ácidos recogidos en la *Tabla 1.5*. La longitud de la cadena y el grupo funcional tienen un efecto importante en el mecanismo de la toxicidad. En general, ha quedado demostrado que el PFOS es más tóxico que el PFOA, y que cuanto más corta es la cadena alquílica la toxicidad es menor.

Por otro lado, se ha probado el efecto disruptor de algunas PFASs en hormonas de la tiroides y de la reproducción en ratas, en cambio en seres humanos no se ha detectado ningún cambio significativo en estas hormonas asociado con niveles de estos compuestos en suero. Maras y col. (2006) han descrito recientemente propiedades similares a los estrógenos para los 6:2 y 8:2 FTOH, pero estos potenciales "xenoestrógenos" parecen actuar a través de un mecanismo diferente del 17 $\beta$ -estradiol, el compuesto de referencia clásico para la acción estrogénica. Otros autores (Lau y col., 2007) han descrito un mecanismo estrogénico de PFOA para promover carcinoma hepatocelular en la trucha arco iris. Además, PFNA, PFDA, y PFUA mostraron ser estrogénicos in vivo, en base a un bioensayo de inducción de la vitelogenina. Por tanto, los resultados preliminares indican que estos PFAAs podrían ser xenoestrógenos débiles en el medio ambiente.

**Tabla 1.2.** Valores más bajos observados de L(E)C<sub>50</sub> y NOECs para algunas PFASs en organismos de agua dulce.

Compuesto	Nivel de toxicidad	Tipo de organismo	Especie acuática	Tiempo de exposición	Resultados Toxicidad (mg/L)
PFOS	Agudo	Algas	<i>Selenastrum capricornutum</i>	72h	EC <sub>50</sub> = 120
		Invertebrados	<i>Daphnia magna</i>	48 h	EC <sub>50</sub> =58
		Peces	<i>Rainbow trout</i>	96h	EC <sub>50</sub> = 7,8
	Crónico	Invertebrados	<i>Daphnids</i>	28d	NOEC = 7
		Peces	<i>Fathead minnow</i>	42d	NOEC = 0,30
PFOA	Agudo	Bacteria	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	30 min	EC <sub>50</sub> = 722
		Algas	<i>Selenastrum capricornutum</i>	96h	EC <sub>50</sub> > 1000
		Peces	<i>Fathead minnow</i>	96h	LC <sub>50</sub> = 300
	Crónico	Algas	<i>Selenastrum capricornutum</i>	14d	EC <sub>50</sub> = 43
		Peces	<i>Fathead minnows</i>	30d	NOEC > 100
8:2 FTOH	Agudo	Algas	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	72h	NOEC = 0,20
		Invertebrados	<i>Daphnids</i>	48h	NOEC = 0,16
		Peces	<i>Danio rerio</i>	96h	NOEC = 0,18
N-EtFOSA	Agudo	Invertebrados	<i>Daphnids</i>	48h	EL <sub>50</sub> = 14,5
		Peces	<i>Fathead minnow</i>	96h	LL <sub>50</sub> = 206

NOEC: concentración de efecto no observado.

EC<sub>50</sub>: concentración a la que se observa efecto en el 50% de la población expuesta.

LC<sub>50</sub>: concentración letal que causa la mortalidad del 50% de la población expuesta.

EL<sub>50</sub> y LL<sub>50</sub>: són similares a EC<sub>50</sub> y LC<sub>50</sub>, respectivamente, pero en tests toxicológicos cuando se forman mezclas miscibles parcialmente, y se hace referencia a la fase acuosa.

LD/LC<sub>50</sub>: dosis/concentración que causa la mortalidad del 50% de la población expuesta.

**Tabla 1.3.** Toxicidad del PFOS en organismos marinos.

Tipo de organismo	Especie acuática	Tiempo de exposición	Resultados Toxicidad (mg/L)
Algas	<i>Skeletonema costatum</i>	96h	EC <sub>50</sub> crecimiento > 3,2 NOEC crecimiento >3,2
Invertebrados	<i>Mysid shrimp</i>	96h	LC <sub>50</sub> = 3,6 NOEC = 1,1
Invertebrados	<i>Eastern oyster</i>	96h	EC <sub>50</sub> > 3,0 NOEC = 1,9
Invertebrados	<i>Mysid shrimp</i>	35d	NOEC reproducción = 0,25 NOEC supervivencia = 0,55 NOEC crecimiento = 0,25
Peces	<i>Sheepshead minnow</i>	96h	LC <sub>50</sub> >15

**Tabla 1.4.** Toxicidad aguda del PFOA y PFOS en roedores.

Compuesto t	Aplicación	Especie	Resultados Toxicidad (mg/Kg)
PFOA	Oral	Ratas CD	LD <sub>50</sub> > 500 (machos) LD <sub>50</sub> 250-500 (hembras)
		Ratas de Wistar	LD <sub>50</sub> < 1000 hembras )
	Inhalación	Ratas	1h NOEC > 18,6 mg/L
	Dérmica	Conejos	LD <sub>50</sub> > 2000
	Irritación de ojos		Irritante
	Irritación de la piel		Daño el tejido irreversible
PFOS	Oral	Ratas	LD <sub>50</sub> = 251 1h LC <sub>50</sub> = 5,2
	Irritación de ojos	Conejos	Irritante suave
	Irritación de la piel		No irritante

**Taula 1.5.** Efectos toxicológicos para las PFASs.

Parámetros	Efectos
<b>Mutación</b>	No mutagénicos
<b>Carcinogénesis</b>	Cáncer de hígado, vejiga, próstata
<b>Toxicidad Crónica/subcrónica</b>	Disminución del peso corporal Crecimiento del hígado Niveles bajos de Colesterol, Triglicéridos y hormonas tiroideas en sangre Proliferación de peroxisomas hepáticos Inhibición en la comunicación intercelular Aumento de la fluidez de la membrana
<b>Reproducción/desarrollo</b>	Muerte post-natal Problemas de desarrollo(reducción del peso del feto, edema, osificación retardada, anomalía cardíaca)

Aunque en la bibliografía hay un creciente número de trabajos sobre la toxicidad de las PFASs en modelos animales, los datos sobre los efectos toxicológicos de PFASs en los seres humanos son limitados (por ejemplo Steenland y col., 2010). Incluso para el PFOA, "hasta la fecha no hay suficientes datos para sacar conclusiones firmes sobre el papel de PFOA para cualquiera de las enfermedades consideradas" (Steenland y col., 2010). Por ejemplo, en los seres humanos, el PFOA se asocia a numerosos efectos en la salud al nivel de exposición de la población en general, así como en grupos más expuestos. Pero como ocurre en muchos estudios epidemiológicos, la causalidad no está probada para estos efectos. La USEPA (2006a) ha recomendado la consideración del PFOA como probable carcinógeno en humanos, aunque existe cierta incertidumbre acerca de la relevancia humana de algunos de los

datos de tumores en animales. Existen estudios de incidencia de cáncer en comunidades expuestas a agua potable contaminada próximos a concluir que contrastaran este probable efecto carcinógeno en humanos (Post y col., 2012).

Además, las investigaciones de los efectos potenciales para la salud de los trabajadores ocupacionalmente expuestos a estos compuestos han mostrado en general resultados inconsistentes (Steenland y col., 2010) Estos trabajadores pueden tener niveles en sangre de las PFASs que son cientos de veces superiores a las de individuos no expuestos ocupacionalmente (Olsen y col., 2003), pero es difícil determinar resultados concluyentes en estos estudios (positivos o negativos) porque las poblaciones de muestra son pequeños, los niveles de exposición históricos son inciertos, las personas a menudo han tenido exposiciones simultáneas a otros compuestos, y pueden tener condiciones preexistentes que complican las evaluaciones. También, el desarrollo de la comprensión de cómo las personas quedan expuestas se complica por una serie de factores. Existen estudios que han demostrado que existe una bioacumulación de las PFASs de cadena larga (>C8) en fauna y seres humanos (Rahman y col, 2014). Una vez estas PFASs han entrado en el cuerpo como ya se ha indicado anteriormente, son pobremente eliminadas, con vidas medias en suero elevadas, concretamente el PFOA y el PFOS no se metabolizan. La baja tasa de eliminación de las PFASs sugiere que “una exposición continuada podría aumentar la carga corporal a niveles que darían lugar a resultados adversos”. Además, este tiempo de eliminación lenta hace que sea difícil determinar cómo los cambios en el estilo de vida, dieta, u otros factores relacionados con la exposición influyen en los niveles sanguíneos. En un estudio de trabajadores expuestos a PFOS, la mortalidad por cáncer de vejiga fue elevada entre las personas con al menos un año de exposición, pero este hallazgo se basó en una incidencia de sólo tres casos (Lindstrom y col., 2011). En una reevaluación posterior de esta cohorte, se encontró una incidencia de cáncer de vejiga similar a la de la población general de Estados Unidos, pero con un riesgo de 1,5 a 2,0 veces mayor para los trabajadores expuestos. Para el PFOA se han realizado más estudios en trabajadores expuestos que para el PFOS. Varios estudios han demostrado una asociación positiva entre la exposición al PFOA y el colesterol, lo que podría tener implicaciones en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Lindstrom y col., 2011). El PFOA también se ha asociado con el ácido úrico elevado, lo que puede provocar hipertensión y enfermedades cerebrovasculares. Algunos estudios han encontrado una asociación entre la exposición al PFOA y el cáncer de próstata, pero los datos son escasos y no permiten determinaciones concluyentes (Lindstrom y col., 2011). Steenland y col., (2010) han realizado una excelente revisión de la evolución de la investigación en esta área. Otros estudios con exposiciones de fondo típicas en la población general son también inconsistentes, pero sugieren una serie de importantes efectos potenciales para la salud. Entre ellos algunos estudios muestran una asociación entre el PFOS y PFOA y la disminución del número de espermatozoides, una asociación negativa con el peso y el tamaño al nacer, niveles sanguíneos altos de PFOS y PFOA han sido relacionados con la actual enfermedad de la tiroides, y un asociación entre el PFOA y el colesterol (Lindstrom y col., 2011). En general estos datos no son concluyentes y las asociaciones no indican necesariamente causalidad. Por último, recientemente el PFOA ha sido incluido en la lista de “obesógenos”, productos químicos que pueden contribuir a la obesidad (Holtcamp, 2012; Janesick y Blumberg, 2011).



Por otro lado, el uso de los resultados de los estudios con animales de laboratorio para tratar de estimar los posibles efectos en la salud humana es siempre difícil, pero para estos compuestos la dificultad aumenta debido al hecho de que la toxicocinética de las diversas PFASs difiere considerablemente entre las especies de animales (por ejemplo, los monos Rhesus son más sensibles al PFOS que las ratas, mientras que los ratones son los menos sensibles) e incluso entre diferentes géneros dentro de una especie determinada, como se puede observar en las *Tablas 1.2 -1.4* (Lau y col, 2007). Por ejemplo, la vida media de PFOA en ratas hembra es de aproximadamente cuatro horas, mientras que en ratas machos de la misma cepa está más cerca de seis días (Kemper y Jepson, 2003). En los ratones, la vida media se encontró que era considerablemente más larga (17-19 días), pero el efecto del género era mucho menos pronunciado (Lau y col, 2007). La variabilidad de las especies puede ser debido al diferente comportamiento de estos compuestos en el cuerpo. En los seres humanos, los datos sugieren que las vidas medias son mucho más largas, aproximadamente 5,4 y 3,8 años (medias aritméticas determinadas para trabajadores jubilados expuestos) para el PFOS y PFOA, respectivamente, (Olsen y col., 2007) sin diferencia observada entre los géneros. Mientras que, en general, se ha observado un aumento de la vida media, en proporción a la longitud de la cadena del compuesto, aunque esto no es siempre cierto, por ejemplo el PFHxS (6 carbonos) tiene una vida media de 8,5 años en humanos (Olsen y col., 2007; USEPA, 2009). Si bien la toxicidad aguda de las PFASs es moderada, esta vida media relativamente larga en los seres humanos (persistencia) ha llevado a un aumento de la preocupación sobre los efectos potenciales para la salud a largo plazo (Lindstrom y col., 2011; Rumsby y col., 2009). En la actualidad, tampoco está claro si el PFOS y PFOA actúan por los mismos mecanismos, y las dosis altas y bajas pueden diferir en sus efectos tóxicos. Estudios en animales a dosis altas han indicado la posibilidad de cáncer, retrasos en el desarrollo, trastornos endocrinos, inmunotoxicidad y mortalidad neonatal. Además los PFCAs tienen un interés especial debido a la similitud estructural que tienen con los ácidos grasos endógenos y a sus propiedades tensioactivas de tendencia a acumularse en las interfases que pueden afectar a las características de la membrana. Investigaciones recientes han sugerido que la unión al receptor peroxisomal proliferador-activado de ambos, PFOS y PFOA, puede ser un mecanismo general importante. La activación de tales receptores puede alterar el metabolismo de los ácidos grasos y desempeñar un papel en el cáncer, el crecimiento fetal, el desarrollo hormonal y la función inmune (revisado en COT 2006; EHP 2007).

### **1.2.5. Normativa**

Debido a los diferentes sucesos de contaminación, al hecho de encontrar estos compuestos globalmente distribuidos en el medio ambiente (incluyendo en sangre humana y biota de zonas remotas) y basándose en los efectos sobre diferentes organismos vivos y la salud humana una serie de organismos competentes han emitido diferentes regulaciones y evaluaciones de riesgo sobre las PFASs y varios países están

revisando su actual gestión práctica. También algunas compañías junto con organizaciones han llevado a cabo acciones de control de carácter voluntario. Existe una especial preocupación sobre el riesgo para la salud de estos compuestos en poblaciones sensibles como los niños y los trabajadores expuestos de las plantas de fabricación de PFASs. Algunas regulaciones, valores guía, y otras referencias se resumen en la *Tabla 1.6*. Muchas de estas normativas se basan principalmente en el criterio de precaución para el medio ambiente y desarrollo.

El PFOS y el PFOA están incluidos en la Lista OSPAR de sustancias peligrosas de acción prioritaria y en el año 2009, el PFOS y el perfluorooctil sulfonil fluorado (PFOSF) fueron incorporados al anexo B de la Lista de Contaminantes Orgánicos Persistentes (POPs) del Convenio de Estocolmo, que regula la producción y el uso de los compuestos que son persistentes, bioacumulables, tóxicos y transportados a largas distancias al que se ratificaron 169 países participantes en 2010. El anexo B incluye los compuestos de la categoría de regulación para la restricción de su producción y uso, permitiéndolos solo para fines específicos (UNEP, 2009). Recientemente se ha publicado la Decisión (UE) 2015/633 del Consejo para la inclusión del PFOA y sus compuestos en el anexo A de este Convenio. De acuerdo con la información científica disponible y los informes de revisión, y teniendo debidamente en cuenta los criterios de selección fijados en el anexo D del Convenio, el PFOA, sus sales y las sustancias afines al PFOA que pueden convertirse en PFOA en condiciones ambientales presentan características de contaminantes orgánicos persistentes. El PFOA y su sal de amonio (APFO) se han incluido en la lista de posibles sustancias extremadamente preocupantes por considerarse que cumplen los criterios para ser clasificados como tóxicos para la reproducción de categoría 1B y, en particular, que cumplen también los criterios para ser clasificados como persistentes, bioacumulables y tóxicos. En virtud del artículo 69, apartado 4, del Reglamento (CE) nº 1907/2006, el PFOA y sus compuestos son actualmente objeto de otro expediente presentado a la Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas con el fin de restringir la fabricación, comercialización o uso del PFOA y sus compuestos como tales o como componentes de otras sustancias, en mezclas o artículos.

La USEPA incluyó el PFOS y sus sales, PFOSF, sus homólogos de cadena más larga y más corta y los compuestos relacionados, incluyendo los polímeros que contienen los productos químicos descritos anteriormente, en una serie de importantes normas de nuevo uso (SNUR), que obliga, bajo la Ley de Control de Sustancias Tóxicas (TSCA) de 2003 (USEPA, 2002), a los fabricantes e importadores, la notificación a la USEPA 90 días antes de su uso. (Zushi y col., 2012) A raíz de estas medidas, la USEPA y la principal empresa productora en el mundo de PFOS/PFOSF (3M) emprendieron diversas acciones voluntarias para eliminar la producción de PFOS y compuestos relacionados entre 2000 y 2002. En el año 2005 DuPont, que es uno de los principales productores de PFOA, después de pagar una multa por haber manipulado información de riesgo importante en relación al PFOA, puso en marcha un plan para reducir sus emisiones de esos productos químicos en más de un 85% (en comparación con el año de referencia, 1999) para el año 2007. Finalmente dentro del *Stewardship Program 2010/2015* de la USEPA, las principales empresas productoras en el mundo de PFOA (Arkema, Ashahi, Ciba, Clariant, Daikin, 3M/Dyneon, DuPont, y Solvay Solexis) también emprendieron diversas acciones para reducir las emisiones de

PFOA, sus precursores y homólogos de cadena más larga en un 95 % en comparación con la cantidad en el año 2000 como referencia) para 2010, y al 100 % para el año 2015, respectivamente (USEPA, 2006b). Por lo que se ha sustituido al PFOA por otros compuestos perfluorados como los de cadena más corta (por ejemplo, perfluorohexanoato, PFHxA y perfluorobutano sulfonato, PFBS), que se consideran de menor grado de bioacumulación y toxicidad. De acuerdo con el informe de progreso de la USEPA, cuatro de las ocho empresas de Estados Unidos cumplieron su meta del 2010 a finales del 2008 (USEPA, 2009). Ninguna empresa de fuera de EE.UU. ha cumplido este objetivo, y ciertas empresas aumentaron sus emisiones de precursores de PFOA.

A nivel global, se han llevado a cabo otras acciones voluntarias como la implementación de la reducción de las emisiones de PFOS en los procesos de producción de semiconductores por parte de la *Semiconductor Industry Association* (SIA) y *Semiconductor Equipment and Materials International* (SEMI) (WSC 2009). Adicionalmente, otras regulaciones y controles se han ido aplicando en diferentes países y organismos con el fin de minimizar la contaminación con PFA's. En la Unión Europea, el PFOS y los derivados han sido regulados mediante la directiva 2006/122/EC (*European Commission*, 2006) por la que se imponen limitaciones a la comercialización y al uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos (sulfonatos de perfluorooctano-PFOS), permitiéndose solo en aplicaciones insustituibles como los procesos de fotolitografía, recubrimientos fotográficos, tratamientos anti-vaho para tratamientos de endurecido no decorativos con agentes de chapado/humectantes de cromo (VI) en sistemas controlados de galvanoplastia (es necesario la prevención y el control de la contaminación), y fluidos hidráulicos para la aviación. La regulación se inició en junio de 2008 por los países miembros de la UE (27 países en 2010). Las espumas de lucha contra incendios, que habían estado en el mercado hasta antes del 27 de diciembre de 2006, se prohibieron después del 27 de junio de 2011.

En el ámbito de la política de aguas, recientemente, el PFOS y sus derivados han sido incorporados a la Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo que modifica las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en lo que respecta a las sustancias prioritarias. En esta Directiva, la norma de calidad ambiental (NCA) para el PFOS se ha fijado en 0,65 y 0,13 ng L para la media anual de las aguas continentales y otras aguas superficiales, respectivamente.

En otro ámbito, la concentración ambiental prevista sin efecto (PNEC) se utiliza como valor umbral para la protección de la vida silvestre y como criterio para la evaluación del riesgo ecológico de los contaminantes mediante la comparación de este número con la concentración ambiental prevista (PEC). Un índice PEC/PNEC superior a uno indica un riesgo potencial para los organismos en estudio. Algunas instituciones han sugerido valores de PNEC basándose en estudios toxicológicos. La Agencia de Medio Ambiente del Reino Unido (*UK Environment Agency*) ha sugerido una PNEC de 25 µg/L y 2,5 µg/L para el PFOS en agua dulce y en ambientes marinos, respectivamente (*UK Environment Agency*, 2004). Por su parte, Rostkowski y col. (2006) calcularon un valor PNEC de 50 ng/L en el medio acuático considerando intoxicación secundaria. La información relativa a la PNEC para el PFOA es escasa en comparación con la del PFOS. Según el resultado de un estudio toxicológico en ratas, la gravedad de la toxicidad del PFOA es generalmente menor que la del PFOS. Además, el

potencial de bioacumulación del PFOA parece bajo, por lo que la consideración de la intoxicación secundaria puede no tenerse en cuenta para la PNEC (Zushi y col., 2012).

Como ya se ha mencionado en otros apartados de la presente tesis, el agua potable en concreto se ha identificado como una de las principales vías de exposición humana (Skutlarek y col., 2006). Post y col., (2012) proporcionan una excelente revisión crítica de la literatura reciente sobre el PFOA como un EC del agua potable. Esta revisión demuestra que niveles relativamente bajos de PFOA en el agua potable pueden aumentar sustancialmente la exposición total humana. En consecuencia, a nivel internacional varios organismos competentes han emitido diferentes valores guía para el PFOS y PFOA en el agua potable, que van desde 40 hasta 9000 ng/L (DWI, 2007; NJDEP, 2007, 2009; Renner y col., 2007; Rumsby y col., 2009; USEPA, 2009; Wilhelm y col., 2008), basándose en los efectos sobre la salud humana y aplicando un valor de acción cautelara. Rahman y col., (2014, Tabla 2), Rumsby y col., (2009) y Zushi y col., (2012, Tabla 2) recogen una revisión de estas directrices para diferentes jurisdicciones (USEPA; Minnesota y Nueva Jersey-EEUU; Alemania e Inglaterra). Existen amplias diferencias entre ellas probablemente debido a disparidad en la interpretación de los datos de toxicidad o en los factores de seguridad aplicados para el cálculo de los valores de referencia. La USEPA, además de al PFOS y al PFOA, también ha incluido a PFBS, PFHxS, PFHpA y PFNA en la tercera Lista de Contaminantes Candidatos (UCMR3; USEPA, 2011) para el agua potable que propone 32 compuestos con el objetivo de recoger datos sobre la presencia de estos compuestos y de esta manera ayudar en el desarrollo de futuras regulaciones, en caso de ser necesario (Rahman y col., 2014).

En cuanto a la ingesta diaria tolerable (TDI) en adultos, los valores provisionales (pTDI) establecidos por el Instituto Federal de Evaluación de Riesgos de Alemania (BfR) para el PFOS (BfR 2006) y por el Comité sobre Toxicidad (COT) del Reino Unido, principalmente organizado por expertos, para el PFOS and PFOA (COT 2006a, 2009) están incluidos en la *Tabla 1.6*. Recientemente la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2008) ha recomendado para el PFOA y el PFOS valores de pTDI de 1,5 y 0,15 µg/kg/día, respectivamente, para un adulto. Los diferentes valores de pTDI se han calculado en base a modelos toxicológicos y factores de seguridad diferentes. So y col. (2006) sugirieron pTDIs de PFOS y PFOA para los lactantes de 25 y 333 ng/kg/día, respectivamente, aunque estos valores incluyen en gran medida factores de incertidumbre, tales como la extrapolación de animal a humano, de humano medio a humano sensible, del *Lowest observed adverse effect level* (LOAEL) al *No observable adverse effect level* (NOAEL), de sub-crónica a crónica y así sucesivamente, en su extrapolación.

**Tabla 1.6.** Regulaciones y niveles guía para PFASs (adaptado de Rahman et al., 2014 y Zushi et al., 2012)

Regulación/Guía	País/Organismo	Alcance	Referencia
<b>Producción, uso, importación</b>			
Convenio de Estocolmo sobre POPs	Países que han ratificado dicho Convenio	PFOS y PFOSF: Parcialmente regulados PFOA y su sal de amonio (APFO): Propuesta de inclusión	UNEP (2009b) Decisión 2015/633/UE
Directiva UE	Países miembros UE	PFOS y sus derivados: Parcialmente regulados	Directiva 2006/122/ECOF
SNUR	USEPA	PFOS y sus sales, PFOSF, sus homólogos de cadena más larga y más corta: se requiere notificación cuando se fabriquen o importen	USEPA (2002)
<b>Valores de referencia en agua</b>			
Directiva UE	Países miembros UE	NCA PFOS y sus derivados: 6,5 10 <sup>-4</sup> y 1,3 10 <sup>-4</sup> µg/L para la media anual de las aguas superficiales continentales y otras aguas superficiales, respectivamente 36 y 7,2 µg/L como concentración máxima permisible para el mismo tipo de aguas	Directiva 2013/39/UE
PNEC	UK Environment Agency	PFOS: 25 µg/L en agua dulce y 2,5 µg/L en el medio ambiente marino	UK Environment Agency (2004)
PNEC	-	PFOS: 50 ng/L en el medio acuático considerando intoxicación secundaria	Rostkowski y col. (2006)
<b>Valores guía en agua de consumo</b>			
	MDH (Minnesota, USA)	PFOS, PFOA y PFBA: 0,3; 0,5; y 7 µg/L, respectivamente	MDH (2008)
	NJDEP (New Jersey, USA)	PFOA: 0,04 µg/L	NJDEP (2007)
	USEPA	PFOS y PFOA: 0,2 y 0,4 µg/L, respectivamente	USEPA (2009) 2011
	DWI (Reino Unido)	PFOS y PFOA: 0,3 µg/L en el nivel 1	DWI (2007)
	DWC (Alemania)	PFOS y PFOA: 0,3 µg/L	DWC (2006)
<b>Valores pTDI</b>			
	BfR (Alemania)	PFOS: 0,1 µg/kg peso corporal/día (adulto)	BfR (2006)
	COT (Reino Unido)	PFOS y PFOA: 0,3 y 1,5 µg/kg peso corporal/día, respectivamente (adulto)	COT (2006a, 2009)
	EFSA (UE)	PFOS y PFOA: 0,15 y 1,5 µg/kg peso corporal/día, respectivamente (adulto)	EFSA (2008)
	-	PFOS y PFOA: 0,025 y 0,333 µg/kg peso corporal/día, respectivamente (lactantes)	So y col. (2006)
<b>Otros</b>			
Eliminación voluntaria	Compañía 3M	PFOS y productos químicos relacionados: paro de su producción	3M (2000)
Reducción de emisiones voluntaria	SEMI	PFOS: reducir sus emisiones en el proceso de la producción	WSC (2009)
2010/2015 Stewardship program	PFOA USEPA	PFOA, sus precursores y homólogos de cadena larga: reducción de su emisión en el proceso de producción	USEPA (2009a)

Finalmente, cabe mencionar que mientras que la producción en los EE.UU., Europa y otros países desarrollados está cada vez más regulada, la producción de compuestos perfluorados como el PFOS ha ido aumentando considerablemente en otras regiones (USEPA, 2009) por lo tanto simplemente se ha desplazado la producción de una región a otra (Lindstrom y col., 2011). Por lo tanto, es altamente conveniente llevar a cabo iniciativas reguladoras concertadas para abordar las emisiones de PFASs a escala global (Lindstrom y col., 2011). Además, compuestos homólogos, precursores neutros y nuevas clases de PFASs se siguen produciendo. Nuevas PFASs se están introduciendo, tales como el PFBS y el PFBA, que tienen una vida media mucho más corta (por ejemplo, un mes en los seres humanos para el PFBS) y son menos tóxico. La sal de potasio de PFBS es más soluble que el PFOS y así permanece en la columna de agua, pero es menos tóxico para los organismos acuáticos, y es persistente, pero no bioacumulable (NICNAS 2005). Así, mientras que las alternativas pueden ser menos bioacumulables y tóxicos, aún pueden ser persistentes en el medio ambiente. Como resultado de ello, se requerirán estudios sobre sus productos de degradación y su destino y comportamiento, así como su control en el medio ambiente (Rumsby y col., 2009).

#### **1.2.6. Métodos de análisis**

En la *Figura 1.7* se resumen los métodos de análisis empleados para la determinación de PFASs en el medio ambiente. En 1968 Taves presentó pruebas de dos formas de flúor en la sangre humana, una como ion flúor inorgánico, y otra que estaba estrechamente asociada con la albúmina del suero y que tenía las características de una "molécula grande estable...consistente con la presencia de una molécula de fluorocarbono" (Taves, 1968). Taves utilizó la resonancia magnética nuclear (RMN) para intentar determinar PFOA o un compuesto relacionado en suero de sangre humana, identificando los productos de consumo común para el hogar que se sabe que contienen PFASs como posible fuente de exposición (Taves y col., 1976).

En la década de 1970 se inició la introducción de métodos analíticos para la medición rápida del flúor orgánico en la sangre de los trabajadores ocupacionalmente expuestos con una técnica de reducción a cenizas laboriosa y no específica similar a la utilizada por Taves y col., el método de combustión de Wickbold, pero pronto se pasó a métodos de trabajo menos intensivos (pero aún no específicos) mediante detección por captura electrones o detección por microondas de plasma (3M Company, 1999). Estas técnicas tenían niveles de detección relativamente altos ( $\mu\text{g/mL}$  o ppm) y sólo permitieron la identificación tentativa de analitos diana, aunque fueron adecuadas para la evaluación de los trabajadores altamente expuestos. Kissa (1986) utilizó un método de combustión con detección mediante un electrodo selectivo de iones para determinar el ión fluór. El contenido de flúor de las moléculas orgánicas también

puede medirse mediante otras técnicas, tales como la activación de neutrones y fluorescencia de rayos X. Al igual que los métodos de combustión, estas técnicas no son específicas. Por último, las PFASs aniónicas también puede ser detectadas de forma no específica con el test que mide las sustancias activas al azul de metileno.

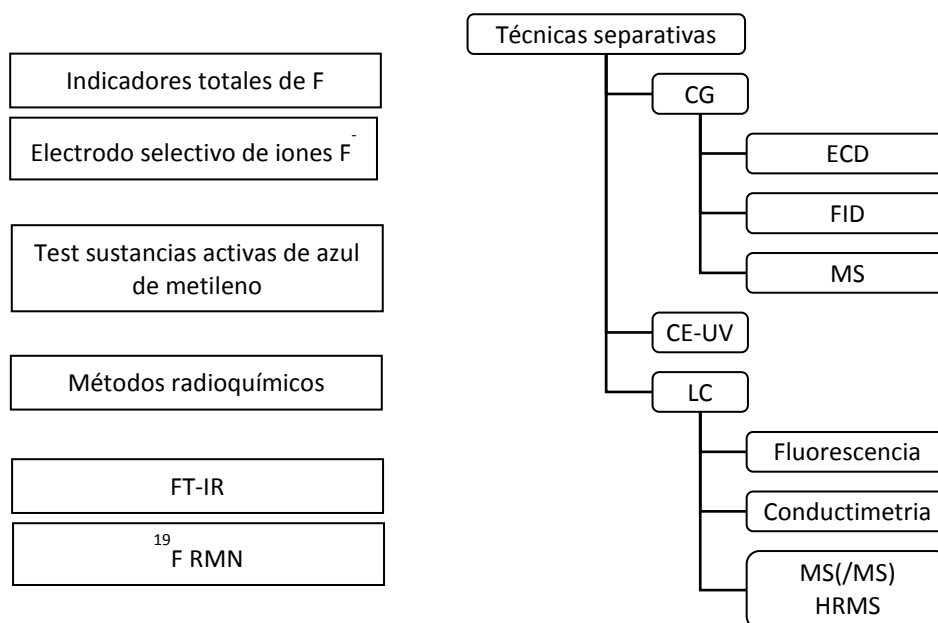


Figura 1.7. Métodos analíticos para la determinación de PFASs.

Recientemente, debido a la identificación de nuevos compuestos fluorados en diferentes matrices los métodos de análisis del contenido total del flúor están recibiendo de nuevo una atención especial. La gran variedad de tipos de PFASs en las muestras analizadas, hace difícil esas determinaciones y consume mucho tiempo, por lo tanto, parece que para un seguimiento de rutina, una alternativa muy útil pueda ser la evaluación de índices totales tales como el flúor orgánico extraíble (Miyake y col., 2007; Yeung y col., 2009), o el flúor orgánico total (Musijowski y col., 2010; Trojanowicz y col., 2011). Como ya hemos mencionado, los métodos clásicos más comunes emplearon combustión en la primera etapa de la metodología para producir la liberación del flúor a partir de los compuestos orgánicos (Kissa, 1986; Fritsche y Hüttenhain, 1994; Sweetser, 1956; Vankateswarlu, 1994). Más actualmente, Miyake y col., (2007) desarrollaron un método para la determinación del flúor total (TF), seguido de un fraccionamiento de las muestras para determinar el flúor inorgánico y orgánico por separado. El método se basó en la cromatografía iónica de combustión (CIC) y permitió analizar el TF a bajos niveles de pocos microgramos por litro en matrices acuosas mediante la reducción de los altos niveles de fondo. Este método puede ayudar a identificar el contenido de las PFASs desconocidas en las muestras.

Por otro lado, algunos trabajos utilizaron la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) para controlar la vida atmosférica de alcoholes

fluorotelómeros en reactores experimentales (Ellis y col., 2003) y para la detección cuantitativa de PFOS y PFBS en solución acuosa (Hebert y col., 2004). Y, también, se han empleado métodos radioquímicos con un analizador de centelleo líquido, para la determinación de PFCAs y el estudio de su distribución y disponibilidad en ratas (Vanden y col., 1991).

Pero, fue sólo después de la introducción de la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS), disponible comúnmente en los laboratorios entre mediados y finales de la década de los años 90 que fue posible medir PFASs a bajas concentraciones (ng/mL, ppb), lo que permitió por primera vez la evaluación precisa de los niveles de fondo de PFASs en matrices biológicas y ambientales (Hansen y col., 2001). En menos de una década de investigación sobre PFASs, una amplia variedad de métodos han sido desarrollados para permitir el análisis de estos compuestos. Como veremos más ampliamente en el *Capítulo 2* de desarrollo de métodos analíticos mediante LC-MS, muchos de estos estudios enfocados al análisis de PFCAs y PFSAs emplean LC-MS/MS para su determinación final, utilizando el modo de adquisición de registro selectivo de transiciones/reacciones (SRM) para una cuantificación fiable. De hecho, el análisis mediante LC-MS y en particular mediante MS/MS es la técnica de referencia en la actualidad para el análisis de PFAAs iónicos. Cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas en tándem con ionización por electroespray (LC-ESI-MS(/MS)) combinado con un *clean-up* y una extracción selectiva proporcionan un método sensible y selectivo para la determinación de PFCAs y PFSAs. Además muchos métodos de detección multi-PFASs se han desarrollado mediante detección LC-ESI-MS(/MS), como los métodos oficiales (*International Standardisation Organisation: ISO 25101; USEPA Method 537*) que utilizan la extracción en fase sólida (SPE) y la LC-MS/MS para el análisis de PFOA y PFOS y algunos PFAAs en agua, respectivamente. Recientemente la espectrometría de alta resolución (HRMS) está emergiendo como una alternativa para el análisis de nuevas PFASs y de productos derivados.

Algunas otras técnicas utilizadas en el análisis LC de PFASs incluyen la LC acoplada a detección por fluorescencia (FD) para la determinación de PFCAs con derivatización previa ya que los PFCAs no tienen un grupo fluorescente (Ohya y col., 1998), la detección conductimétrica con cromatografía de exclusión iónica y también con LC para el análisis de PFAAs (Abe y col., 2001 y 2000) y PFSAs (Hori y col., 2004), respectivamente.

La  $^{19}\text{F}$  RMN se ha usado para la determinación de PFASs en agua (Moody y col., 2001) simultáneamente con su análisis mediante LC-MS/MS. La comparación de los resultados de las dos técnicas mostraron discrepancias debido a la no especificidad de la técnica RMN. Aunque la presencia de compuestos ramificados puede identificarse mediante RMN (Martin y col., 2004), la técnica puede posiblemente dar resultados erróneos de cuantificación.

Por su parte la GC acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS) en combinación con impacto electrónico (EI) e ionización química positiva o negativa (PCI, NCI) también se ha aplicado limitándose al análisis de PFASs no-iónicos (volátiles) como PFOSA, sulfonamidas, alcoholes fluorotelómeros y olefinas (Szostek y Prickett,



2004; Tittlemier y col., 2005; Martin y col., 2002). La GC ofrece una separación cromatográfica muy efectiva, que permite la separación de los isómeros ramificados de las PFASs (De Silva y Mabury, 2004). Los PFCAs se pueden analizar por GC-MS previa derivatización a metilesteres, butilesteres o 2,4-difluoroanilidas (De Voogt y Sáez, 2006). En cambio para los PFASs es difícil formar derivados suficientemente estables por lo que su análisis por GC-MS no es posible. Debido al elevado contenido de flúor en las moléculas de las PFASs, el detector de captura de electrones (ECD) ha sido un candidato claro para el análisis mediante GC y ha sido aplicada en diversos trabajos (Belisle y Hagen, 1980; Dufkova y col., 2009; Kudo y col., 1998), y también la alternativa al ECD del detector por microondas de plasma (Hagen y col., 1981), en el análisis de materiales biológicos. Sin embargo en el caso de matrices complejas, la especificidad del ECD puede ser insuficiente. Ocasionalmente, se ha aplicado la GC acoplada a la detección con ionización de llama (FID). Ylinen y col., (1985) usaron esta técnica para la determinación de PFASs en plasma y orina después de la conversión a sus esteres de benzilo.

Otra técnica de separación es la electroforesis capilar (CE), aunque hasta el momento la aplicación en la determinación de PFASs ha sido bastante limitada. La CE ofrece una eficiencia de separación entre los métodos de LC y GC, y se presenta como una herramienta interesante para el análisis de PFASs polares e iónicas, incluyendo isómeros con cadenas alquílicas ramificadas. Se ha aplicado en algunas ocasiones al análisis de PFAAs (Wójcik y col., 2005 y 2006), pero las limitaciones más importantes han sido la baja respuesta utilizando detección ultravioleta/visible (UV/Vis), ya que estos compuestos no presentan un grupo claramente cromóforo, y la baja sensibilidad utilizando incluso métodos indirectos de detección UV, métodos de pre-concentración (Knob y col., 2012) y de miniaturización (Masar y col., 2005).

### **1.3. Microcistinas**

Las microcistinas (MCs) son la familia de cianotoxinas estudiada con mayor frecuencia. A diferencia de los PFAAs que son antropogénicos, las MCs son sustancias de origen natural que se producen como metabolitos secundarios en el interior de las células de las cianobacterias.

#### **1.3.1. Algas y cianobacterias**

En aguas dulces, el término "algas" se usa para organismos microscópicos muy pequeños, en principio organismos unicelulares, algunos de los cuales forman colonias y así, alcanzan tamaños visibles a simple vista como partículas verdes diminutas. Estos

microorganismos generalmente se dispersan finamente en todo el agua y pueden causar una considerable turbidez si alcanzan densidades altas. Las cianobacterias son organismos con ciertos rasgos de bacterias y algunos de algas. Son similares a las algas en tamaño pero a diferencia de otras bacterias, contienen pigmentos verde-azulados o verdes y por lo tanto, realizan la fotosíntesis. Por ello, también se denominan "algas verde-azuladas". La función ecológica de las cianobacterias planctónicas es similar a la de las algas. Por consiguiente, pueden estar incluidas dentro del término "fitoplancton" y con frecuencia y en términos generales, se denominan "algas" cianofíceas.

Las cianobacterias son organismos procariotas unicelulares oxigénicos muy generalizados considerados como importantes contribuyentes en la formación de la atmósfera de la tierra, ya que son los primeros organismos conocidos capaces de realizar la fotosíntesis (Echlin, 1966) ,y de la fijación del nitrógeno que se remontan a 3,5 billones de años en la evolución. Crecen en medios muy diversos: planctónicamente (es decir, dispersos en la columna de agua), en superficies de cuerpos de agua, así como en superficies terrestres húmedas y las especies bénticas habitan en la superficie del sedimento, y algunas veces forman natas densas. Si bien las células únicas son muy pequeñas (pocos  $\mu\text{m}$  de diámetro), muchas especies forman filamentos o colonias, a veces hasta de uno o dos mm de diámetro. Según su contenido de pigmentos, las cianobacterias pueden parecer verdes, verde azuladas y en casos de algunas especies, también rojo borgoña. Las poblaciones decadentes pueden ocasionalmente tornarse azul brillante, turquesa o incluso púrpura. En contraposición a las algas verdaderas, muchas especies de cianobacterias planctónicas poseen vesículas especializadas de gas intracelular que les permite controlar su flotabilidad y así, buscar activamente las profundidades del agua con condiciones óptimas de crecimiento. Sin embargo, la regulación de la flotabilidad para cambiar la cantidad de gas en las vesículas es lenta.

En las últimas décadas, estos organismos han vuelto a atraer la atención debido a su presencia cada vez más frecuente. En aguas eutrofizadas y en condiciones favorables para su crecimiento se puede observar la proliferación masiva de cianobacterias (afloramiento o *bloom*), con una densidad celular sumamente alta. En casos extremos, estas aglomeraciones pueden tornarse muy densas e incluso, adquirir una consistencia gelatinosa. Con mayor frecuencia, se ven como rayas o natas viscosas que incluso pueden asemejarse a la pintura o jalea verde-azulada. Estas situaciones pueden cambiar rápidamente, incluso en horas. Los afloramientos de cianobacterias generalmente ocurren de acuerdo a una combinación de factores ambientales, por ejemplo, la concentración de nutrientes, la temperatura del agua, la intensidad de la luz, la salinidad, el movimiento del agua o su estancamiento y el tiempo de residencia. En concreto, se conocen diferentes factores que provocan el aumento de nutrientes en los embalses, entre otros como factores naturales: el clima, el transporte de nutrientes por erosión del suelo, la morfología de la cuenca y la descomposición de la materia orgánica; como antropogénicas: los vertidos domésticos e industriales, el uso de fertilizantes en la agricultura, los residuos de la ganadería extensiva, la construcción de estanques, lagos y embalses y su mala gestión (Bell y Codd, 1994). En resumen, la formación de blooms está favorecida a niveles de moderados a altos de nitrógeno y fósforo y a relaciones N:P bajas (menores que 6:1, considerando las concentraciones

totales de N y P) a una temperatura del agua relativamente elevada, de entre 15 a 30°C, y un pH elevado, > 6. Además, las cianobacterias son persistentes y se adaptan muy bien a condiciones extremas como son las épocas de sequía, alta radiación UV, intensidad de luz bajas, concentraciones bajas de nutrientes y niveles altos de salinidad (Falconer, 2005a) y en los ecosistemas son especies dominantes frente a otras especies. Esto es indicativo de que poseen capacidades fisiológicas específicas que les permite competir de forma muy eficiente.

La aparición de estos blooms supone un problema importante para la calidad del agua, no sólo por los problemas de gusto y olor asociados a las cianobacterias y alteración del color del agua, sino porque ciertas especies en algunas condiciones son capaces de producir toxinas como metabolitos secundarios. Algunas cianobacterias producen olores característicos descritos como “olor a humedad, geranio o plantas” durante la etapa de crecimiento de la población (Hayes y Burch, 1989 Tesis M). Sin embargo, no todas las cepas de cianobacterias son tóxicas (Sarazin y col., 2002). Los datos de la bibliografía en varios países indican que se espera toxicidad en  $\frac{3}{4}$  de todas las muestras que contienen cianobacterias (Sivonen y Jones, 1999). En general, la toxicidad no es un rasgo específico de ciertas especies, más bien, la mayoría de especies comprenden cepas tóxicas y no tóxicas. En realidad, solo las cepas que tienen los genes apropiados son capaces de producir cianotoxinas (Kurmayer y Christiansen, 2009) e incluso las cepas tóxicas no producen siempre y de forma automática toxinas, y parece que dependiendo de las condiciones ambientales pueden tener la capacidad para activar o desactivar estos genes. La lista de factores ambientales y de interacciones parece casi tan grande como la lista de cepas capaces de la producción de toxinas. Los factores ambientales incluyen, entre otros, de nuevo a la intensidad de luz y tiempo de exposición, el movimiento del agua y el flujo, las influencias alelopáticas y la competencia por los recursos, herbívoros y el pastoreo, las concentraciones y proporciones de los nutrientes, temperatura y salinidad del agua, la división celular y la tasa de crecimiento (Kosol y col., 2009; Orr y Jones, 1998; Sevilla y col., 2008; Tonk y col., 2005). Si bien las condiciones que conducen a la proliferación cianobacteriana están bien establecidas, no se conoce bien la función fisiológica o bioquímica de las toxinas para las cianobacterias, y los factores que conducen al predominio de cepas tóxicas sobre las no tóxicas no se comprenden en su totalidad. Se cree que la producción de toxinas puede repeler o matar parte del zooplancton, de forma que se considera como uno de los factores que determina el dominio de las cianobacterias en las aguas naturales. En contraposición, también se han descrito algunos metabolitos de cianobacteria farmacológicamente activos, como agentes antitumorales, fungicidas y antivíricos (Moore, 1996).

De forma que la contaminación del agua con estas algas afecta a diferentes sectores, como son la pesca, la acuicultura, la agricultura, con consecuencias negativas a diferentes niveles y un riesgo sanitario para los seres humanos y animales:

*Medio ambientales:* alteración del hábitad, desoxigenación y pérdida de biodiversidad.

*Estéticas:* disminución de la transparencia del agua, formación de espumas y alteración de las características organolépticas del agua.

*Económicas:* incremento del coste en el tratamiento del agua, pérdida de turismo y actividades de recreo, afectación en la pesca.

*Salud:* intoxicación y mortalidades de animales e incluso de personas debido a la producción y liberación de toxinas.

### 1.3.2. Cianotoxinas

Las cianotoxinas son toxinas intracelulares localizadas dentro de las células vivas (Sivonen y Jones, 1999) con una fase de crecimiento exponencial, que pueden ser liberadas al medio ambiente, para formar la toxina disuelta, durante la senescencia celular o la muerte celular y la lisis, pero también por circunstancias derivadas de procesos evolutivos o mediadas ambientalmente tales como la alelopatía o la limitación de nutrientes o a través de procesos de tratamiento del agua como la aplicación de algún alguicida, y que no se liberan con una excreción continua (Babica y col., 2006; Gupta y col., 2001; James y Fawell., 1991). Los niveles totales más altos de cianotoxinas (intracelular más disuelto) se han encontrado en las floraciones y espumas.

Existen más de un centenar de compuestos dentro del grupo de las cianotoxinas que se diferencian fuertemente en su estructura química y propiedades toxicológicas. Entre otras clasificaciones, estas toxinas se agrupan en función del órgano diana sobre el que actúan en: hepatotoxinas (hígado), neurotoxinas (sistema nervioso); alcaloides citotóxicos (diferentes órganos: hígado, riñones, glándulas suprarrenales e intestino delgado) y dermatotoxinas (piel), aunque a menudo tienen también efectos secundarios importantes (*Tabla 1.7*). Esta lista de toxinas y de géneros de cianobacterias va aumentando y está en constante evolución debido a la aplicación de nuevas metodologías y la detección de nuevas toxinas y diferentes géneros de cianobacterias en muestras naturales y en cultivos. En la *Tabla 1.7* se resumen los diferentes tipos de cianotoxinas conocidas hasta la fecha en función de su estructura (péptidos cíclicos, alcaloides heterocíclicos, amino ácidos y lipopolosacáridos) y de su toxicidad.

Las hepatotoxinas incluyen péptidos cíclicos (MCs y nodularinas) y la cilindrospermopsina (CYN), un alcaloide heterocíclico. Las MCs y nodularinas, como veremos más adelante son potentes inhibidores de las proteínas fosfatasa 1 y 2A. Por su parte la CYN inhibe la síntesis de proteínas y aunque se considera hepatotóxica, en vertebrados provoca lesiones, además de en el hígado, en los riñones, bazo, intestino, timo y corazón (Hawkins y col., 1985). Si bien la especie *Cylindrospermopsis raciborskii* se considera tropical y subtropical, recientemente se ha observado esta especie en zonas templadas (Padisák, 1997) e incluso en latitudes más al norte, como Viena (Roschitz, 1996), posiblemente como consecuencia del cambio climático.

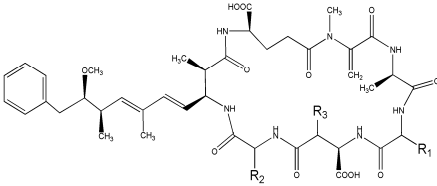
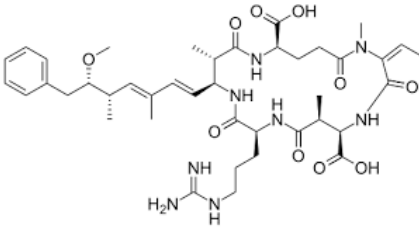
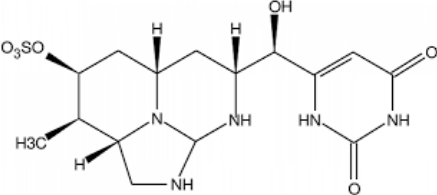
Las neurotoxinas de cianobacterias son alcaloides, excepto el BMAA que es un aminoácido sencillo, que bloquean la neurotransmisión: imitando el efecto de la acetilcolina (anatoxina-a), inhibiendo la acetilcolinesterasa (anatoxin-a(s)), bloqueando los canales de sodio (saxitoxinas) y uniéndose en el cerebro a receptores tipo glutamato (BMAA), produciendo un síndrome neurotóxico que lleva al daño neuronal. Algunos de los signos de intoxicación observados en animales que han ingerido grandes cantidades de neurotoxinas son parálisis, parada respiratoria, temblor muscular y convulsiones (Hunter, 1998). Las saxitoxinas también se conocen como *paralythic shellfish poisons* (PSP), ya que inicialmente fueron caracterizadas en dinoflagelados marinos responsables de las mareas rojas que producen intoxicación paralítica al consumir marisco contaminado (Hashimoto y Noguchi, 1989). Aunque se ha observado que también pueden ser producidas por diferentes géneros de cianobacterias de agua dulce. Las saxitoxinas son una familia de más de 20 alcaloides de carbamato entre los que se diferencian en orden decreciente de toxicidad: las saxitoxinas no sulfonadas (saxitoxinas y neosaxitoxinas, son las más tóxicas), las que contienen un grupo sulfonado (gonyautoxinas), y las que cuentan con dos grupos sulfonados en su estructura (toxinas C).

Las LPS son endotoxinas lipopolisacáridas, importante componente de la pared celular, que producen principalmente fiebre, irritaciones en la piel y reacciones alérgicas, aunque también se han relacionado con trastornos gastrointestinales (Keleti y col., 1979), por lo que son considerados menos tóxicos que las hepatotoxinas y las neurotoxinas (Weckesser y col., 1979).

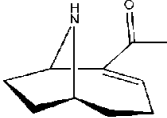
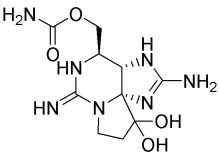
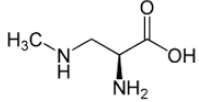
### 1.3.3. Variantes de Microcistinas

Las MCs son la familia de cianotoxinas más extendida en agua superficial. Por ejemplo, su presencia ha sido detectada en Asia, Europa, África del Norte, América del Norte y los países escandinavos (Fristachi y Sinclair, 2008). Su nombre, MCs, proviene del primer género que se asoció con su biosíntesis, *Microcystis*. Sin embargo, las MCs también son producidas por otros géneros de cianobacterias (*Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix-Oscillatoria* y *Nostoc*) y algunas especies contienen más de una toxina (Tabla 1.7). En concreto se conocen un gran número de variantes de MCs, tentativamente identificadas en la bibliografía en función de los aminoácidos y los sustituyentes, pero solo están comercialmente disponibles unos doce estándares analíticos de ellas y continuamente se descubre una mayor variedad de toxinas individuales. En las últimas compilaciones de MCs homólogas, Furey y col., (2008) enumeran un total de 77, del Campo y Ouahid (2010) describen 87 y Bortoli y Volmer (2014) tabulan 94 variantes. En la presente tesis en la Tabla 1.8 se han resumido un total de 94 variantes junto con su fórmula empírica, peso molecular monoisotópico,  $m/z$  de las señales mayoritarias ( $[M+H]^+$ / $[M+2H]^{2+}$ / $[M-H]^-$ ), método analítico usado en la caracterización e identificación de su estructura, organismo y referencia.

**Tabla 1.7.** Toxinas de cianobacteria (Codd 1995; Rinehart y col., 1994; Sivonen 1996; Sivonen y Jones, 1999).

Toxina	Nº variantes	Géneros productores	Estructura química general/ representante	Clasificación estructural	Clasificación según toxicidad
Microcistina	> 90	<i>Microcystis</i> <i>Oscillatoria</i> <i>Anabaena</i> <i>Nostoc</i> <i>Anabaenopsis</i> <i>Hapalosiphon</i> Otros		Péptidos Cíclicos	
Nodularina	~ 6	<i>Nodularia</i> <i>Cyanobacterias simbiotes</i>			Hepatotoxinas
Cilindrospermopsina	> 2	<i>Cylindrospermopsis</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Umezakia</i>		Alcaloides Heterocíclicos	

Continuación Tabla 1.7. Toxinas de cianobacteria (Codd 1995; Rinehart y col., 1994; Sivonen 1996; Sivonen y Jones, 1999).

Toxina	Nº variantes	Géneros productores	Estructura química general/ representante	Clasificación estructural	Clasificación según toxicidad
Anatoxina	3	<i>Anabaena</i> <i>Oscillatoria</i> <i>Microcystis</i> <i>Phormidium</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Cylindrospermum</i>		Alcaloides Heterocíclicos	Neurotoxinas
Saxitoxina	~ 20	<i>Anabaena</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Cylindrospermopsis</i> <i>Lyngbya</i>			
BMAA	1	<i>Nostoc</i>		Amino ácido	
LPS	> 3	<i>Anabaena</i> <i>Microcystis</i> <i>Nodularia</i> <i>Oscillatoria</i>	-	Lipopolisacáridos	Irritantes por contacto

**Tabla 1.8.** Variantes de microcistinas descritas en la bibliografía. Fórmula empírica, peso molecular monoisotópico,  $m/z$  de las señales  $[M+H]^+$ / $[M+2H]^{2+}$ / $[M-H]^-$ , técnica analítica, organismo, referencia.

Variante	F. empírica	MW	$[M+H]^+$	$[M+2H]^{2+}$	$[M-H]^-$	Organismo	Referencia
[D-Asp3]MC-LA	C45H65N7O12	895,4691	896,4764	448,7418	894,4618	<i>M. aeruginosa</i> <sup>b</sup>	Diehnelt y col., 2006
MC-LA	C46H67N7O12	909,4848	910,4920	455,7497	908,4775	<i>M. aeruginosa</i> <sup>c</sup> , <i>M. viridis</i> <sup>c</sup>	Botesy col., 1984, Kaya y Watanabe, 1990
[D-Asp3,D-Glu(OMe)6]MC-LAba	C47H69N7O12	923,5004	924,5077	462,7575	922,4931	<i>M. aeruginosa</i> <sup>b</sup>	Del Campo y Ouahid, 2010
MC-LAba	C47H69N7O12	923,5004	924,5077	462,7575	922,4931	<i>M. aeruginosa</i> <sup>c</sup>	Gathercole y Thier, 1987
MC-LBu	C47H69N7O12	923,5004	924,5077	462,7575	922,4931	<i>M. aeruginosa</i> <sup>b</sup>	2q y col., 1998
[D-Asp3]MC-LL	C48H71N7O12	937,5161	938,5233	469,7653	936,5088	<i>M. aeruginosa</i> <sup>c</sup>	Diehnelt y col., 2006
MC-LL	C49H73N7O12	951,5317	952,5390	476,7731	950,5244	<i>M. aeruginosa</i> <sup>b</sup>	Craig y col., 1993
MC-AR	C46H68N10O12	952,5018	953,5091	477,2582	951,4945	<i>Microcystis</i> spp. <sup>b,c</sup>	Namikoshi y col., 1992a; Lee y col., 1998
MC-RA	C46H68N10O12	952,5018	953,5091	477,2582	951,4945	<i>M. aeruginosa</i> <sup>b</sup>	Lee y col., 1998
MC-YA	C49H65N7O13	959,4640	960,4713	480,7393	958,4568	<i>M. aeruginosa</i> <sup>c</sup>	Botesy col., 1985
[D-Asp3, Dha7]MC-LR	C47H70N10O12	966,5175	967,5247	484,2660	965,5102	<i>Anabaena</i> sp. <sup>c</sup> , <i>M. aeruginosa</i> <sup>b</sup>	Harada y col., 1991b; Sivonen y col., 1992a
[Gly1,D-Asp3]MC-LR	C47H70N10O12	966,5175	967,5247	484,2660	965,5102	Tapiz microbiano bentónico <sup>b</sup>	Wood y col., 2008
[D-Asp3,Dha7]MC-EE(OMe)	C46H63N7O16	969,4331	970,4404	485,7238	968,4259	<i>Anabaena</i> sp. <sup>c</sup>	Namikoshi y col., 1998
MCYST-VF	C51H69N7O12	971,5004	972,5077	486,7575	970,4931	<i>M. aeruginosa</i> <sup>c</sup>	Bateman y col., 1995
[D-Asp3,(E)-Dhb7]MC-LR	C48H72N10O12	980,5331	981,5404	491,2738	979,5258	<i>O. agardhii</i> <sup>b,c</sup>	Sano y Kaya, 1998; Sano y col., 1998
[D-Asp3,(Z)-Dhb7]MC-LR	C48H72N10O12	980,5331	981,5404	491,2738	979,5258	<i>Bloom</i>	Sano y col., 1998
[D-Asp3]MC-LR	C48H72N10O12	980,5331	981,5404	491,2738	979,5258	<i>A. flos-aquae</i> <sup>c</sup> , <i>M. aeruginosa</i> <sup>c</sup> , <i>M. viridis</i> <sup>b</sup> , <i>O. agardhii</i> <sup>c</sup>	Krishnamurthy y col., 1986; Harada y col., 1990b y 1991a; Cremer y Henning, 1991a; Luukkainen y col., 1993
[Dha7]MC-LR	C48H72N10O12	980,5331	981,5404	491,2738	979,5258	<i>Anabaena</i> sp. <sup>c</sup> , <i>Microcystis</i> spp. <sup>b,c</sup> , <i>O. agardhii</i> <sup>c</sup>	Harada y col., 1991b; Namikoshi y col., 1992a; Sivonen y col., 1992a; Luukkainen y col., 1993



**Continuación Tabla 1.8.** Variantes de microcistinas descritas en la bibliografía. Fórmula empírica, peso molecular monoisotópico,  $m/z$  de las señales  $[M+H]^+$ / $[M+2H]^{2+}$ / $[M-H]$ , técnica analítica, organismo, referencia.

Variante	F. empírica	MW	$[M+H]^+$	$[M+2H]^{2+}$	$[M-H]$	Organismo	Referencia
[DMAdda5]MC-LR	C48H72N10O12	980,5331	981,5404	491,2738	979,5258	<i>Microcystis spp.</i> <sup>b</sup> , <i>Nostoc sp.</i> <sup>c</sup>	Namikoshi y col., 1992a; Sivonen y col., 1992b
[Gly1,D-Asp3]MC-LHar	C48H72N10O12	980,5331	981,5404	491,2738	979,5258	Tapiz microbiano bentónico <sup>b</sup>	Wood y col., 2008
MC-AW	C51H66N8O12	982,4800	983,4873	492,2473	981,4727	<i>Bloom</i>	Kaya y col., 2000
[D-Asp3,Dha7]MC-E(OMe)E(OMe)	C47H65N7O16	983,4488	984,4561	492,7317	982,4415	<i>Anabaena sp.</i> <sup>c</sup>	Namikoshi y col., 1998
[Dha7]MC-EE(OMe)	C47H65N7O16	983,4488	984,4561	492,7317	982,4415	<i>Anabaena sp.</i> <sup>c</sup>	Namikoshi y col., 1998
MC-LF	C52H71N7O12	985,5161	986,5233	493,7653	984,5088	<i>M. aeruginosa</i> <sup>c</sup>	Azevedo y col., 1994
[Gly1,D-Asp3,ADMAdda5]MC-LR	C48H70N10O13	994,5124	995,5197	498,2635	993,5051	Tapiz microbiano bentónico <sup>b</sup>	Wood y col., 2008
[(6Z)-Adda5]MC-LR	C49H74N10O12	994,5488	995,5560	498,2817	993,5415	<i>M. viridis</i> <sup>b</sup>	Harada y col., 1990a y b
[D-Asp3,(E)-Dhb7]MC-HiIR	C49H74N10O12	994,5488	995,5560	498,2817	993,5415	<i>P. rubescens</i>	Sano y col., 2004
[D-Asp3,D-Glu(OMe)6]MC-LR	C49H74N10O12	994,5488	995,5560	498,2817	993,5415	<i>A. flos-aquae</i> <sup>c</sup>	Sivonen y col., 1992d
MC-LR	C49H74N10O12	994,5488	995,5560	498,2817	993,5415	<i>A. flos-aquae</i> <sup>c</sup> , <i>M. aeruginosa</i> <sup>c</sup> , <i>M. viridis</i> <sup>c</sup>	Botes y col., 1985; Rinehart y col., 1988; Watanabe y col., 1988; Krishnamurthy y col., 1989
[Dha7]MC-E(OMe)E(OMe)	C48H76N7O16	997,4644	998,4717	499,7395	996,4572	<i>Anabaena sp.</i> <sup>c</sup>	Namikoshi y col., 1998
[L-Ser7]MC-LR	C48H74N10O13	998,5437	999,5510	500,2791	997,5364	<i>Anabaena sp.</i> <sup>c</sup>	Namikoshi y col., 1998
[D-Asp3,Ser7]MC-E(OMe)E(OMe)	C48H76N7O17	1001,4593	1002,4666	501,7370	1000,4521	<i>Anabaena sp.</i> <sup>c</sup>	Namikoshi y col., 1998
[L-Ser7]MC-EE(OMe)	C48H76N7O17	1001,4593	1002,4666	501,7370	1000,4521	<i>Anabaena sp.</i> <sup>c</sup>	Namikoshi y col., 1998
MC-LY	C52H71N7O13	1001,5110	1002,5183	501,7628	1000,5037	<i>M. aeruginosa</i> <sup>b</sup>	Stoner y col., 1989
MC-YL	C52H71N7O13	1001,5110	1002,5183	501,7628	1000,5037	<i>M. aeruginosa</i> <sup>b</sup>	Del Campo y Ouahid, 2010
[D-Asp3, ADMAdda5]MC-LR	C49H72N10O13	1008,5280	1009,5353	505,2713	1007,5208	<i>Nostoc sp.</i> <sup>c</sup>	Namikoshi y col., 1990; Sivonen y col., 1990
[D-Asp3,ADMAdda5,Dhb7]MC-LR	C49H72N10O13	1008,5280	1009,5353	505,2713	1007,5208	<i>Nostoc sp.</i> <sup>c</sup>	Beattie y col., 1998
[D-Glu(OMe)6]MC-LR	C49H72N10O13	1008,5280	1009,5353	505,2713	1007,5208	<i>A. flos-aquae</i> <sup>c</sup> , <i>M. aeruginosa</i> <sup>c</sup>	Sivonen y col., 1992d; Rinehart y col., 1994; Bateman y col., 1995
[Gly1,D-Asp3,ADMAdda5]MC-LHar	C49H72N10O13	1008,5280	1009,5353	505,2713	1007,5208	Tapiz microbiano bentónico <sup>b</sup>	Wood y col., 2008

**Continuación Tabla 1.8.** Variantes de microcistinas descritas en la bibliografía. Fórmula empírica, peso molecular monoisotópico, *m/z* de las señales [M+H]<sup>+</sup>/[M+2H]<sup>2+</sup>/ [M-H], técnica analítica, organismo, referencia.

Variante	F. empírica	MW	[M+H] <sup>+</sup>	[M+2H] <sup>2+</sup>	[M-H]	Organismo	Referencia
MC-HilR	C50H76N10O12	1008,5644	1009,5717	505,2895	1007,5571	<i>Microcystis spp.</i> <sup>b</sup>	Namikoshi y col., 1995
MC-LHar	C50H76N10O12	1008,5644	1009,5717	505,2895	1007,5571	<i>O. tenuis</i> <sup>c</sup>	Brittain y col., 2000
[D-Asp3, Dha7]MC-RR	C47H71N13O12	1009,5345	1010,5418	505,7745	1008,5272	<i>Anabaena sp.</i> <sup>c</sup> , <i>M. aeruginosa</i> <sup>c</sup> , <i>O. agardhii</i> <sup>c</sup>	Krishnamurthy y col., 1989; Sivonen y col., 1992a; Luukkainen y col., 1993
[Gly1,D-Asp3]MC-RR	C47H71N13O12	1009,5345	1010,5418	505,7745	1008,5272	Tapiz microbiano bentónico <sup>b</sup>	Wood y col., 2008
[D-Asp3]MC-LW	C53H70N8O12	1010,5113	1011,5186	506,2629	1009,5040	<i>M. aeruginosa</i> <sup>c</sup>	Robillot y col., 2000
[L-MeSer7]MC-LR	C49H76N10O13	1012,5593	1013,5666	507,2869	1011,5521	<i>Microcystis spp.</i> <sup>b</sup>	Namikoshi y col., 1992a; 1995
[D-Asp3]MC-FR	C51H70N10O12	1014,5175	1015,5247	508,2660	1013,5102	<i>M. aeruginosa</i> <sup>c</sup>	Lee y Chou, 2000
[Dha7]MC-FR	C51H70N10O12	1014,5175	1015,5247	508,2660	1013,5102	<i>Microcystis spp.</i> <sup>c</sup>	Luukkainen y col., 1994
[L-Ser7]MC-E(OMe)E(OMe)	C48H69N7O17	1015,4750	1016,4823	508,7448	1014,4677	<i>Anabaena sp.</i> <sup>c</sup>	Namikoshi y col., 1998
MC-YM	C51H69N7O13S	1019,4674	1020,4747	510,7410	1018,4601	<i>M. aeruginosa</i> <sup>b</sup>	Del Campo y Ouahid, 2010
[ADMAdda5]MC-LR	C50H74N10O13	1022,5437	1023,5510	512,2791	1021,5364	<i>Nostoc sp.</i> <sup>c</sup>	Namikoshi y col., 1990; Sivonen y col., 1990
[D-Asp3,ADMAdda5]MC-LHar	C50H74N14O13	1022,5437	1023,5510	512,2791	1021,5364	<i>Nostoc sp.</i> <sup>c</sup>	Sivonen y col., 1990; 1992b
[D-Asp3,(E)-Dhb7]MC-RR	C48H73N13O12	1023,5502	1024,5574	512,7824	1022,5429	<i>O. agardhii</i> <sup>c</sup> , <i>P. rubescens</i> <sup>c</sup>	Sano y Kaya, 1995 y 1998a; Blom y col., 2001
[D-Asp3]MC-RR	C48H73N13O12	1023,5502	1024,5574	512,7824	1022,5429	<i>Anabaena sp.</i> <sup>c</sup> , <i>M. aeruginosa</i> <sup>c</sup> , <i>O. agardhii</i> <sup>c</sup>	Meriluoto y col., 1989; Sivonen y col., 1992a; Luukkainen y col., 1993
[Dha7]MC-RR	C48H73N13O12	1023,5502	1024,5574	512,7824	1022,5429	<i>Anabaena sp.</i> <sup>c</sup> , <i>M. aeruginosa</i> <sup>c</sup> , <i>O. agardhii</i> <sup>c</sup>	Kiviranta y col., 1992; Sivonen y col., 1992a; Luukkainen y col., 1993
[Gly1,D-Asp3]MC-RHar	C48H73N13O12	1023,5502	1024,5574	512,7824	1022,5429	Tapiz microbiano bentónico <sup>b</sup>	Wood y col., 2008
MC-LW	C54H72N8O12	1024,5270	1025,5342	513,2708	1023,5197	<i>M. aeruginosa</i> <sup>c</sup>	Bateman y col., 1995
MC-M(O)R	C48H72N10O13S	1028,5001	1029,5074	515,2573	1027,4928	<i>Microcystis spp.</i> <sup>b</sup>	Namikoshi y col., 1992a
[Dha7]MC-HphR	C52H72N10O12	1028,5331	1029,5404	515,2738	1027,5258	<i>Anabaena sp.</i> <sup>b</sup>	Namikoshi y col., 1992b
MC-FR	C52H72N10O12	1028,5331	1029,5404	515,2738	1027,5258	<i>Microcystis spp.</i> <sup>b</sup>	Namikoshi y col., 1992a

**Continuación Tabla 1.8.** Variantes de microcistinas descritas en la bibliografía. Fórmula empírica, peso molecular monoisotópico,  $m/z$  de las señales  $[M+H]^+ / [M+2H]^{2+} / [M-H]$ , técnica analítica, organismo, referencia.

Variante	F. empírica	MW	$[M+H]^+$	$[M+2H]^{2+}$	$[M-H]$	Organismo	Referencia
[D-Asp3, Dha7]MC-HtyR	C51H70N10O13	1030,5124	1031,5197	516,2635	1029,5051	<i>Anabaena sp.</i> <sup>b</sup>	Namikoshi y col., 1992b
[D-Asp3]MC-YR	C51H70N10O13	1030,5124	1031,5197	516,2635	1029,5051	<i>Microcystis spp.</i> <sup>b</sup>	Namikoshi y col., 1992d
[Dha7]MC-YR	C51H70N10O13	1030,5124	1031,5197	516,2635	1029,5051	<i>M. aeruginosa</i> <sup>c</sup>	Sivonen y col., 1992c
MC-YM(O)	C51H69N7O14S	1035,4623	1036,4696	518,7384	1034,4550	<i>M. aeruginosa</i> <sup>b</sup>	Elleman y col., 1978; Botes y col., 1985
[ADMAdda5]MC-LHar	C51H76N10O13	1036,5593	1037,5666	519,2869	1035,5521	<i>Nostoc sp.</i> <sup>c</sup>	Namikoshi y col., 1990; Sivonen y col., 1990
[D-Leu1] MC-LR	C52H80N10O12	1036,5957	1037,6030	519,3051	1035,5884	<i>Microcystis spp.</i> <sup>b,c</sup>	Matthiensen y col., 2000; Park y col., 2001
[Gly1,D-Asp3,ADMAdda5]MC-RR	C48H71N13O13	1037,5294	1038,5367	519,7720	1036,5222	Tapiz microbiano bentónico <sup>b</sup>	Wood y col., 2008
[(6Z)-Adda5]MC-RR	C49H75N13O12	1037,5658	1038,5731	519,7902	1036,5585	<i>M. viridis</i> <sup>b</sup>	Harada y col., 1990a y b
[D-Asp3,D-Glu(OMe)6]MC-RR	C49H75N13O12	1037,5658	1038,5731	519,7902	1036,5585	<i>P. rubescens</i>	Grach-Pogrebinsky y col., 2004
MC-RR	C49H75N13O12	1037,5658	1038,5731	519,7902	1036,5585	<i>Anabaena sp.</i> <sup>c</sup> , <i>M. aeruginosa</i> <sup>c</sup> , <i>M. viridis</i> <sup>c</sup>	Kusumi y col., 1987; Painuly y col., 1988; Watanabe y col., 1988; Sivonen y col., 1992a
[D-Ser1,ADMAdda5]MC-LR	C50H74N10O14	1038,5386	1039,5459	520,2766	1037,5313	<i>Nostoc sp.</i> <sup>c</sup>	Sivonen y col., 1992b
[ADMAdda5,MeSer7]MC-LR	C50H76N10O14	1040,5543	1041,5615	521,2844	1039,5470	<i>Nostoc sp.</i> <sup>c</sup>	Sivonen y col., 1992b
[D-Asp3,MeSer7]MC-RR	C48H75N13O15	1041,5607	1042,5680	521,7876	1040,5535	<i>O. agardhii</i> <sup>c</sup>	Luukkainen y col., 1993
[L-Ser7]MC-RR	C48H75N13O13	1041,5607	1042,5680	521,7876	1040,5535	<i>Anabaena sp.</i> <sup>c</sup> , <i>Microcystis spp.</i> <sup>b,c</sup>	Namikoshi y col., 1992c; Luukkainen y col., 1994
[isoseco-1/7]-[D-Asp3]MC-RR	C48H75N13O15	1041,5607	1042,5680	521,7876	1040,5535	<i>P. rubescens</i>	Grach-Pogrebinsky y col., 2004
[D-Asp3,(E)-Dhb7]MC-HtyR	C52H72N10O13	1044,5280	1045,5353	523,2713	1043,5208	<i>O. agardhii</i> <sup>c</sup>	Sano y Kaya, 1998a; Sano y col., 1998b
[D-Asp3,(Z)-Dhb7]MC-HtyR	C52H72N10O13	1044,5280	1045,5353	523,2713	1043,5208	<i>Bloom</i>	Sano y col., 1998
[D-Asp3]MC-HtyR	C52H72N10O13	1044,5280	1045,5353	523,2713	1043,5208	<i>A. flos-aquae</i> <sup>c</sup>	Harada y col., 1991a
[Dha7]MC-HtyR	C52H72N10O13	1044,5280	1045,5353	523,2713	1043,5208	<i>Anabaena sp.</i> <sup>c</sup>	Namikoshi y col., 1992b

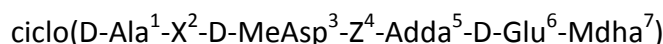
**Continuación Tabla 1.8.** Variantes de microcistinas descritas en la bibliografía. Fórmula empírica, peso molecular monoisotópico, *m/z* de las señales [M+H]<sup>+</sup>/[M+2H]<sup>2+</sup>/ [M-H]<sup>-</sup>, técnica analítica, organismo, referencia.

Variante	F. empírica	MW	[M+H] <sup>+</sup>	[M+2H] <sup>2+</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	Organismo	Referencia
MC-YR	C52H72N10O13	1044,5280	1045,5353	523,2713	1043,5208	<i>M. aeruginosa</i> <sup>c</sup> , <i>M. viridis</i> <sup>c</sup>	Botes y col., 1985; Watanabe y col., 1988
MC-(H4)YR	C52H76N10O13	1048,5593	1049,5666	525,2869	1047,5521	<i>Microcystis spp.</i> <sup>b</sup>	Namikoshi y col., 1992a; 1995
[D-Asp3, (E)-Dhb7]MC-HtyY	C55H69N7O14	1051,4902	1052,4975	526,7524	1050,4830	<i>P. rubescens</i>	Christiansen y col., 2008
[D-Asp3,ADMAAdda5,Dhb7]MC-RR	C49H73N13O13	1051,5451	1052,5524	526,7798	1050,5378	<i>Nostoc sp.</i> <sup>c</sup>	Beattie y col., 1998
[Gly1,D-Asp3,ADMAAdda5]MC-RHar	C49H73N13O13	1051,5451	1052,5524	526,7798	1050,5378	Tapiz microbiano bentónico <sup>b</sup>	Wood y col., 2008
[D-Glu(OC3H6OH)6]MC-LR	C52H80N10O13	1052,5906	1053,5979	527,3026	1051,5834	<i>Microcystis spp.</i> <sup>b</sup>	Namikoshi y col., 1992a; 1995
[D-Asp3]MC-WR	C54H73N11O12	1053,5284	1054,5356	527,7715	1052,5211	<i>M. aeruginosa</i> <sup>c</sup>	Lee y Chou, 2000
MC-HtyR	C52H72N10O13	1058,5437	1059,5510	530,2791	1057,5364	<i>A. flos-aquae</i> <sup>c</sup>	Harada y col., 1991a
[L-Ser7]MC-HtyR	C52H74N10O14	1062,5386	1063,5459	532,2766	1061,5313	<i>Anabaena sp.</i> <sup>b</sup>	Namikoshi y col., 1992b
[D-Asp3,(E)-Dhb7]MC-HtyHty	C56H71N7O14	1065,5059	1066,5132	533,7602	1064,4986	<i>P. rubescens</i>	Christiansen y col., 2008
[ADMAAdda5]MC-RR	C50H75N13O13	1065,5607	1066,5680	533,7876	1064,5535	<i>Bloom</i>	Ferranti y col., 2009
MC-HarHar	C51H79N13O12	1065,5971	1066,6044	533,8058	1064,5898	<i>Bloom</i>	Frias y col., 2006
MC-WR	C54H73N11O12	1067,5440	1068,5513	534,7793	1066,5367	<i>Microcystis spp.</i> <sup>b</sup>	Namikoshi y col., 1992a
[D-Asp3,ADMAAdda5,Dhb7]MC-HtyR	C53H72N10O14	1072,5230	1073,5302	537,2688	1071,5157	<i>Nostoc sp.</i> <sup>c</sup>	Beattie y col., 1998
[D-Asp3,ADMAAdda5]MC-HtyR	C53H72N10O14	1072,5230	1073,5302	537,2688	1071,5157	<i>P. agardhii</i>	Laub y col., 2002
[L-MeLan7]MC-LR	C52H81N11O14S	1115,5685	1116,5758	558,7915	1114,5612	<i>Microcystis spp.</i> <sup>b</sup>	Namikoshi y col., 1995

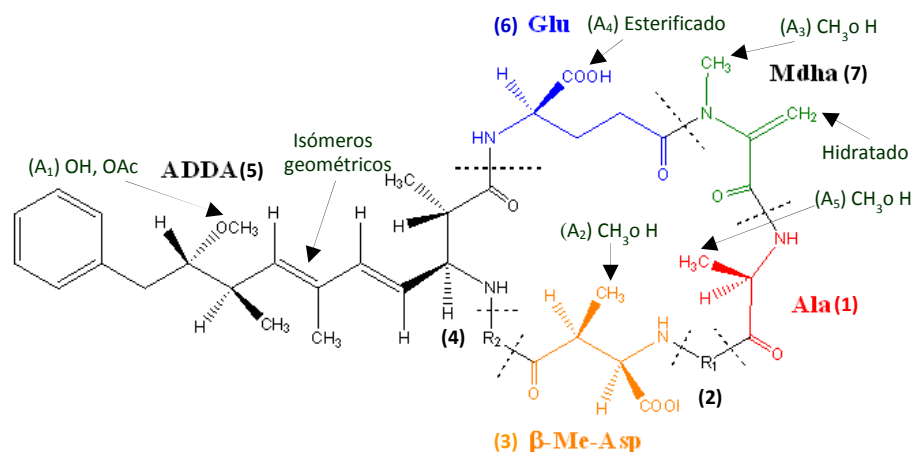
<sup>b</sup>: Toxinas aisladas de blooms; <sup>c</sup>: Toxinas aisladas de cultivos; F.: Fórmula.

### 1.3.4. Estructura, propiedades físico-químicas y estabilidad

Las MCs son productos naturales con pesos moleculares en torno a 800 y 1100 (*Tabla 1.8*) de estructura cíclica formada por siete aminoácidos, como se muestra en la *Figura 1.8*. Cada MC se nombra como MC-XZ, donde X y Z hacen referencia a los aminoácidos variables en las posiciones 2 y 4. De forma que, por ejemplo la MC más común que tiene leucina (inicial L) y arginina (Arg, inicial R) en su estructura, se conoce, por lo tanto, como MC-LR. Su estructura general es:



Están compuestas por tres D-aminoácidos: alanina (Ala), ácido *eritro*-β-metilaspártico (MeAsp), ácido glutámico (Glu); dos L-aminoácidos variables (X y Z); y dos aminoácidos poco habituales, la *N*-metildehidroalanina (Mdha) y el ácido (2*S*,3*S*,8*S*,9*S*)-3-amino-9-methoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4*E*,6*E*-dienóico (Adda) (*Figura 1.8*). De entre ellos, el inusual amino ácido Adda, que hasta la fecha sólo se ha encontrado en MCs y nodularina (una toxina pentapeptida cíclica de las cianobacterias de aguas salobres), a menudo es asociado con la toxicidad de esta molécula debido a su dieno conjugado (Dawson, 1998). Hasta la fecha, se han encontrado variaciones estructurales de las MCs en los siete aminoácidos, aunque la más frecuente es la sustitución de los dos L-aminoácidos en las posiciones 2 y 4 y, en menor grado, la presencia o ausencia de grupos metil en las posiciones 3 (MeAsp), 5 (Adda) y 7 (Mdha). En otros casos, se han observado sustituciones del aminoácido alanina en la posición 1 por leucina o serina y la metil-esterificación o CH<sub>3</sub>O del ácido glutámico en la posición 6 (Brotoli y Volmer, 2014; Rinehart y col., 1994). También se han aislado varios compuestos que poseen estructuras modificadas que presentan 9-*O*-acetil-Adda (Beattie y col., 1998; NamiKoshi y col., 1990 Tesis M p18) o 9-*O*-desmetil-Adda (Namikoshi y col. 1992a), *N*-metilserina (Namikoshi y col. 1992a) o serina (Namikoshi y col. 1992c) en lugar de *N*-metildehidroalanina, dehidrobutirina (Dhb) en lugar de dehidroalanina (Dha) (Beattie y col., 1998; Sano y Kaya, 1995), homoarginina en lugar de arginina (Brittain y col., 2000; Sivonen y col., 1990) y homotirosina en vez de tirosina (Harada y col., 1991a; Namikoshi y col., 1992b). Estas modificaciones cambian la estructura terciaria de la molécula que conlleva a diferencias pronunciadas en la toxicidad así como en las propiedades hidrofóbicas/hidofílicas.



MC	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A <sub>5</sub>	Masa Exacta [M+H] <sup>+</sup> /[M+2H] <sup>2+</sup>
LA	Leu (L)	Ala (A)	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	910,49205
LF	Leu (L)	Phe (F)	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	981,54040
dmLR	Leu (L)	Arg (R)	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> /H	CH <sub>3</sub> /H	H	CH <sub>3</sub>	986,52335
LR	Leu (L)	Arg (R)	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	995,55604
LY	Leu (L)	Tyr (Y)	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	1002,51826
dmRR	Arg (R)	Arg (R)	CH <sub>3</sub> /H	CH <sub>3</sub> /H	CH <sub>3</sub> /H	H	CH <sub>3</sub>	(1024,5574) 512,7824
LW	Leu (L)	Trp (W)	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	1025,53425
RR	Arg (R)	Arg (R)	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	(1038,5730) 519,7902
YR	Tyr (Y)	Arg (R)	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	1045,53531
WR	Trp (W)	Arg (R)	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	1068,55129

Figura 1.8. Estructura de las MCs más comunes. (Entre paréntesis se indica la señal minoritaria).

Las MCs se presentan como sólidos amorfos blancos. Rivasseau y col., (1998), determinaron sus propiedades físicas. La solubilidad de la MC-LR es mayor que 1 g/L y la hidrofobicidad (logKow) para las tres MCs más frecuentes en el agua superficial es: MC-RR (4,4); MC-YR (3,9); y, MC-LR (4,2). El logKow es bastante alto debido que el grupo Adda incrementa la hidrofobicidad de toda la molécula de la MC. Aunque por otro lado las MCs poseen grupos polares como los ácidos carboxílicos y los grupos amino y amido, que hacen que tengan un comportamiento diferente a otros contaminantes orgánicos como lo compuestos organoclorados no polares. De acuerdo con algunos resultados experimentales en medidas de RMN, estas toxinas muestran una mayor solubilidad en metanol, aproximadamente 20 g/L, que en agua. La solubilidad disminuye en DMSO, acetonitrilo y etanol y en disolventes apolares, como el éter etílico, el acetato de etilo y el cloroformo (Harada, 1996). Las MCs se encuentran en el medio acuático en forma neutra o aniónica. Su ionización depende del pH, con valores de pKa de 3,4 para la MC-YR y 3,3 para la MC-RR y MC-LR. En el espectro UV/Vis se observa un máximo de absorción a 238 nm debido al dieno conjugado en el aminoácido Adda, y las variantes que contienen algún aminoácido aromático como el triptófano de la MC-LW presentan otro máximo de absorción a 222 nm, lo que permite su detección por LC-UV.

Las cianotoxinas hepatotóxicas, MCs y nodularinas, son péptidos cíclicos solubles en agua y muy estables en sistemas acuáticos, que pueden persistir durante semanas después de ser liberados de las células (Chen et al., 2008; Edwards et al., 2008; Jones y Orr, 1994), o incluso durante varios meses o años en condiciones naturales (Harada y col., 1996; Sivonen y Jones, 1999). Son extremadamente estables y resistentes a la hidrólisis química, oxidación e incluso a la ebullición y a la hidrólisis enzimática con enzimas usuales como la tripsina (Harada, 1996). Sin embargo, numerosos estudios observaron que la degradación fotoquímica por la luz solar UV y la exposición a bacterias degradantes puede acelerar su eliminación del agua (Bourne y col., 1996; Heresztyn y Nicholson, 1997; Ho y col., 2012; Park y col., 2001; Sivonen y Jones, 1999; Song y col., 2009). Por otro lado, también pueden ser retenidas en las partículas en suspensión o en los sedimentos de los sistemas acuáticos. Wormer y col. (2011) demostraron la gran importancia de los procesos de sedimentación en el destino de las MCs en las aguas dulces, con una cantidad de la toxina asociada a la solución de partículas en el orden de  $\text{mg/dm}^2$ . Sin embargo, otros estudios encontraron que no más del 20% de las toxinas puede ser adsorbido sobre los sedimentos (Lahti y col., 1996; Rapala y col., 1993). Además, se sugirió que la eliminación de las cianotoxinas en este proceso fue el resultado tanto de un mecanismo de adsorción como de biodegradación (Lahti y col., 1996). Por lo tanto, la biodegradación parece ser el destino principal para la mayoría de cianotoxinas en los sistemas acuáticos y el rendimiento relativo de este proceso depende del sitio y de las características del sedimento y de la actividad microbiana específica. Cuando son absorbidos por organismos, se concentran rápidamente en el hígado (Fischer y col., 2000) y se unen con un enlace covalente irreversible a la proteína fosfatasa 1 y 2A bloqueándolas (Dawson, 1998; Gupta y col., 2003; Kuiper-Goodman y col., 1999; MacKintosh y col., 1990). Dependiendo de la dosis y el peso corporal, la inhibición de la proteína fosfatasa puede conducir sucesivamente a la acumulación de proteínas fosforiladas en el hígado, necrosis celular, hemorragia masiva y la muerte. Por otro lado, las MCs pueden ser oxidadas por el ozono y otros agentes oxidantes fuertes y degradadas por la luz ultravioleta intensa. Aunque probablemente estos procesos no contribuyen a la degradación que tiene lugar en el medio natural, serán importantes a la hora de eliminar estas toxinas en los procesos de tratamiento del agua, como se discutirá en el capítulo 4.

Por lo que hace referencia a la estabilidad de las MCs intracelulares, diferentes estudios realizados con cultivos indican que las MCs y nodularinas que se encuentran en el interior de las células de cianobacteria vivas no se degradan o lo hacen muy lentamente (Sivonen, 1990). Del mismo modo los *scums* de *M. aeruginosa* que se secan en las orillas de los lagos, *crusts* (crostas), pueden contener altas concentraciones de MCs durante 5-6 meses (Jones y col., 1995). Al entrar de nuevo en contacto las células de cianobacteria del *crust* con el agua, estas toxinas son liberadas al agua.

### 1.3.5. Toxicidad, vías de exposición y efectos sobre la salud

Como ya hemos mencionado, la toxicidad de las cianotoxinas hepatotóxicas es debida a la inhibición de las proteínas fosfatasa 1 y 2A (PP1 y PP2A), enzimas claves en el control de la estructura, metabolismo, homeostasis y crecimiento en animales y plantas (Cohen, 1989; Eriksson y col., 1990; Honkanen y col., 1990, 1991; MacKintosh, 1994; Hunter, 1995). Las cianobacterias hepatotóxicas en general no son capaces de penetrar en las membranas de células de los vertebrados y, por lo tanto, requieren una vía de entrada que principalmente consiste en la absorción a través de un mecanismo de transporte similar al portador de ácido bílico, que se encuentra en las células hepáticas, y en menor grado también en las células que recubren el intestino delgado (Falconer, 1993; Runnegar y col., 1993). Sobre la permeabilidad de otras membranas celulares a las MCs existen opiniones contradictorias. Posiblemente, los análogos estructurales hidrofóbicos pueden penetrar en algunos tipos de células incluso sin el portador específico (Codd, 1995). Como resultado, la toxicidad de estas cianotoxinas está restringida a los órganos que expresan el transportador de aniones orgánicos en sus membranas celulares tales como el hígado, órgano diana de estas toxinas (Fischer y col., 2005). En los mamíferos, estas toxinas provocan principalmente lesiones en el hígado. El signo interno más claro de intoxicación por hepatotoxinas es un hígado oscuro, con manchas y de un peso aproximadamente el doble del normal debido a la sangre acumulada (Cod y Carmichael, 1982; Richard y col., 1983). La excesiva fosforilación de las proteínas estructurales del hígado debido a la inhibición de las proteínas fosfatasa provoca una gran deformación de las células hepáticas (Eriksson y col., 1989; 1990; Eriksson y Goldman, 1993). Por otro lado, diversos estudios han encontrado que estas hepatotoxinas también inducen estrés oxidativo en células de mamífero (Botha y col., 2004; Bouaicha y Maatouk, 2004; Puerto y col., 2010; Zegura y col., 2003).

Fitzgeorge y col., (1994) demostraron que la toxicidad de la MC es acumulativa: una dosis oral única no causó ningún aumento del peso del hígado, que es una medida de la lesión hepática, mientras que la misma dosis aplicada diariamente durante 7 días causó un aumento del 84% del peso del hígado y por lo tanto, tuvo el mismo efecto que una dosis oral única 16 veces mayor. Esto puede deberse al enlace covalente irreversible de la MC a las fosfatasa proteicas y al daño sustancial de la estructura celular (Falconer, 1993). La lesión hepática subaguda es probable que pase desapercibida debido a que sólo muestra externamente los síntomas notorios una vez que se vuelven graves y además las curvas dosis-respuesta para MCs son exponenciales. Debido a la falta de síntomas evidentes a una exposición moderada, es probable que esta continúe, lo que aumentará el riesgo de daño hepático acumulativo.

La mayoría de las variantes estructurales de MCs son altamente tóxicas con LD<sub>50</sub> (dosis letal de MC a la que se produce la muerte del 50% de la población de ratones) en ratón intraperitoneal de 50 a 800 µg/kg (peso corporal) (Tabla 1.9). La MC-LR y la -LA son las más tóxicas, habiéndose identificado solo unas pocas variantes no



tóxicas. De hecho, la MC-LR está considerada como potencial promotora de tumores (Falconer, 1991; Nishiwaki-Matsushima y col., 1992).

**Tabla 1.9.** Valores de la dosis letal que produce la muerte del 50% de una población (LD<sub>50</sub>) para algunas de las variantes de microcistina.

Análogo	Estructura	LD <sub>50</sub> (µg/Kg intraperitoneal en ratón)
<b>MC-LA</b>	<b>Ciclo (-D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-L-Ala-Adda-D-Glu-Mdha-)</b>	<b>50</b>
MC-LF	Ciclo (-D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-L-Phe-Adda-D-Glu-Mdha-)	Nd
<b>MC-LR</b>	<b>Ciclo (-D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)</b>	<b>50</b>
MC-LW	Ciclo (-D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-L-Trp-Adda-D-Glu-Mdha-)	Nd
MC-LY	Ciclo (-D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-L-Tyr-Adda-D-Glu-Mdha-)	90
MC-RR	Ciclo (-D-Ala-L-Arg-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)	500-800
MC-WR	Ciclo (-D-Ala-L-Try-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)	150-200
MC-YR	Ciclo (-D-Ala-L-Tyr-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)	150-200

Algunos estudios han demostrado que la región Adda-ácido glutámico es crucial para la interacción con la molécula de proteína fosfatasa y su consecuente inhibición (Golberg y col., 1995; Stotts y col., 1993). Por lo tanto esta región juega un papel importante en la hepatotoxicidad de estas toxinas. Algunas modificaciones estructurales hacen variar la toxicidad de la MC. Por ejemplo, la ozonólisis o hidrogenación de la región Adda-ácido glutámico, un cambio en la isomerización del dieno conjugado presente en el aminoácido Adda, de 6(E) a 6(Z) (Harada y col., 1990a; Rinehart y col., 1994) o la esterificación del carbonil libre del ácido glutámico (Stotts y col., 1993), dan lugar a MCs no tóxicas. En cambio, ligeras modificaciones en el aminoácido Adda (Sivonen y col., 1990; Stotts y col., 1993), no reducen la toxicidad de forma significativa.

Hasta el momento las cianotoxinas se han asociado con numerosas intoxicaciones de animales y también han presentado un riesgo para la salud humana. El trabajo de Francis (1878) sobre la proliferación de *Nodularia spumigena* es considerado como la primera referencia de un *bloom* de cianobacterias tóxico, informando de la muerte de ovejas y ganado en Milang a orillas del Lago Alexandria en el Sud de Australia, aunque no se identificaron toxinas. Desde entonces, han tenido lugar diferentes casos de intoxicación y muerte de animales a nivel mundial (Codd y col., 1989; Gunn y col., 1992) y la preocupación creciente asociada a las cianobacterias y sus floraciones potencialmente tóxicas han multiplicado la publicación de estudios sobre el tema.

En humanos, normalmente los incidentes se han limitado a gastroenteritis y a problemas dermatológicos, aunque probablemente, la mayor parte de enfermedades humanas causadas por cianobacterias no ha sido documentada. Posiblemente, son muchos los casos no reconocidos ya que debido a la falta de conocimiento acerca de la

toxicidad de las cianobacterias, ni los pacientes ni los médicos asocian los síntomas con esta causa (Yoo y col., 1995). Los síntomas descritos incluyen "dolor abdominal, náuseas, vómitos, diarrea, dolor de garganta, tos seca, cefalea, ampollas en la boca, neumonía atípica y enzimas hepáticas elevadas en el suero (especialmente la transferasa de gamma-glutamil)" (Carmichael, 199) así como síntomas de fiebre, mareo, fatiga, irritaciones de la piel y ojos. Estos síntomas están relacionados con varias clases de toxinas y géneros de cianobacterias. Más frecuentemente, se ha observado la irritación por contacto a partir de varios géneros cianobacterianos de agua dulce después de la exposición por actividades recreativas (*Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Gloeotricha*). El episodio más importante con consecuencias para la salud humana tuvo lugar el año 1996 en Brasil cuando 56 pacientes de los 130 expuestos murieron a consecuencia de ser tratados mediante hemodiálisis utilizando agua contaminada con MCs (síndrome de Caruaru, Jochimsen y col., 1998).

Las vías de exposición a las cianotoxinas son cinco: la ingesta de agua; y de alimentos; el contacto directo; la posible inhalación accidental de estos compuestos en presencia de un afloramiento durante la práctica de deportes acuáticos, el baño o la ducha; y la introducción vía intravenosa de toxina durante tratamientos de hemodiálisis.

En aguas expuestas a cianobacterias insuficientemente tratadas o durante el disfrute de actividades recreativas y el baño se puede producir la ingesta de toxinas. Las cianotoxinas se acumulan en la cadena trófica. Las MCs pueden acumularse en los tejidos de peces, particularmente en las vísceras (hígado, riñones, etc.), y en crustáceos y marisco (Chorus y Bartram, 1999; Falconer y col., 1992; Lehane, 2000; Prepas y col., 1997). Por lo que las MCs se pueden incorporar a través de la ingesta de estos peces, moluscos y también de legumbres y hortalizas que previamente han sido regados con agua contaminada. El análisis medioambiental y algunos experimentos realizados indican que las plantas, incluidas las verduras comestibles, además de poder acumular MC en la superficie exterior de sus hojas si los cultivos se riegan por aspersión con agua contaminada con toxinas (Codd y col., 1999b), también pueden absorberlas en su interior después de la exposición tópica (Abe y col., 1996; Kós y col., 1995). Por último, paradójicamente, algunas cianobacterias como la *Spirulina platensis* y la *Aphanizomenon flos-aquae* son consumidas por el hombre como suplementos alimenticios y pueden inducir la exposición de los consumidores a cianotoxinas si han sido elaborados a partir de mezclas de especies de cianobacterias tóxicas y no tóxicas que crecen juntas (Chorus y Bartram, 1999; Falconer y col., 1992; Lehane, 2000). La falta de control de las cianotoxinas en suplementos alimenticios, producción que en las dos últimas décadas ha sufrido un gran aumento, podría provocar un elevado riesgo para el consumidor, ya que las cantidades de toxinas ingeridas por esta vía, pueden llegar a ser mucho más elevadas que las ingeridas normalmente por exposición a través del agua de bebida.

La exposición por contacto directo de partes expuestas del cuerpo, incluidas áreas sensibles como oídos, ojos, boca y garganta, pueden causar irritación, dermatitis o picazón y síntomas gastrointestinales como el vómito y la diarrea en los bañistas (Falconer, 2005a). Indicar que en áreas cubiertas por un traje de baño o uno de

neopreno puede empeorar la situación al recoger el material celular que se puede destruir al nadar y liberar la toxina.

Los efectos sobre la salud de las hepatotoxinas descritos en la bibliografía (Codd, 1999) se resumen en la *Tabla 1.10*. Algunos de ellos ya se han mencionado a lo largo del presente capítulo. Destacar las reacciones alérgicas, gastroenteritis, deshidratación, insuficiencia hepática y daño renal como efectos agudos. Y el cáncer primario de hígado y la alteración de los enzimas hepáticos como efectos crónicos.

**Tabla 1.10.** Efectos sobre la salud de las hepatotoxinas

Efectos agudos	Efectos crónicos
Irritación de la piel, ojos y oídos	Hepatocarcinoma
Alergia	Cáncer primario de hígado
Alteraciones respiratorias	Alteración enzimas hepáticos
Mareo y cefaleas	Aberraciones metafase de cromosomas
Gastroenteritis	
Deshidratación	
Insuficiencia hepática	
Alteración de enzimas hepáticos	
Hepatomegalia	
Alteración del citoesqueleto (hepatocitos)	
Daño renal	

### 1.3.6. Normativa

A causa de los problemas ecológicos y de salud que conllevan las cianotoxinas, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó en 1998 un valor guía provisional de 1 µg/L para la MC-LR total (libre más intracelular) en aguas de bebida (OMS, 1998) y considera un NOAEL de 40 µg/kg/día obtenido después de la exposición oral en ratones durante 13 semanas (Fawell y col., 1999). Este valor guía solo tiene en cuenta la MC-LR debido a la falta de información sobre el resto de variantes. Para el cálculo del valor guía se aplicó una ingesta diaria tolerable provisional de 0,04 µg/kg/día, estimada a partir de diversos estudios toxicológicos sobre la MC-LR en animales (Falconer y col., 1994), un consumo medio de 2 L de agua al día por una persona adulta de 60 kg suponiendo que el 80% de la ingesta diaria total se realiza a través del agua de bebida. De forma que este valor guía supone una estimación de la concentración de MC que consumida por una persona a lo largo de su vida no presenta un riesgo significativo para su salud.

A nivel global, existe un creciente interés acerca de la presencia de cianobacterias en las masas de agua de muchos países. Al menos ocho países han iniciado programas nacionales sobre la calidad del agua y los problemas asociados a las cianobacterias (Australia, Brasil, Canada, Finlandia, Gran Bretaña, Japón, Portugal y los Estados Unidos). Además, para disminuir el riesgo de exposición de la población, diferentes países han establecido concentraciones límites para algunas toxinas en los

suministros públicos de agua (aguas de consumo humano y para usos recreativos) basándose en niveles de efecto no adversos (ver *Tabla 1.11*). Los niveles de anatoxina-a, CYN, MC-LR y saxitoxinas en el agua de bebida, oscilan entre 1,0 y 15 µg/L. Las MCs son las cianotoxinas reguladas en más países con un nivel establecido para el agua de consumo normalmente de 1 µg/L, al igual que el nivel guía de la OMS, excepto en Australia (1,3 µg/L) y en Canadá (1,5 µg/L). Pero, a diferencia de la OMS, en muchos casos este valor no aplica tan sólo a la MC-LR sino a la suma de todas las MCs (Australia, Canadá, Brasil, Nueva Zelanda y Sudáfrica), y/o como en la regulación española a veces no se especifica si aplica a la toxina extracelular o también a la intracelular. Hasta el momento se conocen más de 90 variantes, y en muchas regiones la MC-LR no es la MC que se encuentra más frecuentemente, pudiendo, incluso no estar presente. La concentración total de MCs en una muestra debería expresarse como equivalente de concentración o equivalente tóxico (ET) de MC-LR, por ejemplo a partir del análisis mediante LC o de ensayos biológicos, respectivamente, cuando se conoce la toxicidad relativa respecto a la MC-LR de todas las variantes de MC presentes en la muestra, cumpliendo el principio de precaución, al ser esta variante la más tóxica. Por lo que en la bibliografía las concentraciones totales de MCs se suelen expresar como equivalentes de MC-LR (Chorus y Bartram, 1999).

En Australia del Sur, además se han propuesto unos valores de *health alert* para las MCs y nodularinas de 10 µg/L ET de MC-LR (50 000 céls/mL *M. aeruginosa*) y 10 µg/L (50 000 céls/mL *N. spumigena*), respectivamente. A diferencia de los valores guía para aguas de bebida, establecidos para un consumo durante toda la vida, los valores de *health alert* tienen en cuenta los efectos agudos para la salud y, en caso de detectarse estos niveles, las autoridades responsables de la calidad del agua deben comunicarlo inmediatamente a las autoridades sanitarias (Fitzgerald y col., 1999).

En Europa, en concreto, aunque las toxinas de cianobacteria todavía no se encuentran reguladas en el agua de consumo, actualmente, varios países (*Tabla 1.11*), como ya se ha indicado, han adoptado el valor guía recomendado por la OMS de 1 µg/L en su legislación (Chorus, 2012). En concreto, la legislación española incluye a las cianobacterias en el *RD 1341/2007 sobre la gestión de la calidad de las aguas de baño*, estableciendo tres niveles de probabilidad para la proliferación de cianobacterias (bajo, medio y alto) en base a los datos obtenidos en dos años de intensiva vigilancia, y a la MC en el *RD 140/2003 por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano* en España, donde se fijan los parámetros y valores paramétricos a cumplir, basados principalmente en las recomendaciones de la OMS. En este último, se incluye por primera vez la MC como parámetro a controlar cuando exista sospecha de eutrofización en el agua de la captación, obligando a realizar la determinación de estos compuestos a la salida de la estación de tratamiento de aguas potables (ETAP) o depósito de cabecera, fijando un valor máximo de 1 µg/L a partir del 1 de enero de 2004.

Diversos países también han considerado a las toxinas de cianobacterias para las aguas recreacionales y han establecido valores específicos (ver valores entre paréntesis en la *Tabla 1.11*). Como era razonable las concentraciones máximas aceptables son mayores, entre 10 y 25 µg/L, que las definidas para el agua de bebida ya que la exposición es menor en términos de frecuencia (ocasional para el agua de

baño pero crónica para el agua de bebida) y el volumen de agua ingerida también es más pequeño. La directiva para aguas recreacionales de la Unión Europea (EC 1976) no reglamenta la densidad de las algas o cianobacterias, pero requiere un mínimo de 1 m de transparencia (lectura de discos *Secchi*) y recomienda al menos 2 m. La intención original de este parámetro era física, sin embargo, este parámetro es actualmente el único en la directiva que refleja la densidad del fitoplancton y por lo tanto, que puede usarse indirectamente para controlar las algas y cianobacterias. Como el análisis de toxinas en agua es costoso y no se puede realizar con igual regularidad en todas las masas de agua, muchos países han desarrollado diferentes esquemas de gestión con varios niveles de alerta basados en el recuento de células que definen cuando y como intervenir. Por ejemplo, la OMS propuso dos niveles de alerta, uno a 20 000 células/mL y el otro a 100 000 células/mL, este último determina la prohibición de baño. La densidad de cianobacteria en el agua normalmente es el factor desencadenante del análisis de cianotoxinas que puede conducir a medidas administrativas: desde la información pública hasta la restricción o incluso la prohibición del uso y las actividades recreativas. El valor menos restrictivo (100 000 céls/mL) se ha propuesto basándose en los valores guía para las MCs en aguas de bebida, los datos de otras toxinas de cianobacteria y asumiendo que las cianobacterias contienen MCs a niveles próximos al máximo encontrado hasta la fecha (Falconer y col., 1999). Sin embargo, teniendo en cuenta la probabilidad de múltiples vías de exposición (contacto dérmico, inhalación, ingestión) en diferentes actividades de recreo, se ha propuesto el valor guía alternativo de 20 000 céls/mL (Falconer y col., 1999; Pilotto y col., 1997).

**Tabla 1.11.** Visión general sobre la regulación sobre cianotoxinas en agua de consumo y de recreo (basado en Chorus, 2012).

µg/L	MCs	Nod	CYL	ATX-a	HomoATX-a(s)	ATX-a(s)	STX
OMS	1	-	-	-	-	-	-
Alemania	1 (10)	-	0,1	-	-	-	-
Australia	1,3 (10)	-	1	-	-	-	3
Brasil	1	-	15	-	-	-	3
Canada	1,5 <sup>a</sup> (20)	-	-	3,7	-	-	-
Corea	1	-	-	-	-	-	-
China	1	-	-	-	-	-	-
España	1	-	-	-	-	-	-
Francia	1 (25)	-	-	-	-	-	-
Hungría	- (20)	-	-	-	-	-	-
Holanda	1 (20)	-	-	-	-	-	-
Italia	- (25)	-	-	-	-	-	-
Japón	1	-	-	-	-	-	-
Noruega	1	-	-	-	-	-	-
Nueva Zelanda	1 (12)	1	1	6	2	1	3
Polonia	1	-	-	-	-	-	-
República Checa	1 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-
Singapur	1 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-
Turquía	1 (25)	-	-	-	-	-	-
Uruguay	1	-	-	-	-	-	-
Sud Africa	1	-	-	-	-	-	-

El valor entre paréntesis hace referencia al agua de recreo.

<sup>a</sup> El valor aplica a la MC-LR específicamente.

Por su parte, la USEPA incluyó a las cianobacterias (algas verde-azuladas, otras algas y sus toxinas) en la lista de contaminantes candidatos para el agua de bebida (CCL1 de 1998, CCL2 de 2005 y CCL3 de 2009). Basándose en estudios epidemiológicos y toxicológicos, la USEPA se ha centrado en 3 de las más de 100 variantes de cianotoxinas, recomendando a la MC (congéneres LR, YR, RR y LA), la anatoxina-a y la CYN para futuras investigaciones en agua subterránea y potable. La USEPA incluye a las cianobacterias y cianotoxinas en la primera y segunda CCL (CCL1, 1998; CCL2, 2005) y a las cianotoxinas anatoxina-a, CYN y MC-LR, en la CCL (2009) y en el borrador de la CCL 4 (abril de 2015 para su consideración). Recientemente (febrero 2015), la USEPA (2015) ha publicado diferentes documentos sobre cianotoxinas (niveles recomendados para MCs y CYN; soporte respecto a los efectos sobre la salud de anatoxin-a, MCs y CYN; y, recomendaciones sobre las cianotoxinas para los sistemas públicos de gestión del agua potable) después de liderar una reunión pública el 11 de mayo en Arlington. La USEPA ha emitido niveles recomendados para el agua de bebida basándose en la exposición durante diez días (*10-Day Drinking Water Health Advisories*, HAs) por debajo de 0,3 µg/L para MCs y 0,7 µg/L para la CYN en el agua potable para los niños menores de seis años. Para los niños en edad escolar hasta adultos, los niveles de HA recomendados para el agua potable han sido por debajo de 1,6 µg/L para MCs y 3,0 µg/L para CYN. Los niños pequeños son más susceptibles que los niños mayores y adultos, ya que consumen más agua en relación con su peso corporal.

En cuanto a otras vías de exposición como los alimentos, los suplementos alimenticios y la diálisis, estas requieren el estudio y desarrollo de valores guía adecuados en cada caso. Por ejemplo, algunos estudios recientes parecen demostrar que el consumo de pescado y marisco es una posible ruta de exposición a nodularinas y MCs (Karlsson y col., 2003; Magalhães y col., 2001; Mohamed y col., 2003), por lo que se debería realizar una correcta evaluación de los riesgos asociados que pueden comportar para la salud humana. Al estimar el consumo diario de pescado, Magalhães y col., (2001, 2003) y Mohamed y col., (2003) encontraron que las concentraciones de MC superaban la TDI recomendada por la OMS de 0,04 µg/kg/día de MC-LR (Falconer y col., 1999). Todo esto parece poner de manifiesto la necesidad de un sistema de control de *blooms* en piscifactorías y MCs en pescado y otros productos procedentes del medio acuático que permita establecer unos niveles máximos de estos compuestos con el fin de proteger la salud humana (Tesis Doctoral Barco, 2006). En relación con los productos lácteos, Orr y col. (2001) propusieron una concentración máxima en leche de 0,86 µg/L, basándose en la TDI propuesta por la OMS (2,4 µg/día de MC-LR para una persona de 60 kg) y suponiendo un consumo diario de 280 mL de leche (consumo medio en Australia) y un 10% de la TDI por consumo de leche. Como se ha comentado previamente, los suplementos alimenticios pueden ser una fuente de cianobacterias y por esta razón, actualmente, las autoridades sanitarias de varios países están introduciendo algunos sistemas de control de calidad para las cianobacterias y sus toxinas en estos productos que les permita evaluar los riesgos y establecer, en caso necesario, valores guía o valores máximos para las MCs. En esta línea, el Departamento de Agricultura del Estado de Oregón (USA) publicó el primer límite para toxinas de cianobacteria en suplementos alimenticios, siendo éste de 1 µg/g peso seco de cianobacteria para las MCs (ODA, 1997). En cuanto a los tratamientos de diálisis, terapia intravenosa u otros usos clínicos, la OMS en el año 1993 no consideraba necesaria una calidad de agua especialmente elevada (OMS, 1993). Sin embargo, el

caso de la muerte de casi 60 pacientes en Brasil en el año 1996 a consecuencia de la exposición a agua contaminada con MCs por vía intravenosa (~120 L por paciente) en tratamientos de hemodiálisis (síndrome de Caruaru), puso de manifiesto el elevado riesgo que supone la diálisis para los pacientes y la importancia del diseño, instalación, control y mantenimiento de los sistemas de tratamiento de agua en los centros de diálisis para prevenir la exposición de MCs (Jochimsen y col., 1998).

### 1.3.7. Métodos de análisis

La presencia de afloramientos de cianobacterias se detecta y monitoriza de diferentes formas. Recientemente se han publicado excelentes trabajos de revisión sobre los métodos y aproximaciones usadas para la detección de cianotoxinas en muestras medioambientales (Kaushik y Balasubramanian, 2013; Lawton y col., 2008; Merel y col., 2013, Msagati y col., 2006). Algunos de los métodos disponibles son capaces de detectar la presencia de cianotoxinas directamente en las muestras de agua mientras que otros solo pueden determinar indirectamente la presencia, identificando las cianobacterias potencialmente tóxicas (ver *Figura 1.9*). El uso de los dos grupos de métodos con sus respectivas ventajas ofrece información global y completa sobre las cianotoxinas. Uno de los métodos indirectos es la monitorización del fosfato total. Si las concentraciones de fósforo total están por debajo de 0,01 - 0,02 mg/L de P, los crecimientos de masa de cianobacterias son improbables. Hay que asegurarse de que la determinación del fósforo sea total, no sólo de las fracciones disueltas, ya que sólo el fósforo total refleja la capacidad del ecosistema para formar cianobacterias. Para ello, se debe aplicar un método efectivo de digestión para las muestras. Otra aproximación ampliamente utilizada es la medida de la clorofila (Chl  $\alpha$ ), el pigmento fotosintético primario contenido en todos los microorganismos fototróficos. La Chl  $\alpha$  se puede medir in situ en el campo con sensores o se pueden recoger muestras para su análisis en el laboratorio. Sin embargo, la medida de la Chl  $\alpha$  no distingue entre algas y cianobacterias, lo que limita la interpretación de los datos. La medida de pigmentos específicos de las cianobacterias como la ficocianina puede solventar este problema. Además, la combinación del análisis de la Chl  $\alpha$  y la ficocianina proporciona información muy útil sobre la proporción de cianobacterias con respecto a las otras especies de fitoplancton. La experiencia ha mostrado que a concentraciones de Chl  $\alpha$  de más de 40  $\mu\text{g/L}$  y con predominio de cianobacterias, se pueden formar rápidamente natas superficiales. Las acumulaciones severas de natas se observan en concentraciones por encima de 100 - 150  $\mu\text{g/L}$  de Chl  $\alpha$  (medido en aguas abiertas, fuera de las natas del litoral).

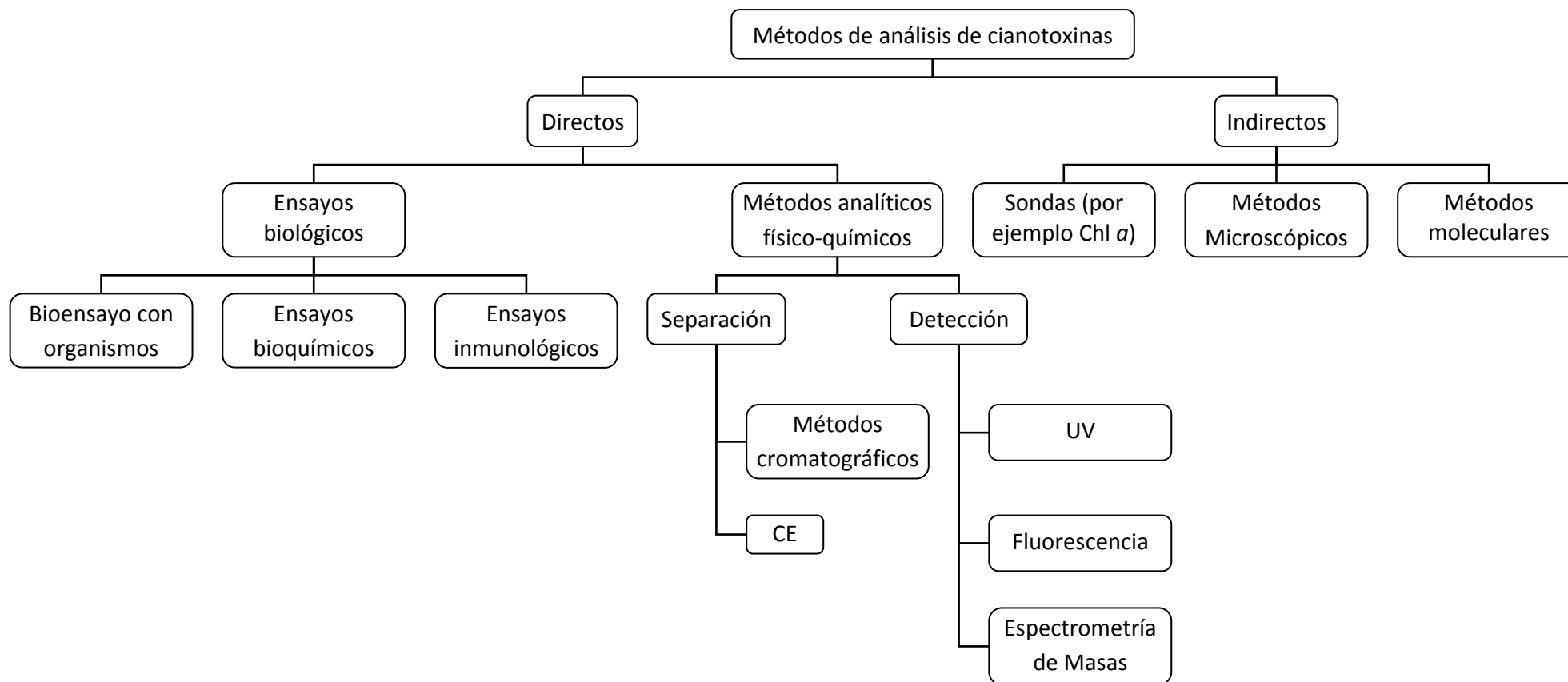


Figura 1.9. Métodos analíticos para la determinación de cianotoxinas.



Otro método común de monitorización de los *blooms* de cianobacterias es la utilización de un microscopio óptico. El análisis microscópico puede limitarse a una investigación breve de las especies dominantes, o extenderse a laboriosos recuentos de células. Pero, es un método que requiere mucho tiempo y personal especializado con un relativo alto grado de experiencia en taxonomía. Además, la identificación microscópica de una especie potencialmente tóxica de cianobacterias no significa que se vaya a producir la toxina. Sin embargo, es un método muy útil en combinación con la identificación química de toxinas en el agua, dando una indicación de la especie productora, y junto con otras técnicas como la identificación de los genes relacionados con la síntesis de la toxina mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Hasta el momento, diferentes métodos de análisis se han desarrollado para la detección e identificación directa de MCs en diferentes matrices (agua, alga, animales y plantas). Como se muestra en la *Figura 1.9*, estos incluyen numerosas aproximaciones implicando métodos convencionales analíticos físico-químicos y biológicos hasta los más recientes y avanzados biosensores y moleculares, cada uno con sus ventajas y limitaciones específicas. Los métodos más simples y menos costosos se pueden utilizar para evaluar de manera rápida los riesgos asociados y permitir tomar medidas preventivas. Mientras que en algunos casos será necesario la identificación y cuantificación de las MCs con técnicas analíticas más sofisticadas que necesiten utilizar equipos especializados y personal experimentado (Harada y col., 1999). En cualquier caso el método debe ser capaz de detectar los niveles de MCs por debajo del límite establecido por la OMS en sus directrices para la calidad del agua de bebida (1 µg/L MC-LR).

Las cianotoxinas pueden detectarse y cuantificarse utilizando métodos biológicos como ensayos *in vivo*, inmunológicos o bioquímicos (funcionales) (ver *Figura 1.9*). El método más simple es el bioensayo de ratón, con la administración de una inyección intraperitoneal de los extractos de toxina en el ratón. Pero presenta una baja sensibilidad y especificidad y existe en torno a él una gran controversia en cuanto a sus implicaciones éticas (Campbell y col., 1994; Falconer, 1993), por lo que en los últimos años se ha estudiado la capacidad de diversos invertebrados (*Artemia*, *Daphnia* o *Thamnocephalus*) para detectar la presencia de MCs (Campbell y col., 1994; Delaney y Wilkins, 1995; Kiviranta y col., 1991b, 1993; Lawton y col., 1994; Swoboda y col., 1994; Törökné, 1999), siendo el ensayo de *Artemia salina* el bioensayo en larvas de crustáceos más utilizado. Las larvas de *Artemia Salina* se exponen a diferentes concentraciones de muestras test diluidas en medios de crecimiento, en placas de microtitulación de 96-pocillos. Después de 18 h a 25°C, la toxicidad se expresa como LC<sub>50</sub> (concentración letal de la muestra que causa la mortalidad del 50% de la población expuesta). Alternativamente, técnicas basadas en principios bioquímicos que reconocen partes características de las toxinas han emergido como métodos cuantitativos y de *screening*. Este es el caso de los ensayos de inhibición de la proteína fosfatasa (PPIAs) y de los inmunoensayos con anticuerpos mono- y poli-clonales. Los dos métodos proporcionan información sobre el contenido total y se fundamentan en diferentes principios, mientras que los PPIA miden el efecto de la inhibición de las MCs en la actividad enzimática, los métodos de inmunoensayo como el ELISA (acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*: 'inmunoensayo de adsorción ligado a enzimas') están basados en el reconocimiento de la afinidad entre anticuerpos y

antígenos. Por ejemplo, el anticuerpo de reactividad cruzada hace que la discriminación de las toxinas individuales sea imposible y todas las toxinas dentro de la misma familia estructural son detectadas simultáneamente. Diferentes kits de PPA y ELISA de fácil manejo (por ejemplo, AbraxisLLC, Pennsylvania, USA; Wako Chemicals, Osaka, Japan; EnviroLogix Inc., Portland, ME, USA; Strategic Diagnostics Inc., Newark, DE, USA) están disponibles comercialmente. PPIA mide la toxicidad de la muestra basándose en técnicas radioisotópicas en los primeros estudios (Holmes, 1991), y posteriormente en técnicas colorimétricas (An y Carmichael, 1994). Las pruebas ELISA, en cambio, no distinguen entre variantes tóxicas y no tóxicas. Sin embargo, los dos métodos son sensibles a interferencias y normalmente presentan una alta especificidad a alguna de las variantes en concreto. Los tests ELISA que detectan las diferentes variantes estructuralmente pueden presentar alguna reactividad cruzada y no responden de igual forma a todas las MCs, por ejemplo, algunos de los test desarrollados inicialmente eran específicos para la MC-LR. Por otro lado, no todas las variantes de MCs reaccionan de igual forma con la proteína fosfatasa y el ensayo PPA es sensible a otros inhibidores como el ácido okadaico.

Basados en este tipo de ensayos, actualmente se han desarrollado algunos biosensores para la detección de MCs. Los biosensores son sensores que utilizan un componente biológico como el elemento de reconocimiento del analito (célula, membrana, macromolécula, etc.). Los biosensores son una alternativa muy interesante debido a su alta sensibilidad, tiempo de análisis corto, bajo coste y facilidad de uso, pero aún están en desarrollo y requieren algunas mejoras. Junto a la variedad de tecnologías de biosensores, han sido publicados logros interesantes en la última década, como la portabilidad y la incorporación de células o redes neuronales como los elementos de biodetección (Vilariño y col., 2013). La portabilidad es difícil de lograr porque requiere un sensor portátil y un método de preparación de la muestra fácil de realizar que se pueda ejecutar fuera del laboratorio. Por ejemplo un método inmunológico ha sido adaptado para desarrollar la medición de las toxinas in situ en el campo (Humpage y col., 2012) pero aún se necesitan más investigaciones para lograr las mismas capacidades de cuantificación que los procedimientos en el laboratorio.

Diversos tipos de biosensores se han adaptado al análisis de toxinas acuáticas: biosensores electroquímicos (amperométricos, de voltametría de pulso diferencial, y sensores capacitivos), ópticos, nanobiosensores electroquimiluminiscentes, inmunosensores piezoeléctricos, biosensores basados en células y aptámeros de DNA (oligonucleótidos o péptidos que se unen a una molécula diana específica). En concreto para el análisis de MCs se han desarrollado inmunosensores amperométricos (Campas y col., 2007a) basados en la inhibición de la PP2A incorporando también sistemas de amplificación para aumentar la sensibilidad (Campas y col., 2007b; 2008), inmunosensores electroquímicos con electrodos de oro de tiourea, nanopartículas de oro, puntos cuánticos de cadmio grabados con voltametría de onda cuadrada de extracción, nanotubos de carbono de pared única y nanocuernos (Loyprasert y col., 2008; Tong y col., 2011; Wang y col., 2009; Yu y col., 2009b; Zhang y col., 2010), biosensores basados en la resonancia de plasmón superficial (SPR-based biosensors) (Herranz y col., 2010), inmunosensores piezoeléctricos basados en una microbalanza de cristal de cuarzo y tecnologías en voladizo de piezoeléctricos excitados de tamaño milimétrico. Recientemente, nuevas tecnologías que emplean anticuerpos

recombinados y receptores sintéticos, también conocidos como polímeros de impresión molecular (MIPs), se han aplicado al desarrollo de ensayos y biosensores para MCs (McElhiney y Lawton, 2005). Estos sistemas de detección nuevos son muy específicos, altamente sensibles, simples, en muchos casos no necesitan procesado de la muestra y económicamente abordables. Como ya se ha mencionado, también han sido empleados con un buen resultado en formatos de SPE para la concentración y purificación de las muestras ambientales antes del análisis mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC).

En tercer lugar, los métodos físico-químicos basados en técnicas cromatográficas acopladas con diferentes principios de detección, por ejemplo, UV (Edwards y col., 1993; Lawton y col., 1994), fluorescencia y espectrometría de masas (MS) (Barco y col., 2002; Diehlnet y col., 2005; Mil'man y col., 2011; Spooft y col., 2001 y 2003), son las más ampliamente utilizados como análisis de rutina, debido a su alta sensibilidad y a la posibilidad de detectar diferentes variantes de MCs, obteniendo importante información estructural. En el *Capítulo 2* sobre desarrollo de métodos se revisaran las técnicas de LC-MS utilizadas para el análisis de MCs, que son objeto de esta tesis. En el método oficial *ISO (20179:2005*, revisado el año 2014) se utiliza la SPE y HPLC-UV para la determinación de MCs. Recientemente, a principios de este año la USEPA ha publicado el método 544 (versión 1.0) sobre la determinación de MCs y nodularina en agua de bebida por SPE y LC-MS/MS. Estas técnicas aunque no pueden estimar la toxicidad de la muestra, proporcionan información cuantitativa crucial sobre la concentración de cada toxina de forma específica (Vilariño y col., 2013). Complementariamente, la RMN permite la determinación estructural de cianotoxinas conocidas y desconocidas (Harada y col., 1995). Su limitación es que requiere una cantidad de muestra considerable (mg) y que las muestras han de ser puras.

Un método simple y de bajo coste es la separación de las MCs mediante cromatografía de capa fina (TLC) que permite un *screening* básico y no necesita equipos especializados ni una experiencia muy específica.

La LC, normalmente con columnas cromatográficas de fase reversa  $C_{18}$  o de cromatografía de líquidos de interacción hidrofílica (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, HILIC) y metanol/agua o agua/acetonitrilo con una cierta proporción de ácido (TFA o ácido fórmico) como fase móvil, es probablemente el método de separación más común para cianotoxinas ya que permite flexibilidad, rapidez y una adaptabilidad a una amplia gama de detectores.

La GC ha sido también aplicada al análisis de cianotoxinas (Kaushik y Balasubramanian, 2013), pero en menor extensión. Ciertamente, las MCs son moléculas grandes y no volátiles, y por lo tanto la separación mediante GC requiere un proceso de preparación de la muestra más complejo incluyendo una etapa de derivatización, sin embargo ha resultado muy útil para detectar toxinas en muestras complejas como los sedimentos, que son difíciles de extraer (Tsuji y col., 2001). Se han utilizado métodos basados en la oxidación u Ozonólisis (Harada y col., 1995) de las MCs hasta producir ácido 3-metoxi-2-metil-4-fenilbutirico (MMPB) y en su detección mediante GC-MS (como metil ester), HPLC con fluorescencia (después de la conversión

en un derivado fluorescente) (Sano y col., 1992; Tanaka y col., 1993; Tsuji y col., 2001) o directamente sin derivatización mediante GC-MS o LC-MS (Harada y col., 1997).

La CE con una separación de los compuestos de acuerdo con su masa y su carga, también ha sido utilizada en el análisis de MCs (Vasas y col., 2004). Sin embargo, aunque la detección por espectrometría de masas o fluorescencia (después de derivatización) puede proporcionar una buena sensibilidad, un estudio reciente indica que la CE no se considera lo suficientemente robusta como para ser utilizada para el análisis de rutina (Kaushik y Balasubramanian, 2013).

Un último método analítico incluye la detección electroquímica. Meriluoto y col. (1998) emplearon la HPLC con detección amperométrica para el análisis de MC-LR, -YR y -RR mediante la oxidación de los residuos arginina o tirosina de la estructura de estas MCs. Sin embargo, la sensibilidad para las cianotoxinas peptídicas que como la MC-LA no contienen amino ácidos oxidables (arginina, triptófano o tirosina) es muy limitada.

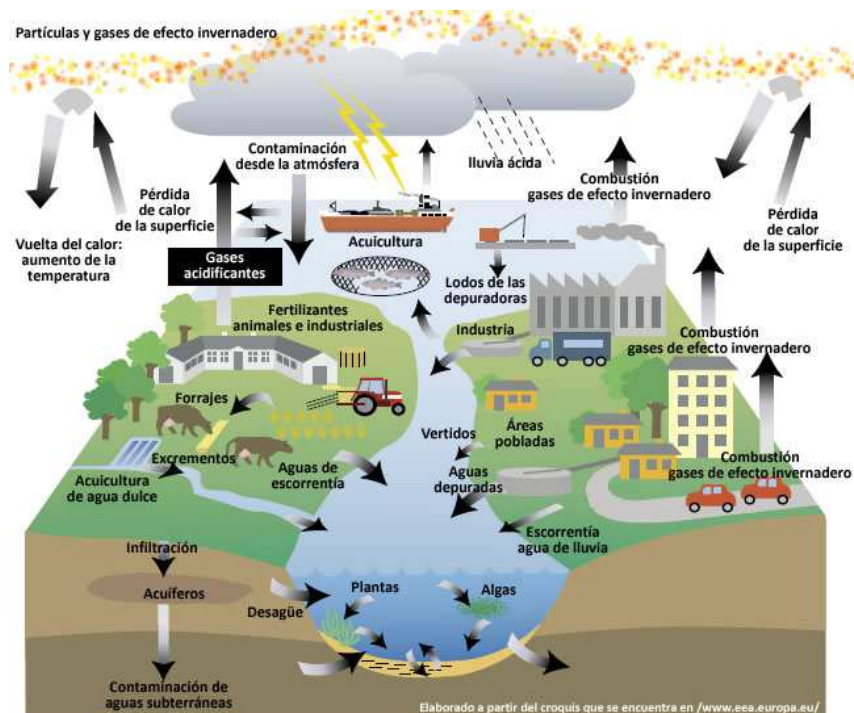
Por último, puesto que, como ya se ha mencionado anteriormente, no todas las cepas de cianobacterias son tóxicas, recientemente, se han desarrollado métodos indirectos moleculares para la detección específica de cianobacterias potencialmente tóxicas en muestras ambientales basados en PCR. Son métodos de detección y caracterización del DNA rápidos, sensibles y específicos focalizados en los genes involucrados en la biosíntesis de las toxinas. Los genes que se sabe que tienen capacidades productoras de toxinas se han identificado progresivamente en determinadas cepas (Kellmann y col., 2006, 2008; Moffitt y Neilan, 2004; Tillett y col., 2000). Pero, aunque la identificación genética es una herramienta excelente para determinar la biosíntesis de las cianotoxinas, existen en la producción de las toxinas factores medio ambientales específicos para cada cepa. En la última década, el gen clúster *mcyA-J* ha sido identificado como el origen de la biosíntesis de las MCs.

Para finalizar, cabe mencionar que aunque una aproximación ideal sería utilizar un único método para extraer y detectar todas las toxinas de una muestra, debido a que entre las cianotoxinas hay compuestos con estructuras químicas muy dispares, existe una limitación para ello ya que su comportamiento en las diferentes etapas de la metodología puede ser muy diferente, por ejemplo diferentes recuperaciones en la pre-concentración y extracción de las muestras. Además, para obtener resultados fiables es interesante y enriquecedor el desarrollo de un multi-método integrado. Una posible estrategia global para el seguimiento de cianotoxinas podría incluir una identificación inicial de la presencia de cianobacterias nocivas por microscopía óptica o mediante las novedosas técnicas moleculares, seguido de un *screening* rápido de las múltiples familias de toxinas conocidas por encima de un umbral predeterminado, eliminando las muestras negativas para un posterior análisis químico. Para finalizar con la confirmación analítica por LC-MS de las muestras positivas y poder detectar metabolitos o productos de degradación y otras toxinas emergentes e incluso desconocidas. En la actualidad, se están logrando avances significativos en el área de la microfluídica que promete integrar diferentes pasos analíticos en un biochip, así como en la teledetección. Sin embargo, aún existen algunas barreras tecnológicas.

#### 1.4. Contaminación Hídrica

El agua es fundamental para la vida tal como la conocemos. Aproximadamente, dos terceras partes de la Tierra son agua y el 70% del cuerpo humano también lo es, sin embargo, es el recurso más amenazado en el mundo.

Durante décadas, una gran variedad y cantidad de compuestos químicos generados en agricultura, industria, medicina, etc., han sido vertidos de manera incontrolada al medio ambiente, y en concreto a las aguas, provocando problemas de contaminación hídrica. La contaminación hídrica se produce por el vertido accidental o controlado de productos químicos y residuos directamente al agua y la eutrofización de las masas de agua. Pero también se puede producir por las escorrentías de estos compuestos y residuos que drenan hacia los ríos y pueden lixiviar a las aguas subterráneas para descargar finalmente en lagos o mares. Según la OMS, el agua está contaminada cuando su composición se ha alterado de modo que no reúne las condiciones necesarias para ser utilizada beneficiosamente para el consumo humano y de los animales. Las fuentes más importantes de contaminación hídrica son los efluentes domésticos, de hospital e industriales y las aguas residuales agrícolas. En la *Figura 1.10* se muestran las diferentes fuentes de contaminación del agua y la distribución y transporte de los contaminantes en ella. Las aguas domesticas provienen de núcleos urbanos y contienen sustancias derivadas de la actividad humana como por ejemplo, productos de limpieza, aceites, jabones, desinfectantes, plastificantes, fármacos, etc. Los efluentes domésticos pueden ser o no tratados, aunque en Europa, la Directiva 91/271/CEE, con fecha 31 de diciembre de 2005, determina que todas aquellas poblaciones europeas con más de 2000 habitante-equivalente deben de disponer de un sistema de tratamiento de aguas residuales, y el resto deben disponer de colectores y un tratamiento adecuado para dichas aguas. La contaminación de origen agrícola deriva principalmente del uso de plaguicidas y fertilizantes que son arrastrados por el agua de riego (*Figura 1.10*), hacia canales, ríos o mares. Lo que también provoca un aumento de nutrientes en el agua y la eutrofización de los sistemas acuosos. La aplicación de plaguicidas en áreas agrícolas libera contaminantes orgánicos al medio ambiente por entrada directa o por procesos de transformación. Una vez aplicados, pueden ser absorbidos por las plantas, aunque la mayoría son depositados en la superficie del suelo, donde pueden ser degradados, adsorbidos en la materia orgánica del suelo o lixiviados, contaminando las aguas subterráneas. Por último, los procesos industriales generan una gran variedad de aguas residuales de orígenes muy distintos. Entre las industrias más contaminantes se encuentran las petroquímicas, agroalimentarias, energéticas, papeleras, siderúrgicas, alimenticias, textiles y mineras, que generan una gran variabilidad de contaminantes (hidrocarburos, detergentes, plaguicidas, fármacos, metales pesados, compuestos perfluorados, etc.).



**Figura 1.10.** Distribución y transporte de los contaminantes orgánicos en el agua, y las principales fuentes de contaminación (European Environment Agency, EEA. Water pollution- overview 2012, <http://www.eea.europa.eu/themes/water/water-pollution>, accedido 31/08/2015).

La contaminación del agua es un problema grave en todo el mundo que requiere urgentemente estrategias para la vigilancia y la implementación de planes que ofrezcan soluciones. Cada día, 2 Mio t de aguas residuales, industriales y agrícolas son descargadas en el agua de todo el mundo (UN WWAP, 2003), que equivalen al peso de toda la población humana. La UN estima que la cantidad de aguas residuales producida anualmente es de alrededor de 1500 km<sup>3</sup>, seis veces más agua que la existente en todos los ríos del mundo (UN WWAP 2003). La falta de un adecuado saneamiento causa la contaminación de los recursos hídricos en todo el mundo, lo que provoca que sea en sí mismo una de las causas más significativas de la contaminación del agua. 2,5 millones de personas en todo el mundo viven sin una adecuada higiene (UNICEF 2009), y más del 70% vive en Asia. En China, que ha crecido rápidamente económicamente, el agua es un recurso escaso, el 8% del agua dulce de todo el mundo ha de abastecer al 22% de la población mundial. Sin embargo, el 33% de las aguas residuales industriales, y el 70% del de los hogares se descarga directamente sin tratar en los ríos y lagos. El 80% de las ciudades de China no tienen instalaciones de tratamiento de aguas residuales y el suministro de agua en el 90% de ellas está contaminado.

En la actualidad, los contaminantes orgánicos emergentes en concreto están recibiendo una especial atención. Como ya se ha descrito en el apartado 1.1., como EC se entiende todo contaminante previamente desconocido o no reconocido como tal, cuya presencia en el medio ambiente no es exclusivamente nueva, pero sí la preocupación por las posibles consecuencias de la misma. Se trata de nuevos

productos químicos y de otros identificados como un riesgo potencial para la salud pública o ambiental, pero que sin embargo, no habían sido reconocidos como tal y de los que su destino, comportamiento y efectos (eco)-toxicológicos no se conocen bien. En algunos casos, se ha demostrado que recientemente se encuentran ampliamente distribuidos en los recursos hídricos, pero no se han controlado habitualmente en los programas de vigilancia de rutina en el medio ambiente porque no estaban regulados. Por lo tanto, no existen datos suficientes para determinar su riesgo. También cambios en el uso y disposición de productos químicos existentes puede crear nuevas fuentes de ECs. Por fortuna, las normas reguladoras están evolucionando debido a la ciencia y a los nuevos métodos de detección que están ofreciendo la capacidad de determinación para estos compuestos.

Los ECs se han detectado en el medio acuático en efluentes de depuradoras, aguas superficiales de ríos y lagos, aguas subterráneas, de lluvia y escorrentía de aguas pluviales urbanas, aguas costeras y marinas, agua potable y del grifo, envasadas y bebidas a base de agua, nieve, sedimentos, fangos y lodos de depuradora y en la fauna (peces, mejillones, bivalvos, cangrejos, tortugas, organismos marinos), debido a la deposición atmosférica, vertidos accidentales, la infiltración en aguas subterráneas y superficiales, la baja eliminación en las EDARs y en los procesos de potabilización y una mala gestión de residuos industriales y domésticos (por ejemplo en lodos de depuradora y por lixiviado de vertederos). Como ya se ha indicado, las EDARs y los procesos de potabilización convencionales no son efectivos para eliminar a muchos de los ECs, e incluso en algunos casos se ha descrito el incremento de sus concentraciones por la biodegradación de compuestos precursores durante estos tratamientos. Como era esperado existe un gradiente decreciente de las concentraciones de los ECs desde los efluentes de las EDARs hasta el agua de mar abierto. A modo de ejemplo, las concentraciones de PFOA y PFOS varían de decenas a cientos de ng por litro en efluentes de EDARs, a un orden de magnitud menor en aguas superficiales de río, a pocos ng por litro en agua de mar de zonas costeras y cientos de pg por litro en aguas de mar abierto.

De la gran cantidad de productos considerados como EC, en la presente tesis nos hemos centrado en el estudio de una familia representativa de las sustancias químicas sintéticas, las PFASs, y de las MCs, como EC de origen natural característicos. Las PFASs son compuestos químicos fabricados por el hombre que han estado en uso desde los años 1950s. La ubicua presencia de PFASs antropogénicos en el medio ambiente ha sido reconocida como un importante problema ambiental a nivel global. Las emisiones de POSF durante los años 1972-2002 se estimaron en 6800–45250 t, de las que se estima que la mayor parte (hasta 45000 t) se liberaron al agua y una pequeña cantidad al aire (hasta 235 t) (Paul y col., 2009). Por otra parte, las emisiones de PFCAs entre los años 1951–2004 se estimaron entre 3200 y 7300 t, que es inferior a la producción basada en POSF (Prevedourus y col., 2006). Sin embargo se asume que las emisiones de PFASs han ido y han de ir en decaimiento debido a las restricciones y regulaciones sobre estos compuestos. Por ejemplo, como ya se ha mencionado anteriormente, la compañía 3M, una de las mayores productoras, voluntariamente paró la producción de POSF en 2002, la USEPA lanzó un programa de administración voluntaria para reducir en un 95% las emisiones de PFOA y sustancias relacionadas en el año 2010, y para trabajar hacia la eliminación de las emisiones y el contenido de

productos para el año 2015 (USEPA, 2006b, 2010 y 2012a).y la Unión Europea (UE) prohibió el uso general de PFOS y sus derivados en junio 2008 (Directiva UE, 2006). Las excepciones a esta restricción incluyen algunos usos como los recubrimientos anti-reflectantes para la fotolitografía y los combustibles hidráulicos para la aviación. Sin embargo, se prevé que la contaminación ambiental y la exposición humana a partir de PFASs no cese en el futuro inmediato debido a su persistencia, la formación a partir de los compuestos precursores y el potencial de producción continuada por otros fabricantes en los EE.UU. y / o en el extranjero (USEPA, 2009; Lindstrom y col., 2011). Es difícil para países desarrollados cambiar su trabajo, y no es práctico para ellos cesar la producción, uso e importación/exportación de un producto. De hecho China, aumentó su producción de PFOS y compuestos relacionados durante los años 2003-2006 (UNEP 2008). Las políticas preventivas tienen desventajas y no tienen suficientemente en cuenta el aspecto de la demanda de crecimiento económico (se producen grandes pérdidas económicas debidas al cese de fabricación) y la imposibilidad de buscar materiales alternativos. Por lo tanto, parece más conveniente encontrar esquemas de control y gestión de la contaminación aceptables para los países en desarrollo, en lugar de la prohibición total del uso y producción.

La alta solubilidad en agua, la simultaneidad de propiedades hidrofóbicas/hidrofílicas y la baja volatilidad de algunos de estos compuestos contribuyen a su presencia en todos los ambientes acuáticos. Los PFASs han sido detectados en nieve, agua de lluvia y escorrentía de aguas pluviales urbanas, aguas costeras y agua de mar, aguas residuales, aguas superficiales de ríos y de lagos, aguas subterráneas, aguas envasadas y bebidas a base de agua como el café y la cola, aguas potables y el agua del grifo, en todo el mundo. El nivel de concentración al que se detectan estos contaminantes en el agua es pg/L o ng/L, aunque concentraciones altas ( $\mu\text{g/L}$  o incluso  $\text{mg/L}$ ) se han detectado en algunos incidentes de contaminación como el caso de aguas superficiales y aguas subterráneas contaminadas después de la utilización de espumas que contiene PFOS en actividades de extinción de incendios o explosiones de depósitos de petróleo (Moody y Field, 1999; Moody y col., 2002, 2003; Rumsby y col., 2009), en algunas masas de agua adyacentes a instalaciones de fabricación de compuestos fluorados (Hansen y col., 2002; *Minnesota Department of Health*, 2008), y en la difusión de desechos industriales en tierras agrícolas (Rumsby et al., 2009).

Históricamente existe una acumulación global de las emisiones de PFASs de fuentes directas e indirectas. Estos compuestos han sido liberados al medioambiente durante su producción y aplicación, y también como resultado de la lixiviación y la degradación de sus productos de consumo. Hoy en día, se considera que las emisiones medioambientales de PFASs tienen lugar vía una diferente variedad de fuentes puntuales y difusas. Las fuentes de contaminación puntuales son aquellas caracterizadas por descargas únicas o discretas en las que los contaminantes se vierten desde un área geográfica aislada y confinada (descargas de efluentes domésticos e industriales, los efluentes de las EDARs, operaciones con residuos peligrosos, drenaje en minas, derrames y descargas accidentales). Por otra parte, las no puntuales involucran fuentes de contaminación difusas y comprenden actividades que abarcan un área mayor (la escorrentía superficial de agricultura y ganadería, explotación del suelo, deposición atmosférica y distintas actividades recreativas) y son más difíciles de



controlar que las fuentes puntuales. Habitualmente, las fuentes puntuales o no puntuales predominan dependiendo de la zona, y la presencia de PFASs en el medio acuoso está muy influenciada por las actividades urbanas, lo que se demuestra por una correlación positiva de sus concentraciones con la densidad de población (Huset y col., 2008; Loos y col., 2009). En general, se consideran fuentes de contaminación de los suelos y cuerpos de agua los efluentes de las EDARs, lixiviados de vertederos, la deposición atmosférica y los lodos de depuradora utilizados como abono. De entre todas ellas, los efluentes de las EDARs se han sugerido como una de las principales fuentes puntuales de PFASs desde donde son transportados a través de los ríos hasta los océanos. Las EDARs convencionales no son efectivas para eliminar las PFASs, incluso la biodegradación de compuestos precursores puede provocar el incremento de las concentraciones de PFCAs y PFSAAs (Schultz y col., 2006; Sinclair y Kannan; 2006). Otra fuente potencial de PFASs son los vertidos de agentes *Aqueous Film Forming Foam* (AFFF), por ejemplo en lugares utilizados para el entrenamiento de actividades contraincendios y en aeropuertos (Moody y Field, 2000; Moody y col., 2002). Además, la descarga de residuos industriales o biosólidos que contienen PFASs se ha descrito como fuente de contaminación de las aguas superficiales y subterráneas por infiltración (Plumlee y col., 2008). Por último, junto con las emisiones directas de PFAAs, las emisiones de precursores de estos compuestos, como los FTOHs y las FASAs, también llamadas fuentes indirectas de PFAAs, pueden desempeñar un papel importante para su acumulación en el medio ambiente, en la vida silvestre y en los seres humanos, debido a su potencial para ser (bio)transformados a PFAAs.

Por su parte, las MCs son heptapéptidos cíclicos hepatotóxicos producidos de forma natural por diferentes géneros de cianobacterias que se han detectado intracelularmente y disueltas en el agua de embalses y lagos de aguas dulces y en estuarios. Las cianobacterias son responsables de la mayoría de las intoxicaciones producidas por toxinas de algas presentes en aguas dulces y salobres. Se han encontrado *blooms* en aguas de lagos eutróficos-hipereutróficos, embalses y ríos de todo el mundo, siendo responsables de episodios esporádicos, pero periódicos, de enfermedad y muerte de animales salvajes y domésticos. Hasta la fecha, se han detectado *blooms* de cianobacterias en al menos 54 países de Europa, América, África, Asia y Oceanía y en 27 estados norteamericanos. Además, esta lista de países no cesa en aumentar debido, principalmente, al control y vigilancia más exhaustivos que se está realizando sobre la aparición de algas y sobre intoxicaciones de animales y problemas de salud en humanos sospechosas de haber sido ocasionadas por cianobacterias tóxicas y al traslado de especies tóxicas de zonas tropicales a zonas más templadas debido al calentamiento global y al cambio climático. Desde el primer caso de muerte de animales debido a cianobacterias descrito por Francis en 1878, han aparecido diversos casos de mortandad de animales (ganado, animales domésticos, mamíferos salvajes, aves y peces) relacionados con *blooms* (Kuiper-Goodman y col., 1999; Yoo y col., 1995). Las cianobacterias también han sido relacionadas con casos de enfermedad en humanos, como alteraciones hepáticas, neurológicas, gastrointestinales, reacciones respiratorias y alérgicas, producidas principalmente por ingesta o contacto con ciertas aguas de recreo, de abastecimiento municipal y complementos alimenticios y por uso de agua contaminada en tratamientos de hemodiálisis. A diferencia de las intoxicaciones producidas por el consumo de marisco contaminado con fitoplancton marino (PSP), especialmente dinoflagelados y

diatomeas, en la bibliografía hasta el momento se han descrito pocos casos claros de enfermedad en humanos asociados a la exposición a toxinas de cianobacteria a través de la dieta. Por ejemplo, entre los años 1920 y 1930 aparecieron un gran número de casos de enfermedad y muerte en humanos en las costas de Polonia y Suecia después de haber ingerido pescado, especialmente su hígado, de lagunas en las que se detectaron *blooms* de cianobacterias, como *Oscillatoria spp* (Berlin, 1948). Sin embargo, algunos estudios de laboratorio (Amorim y Vasconcelos, 1999; Soares y col., 2004; Tencalla y col., 1994; Vasconcelos, 1995; Williams y col., 1997) y el análisis de organismos acuáticos para consumo humano (Chen y col., 1993; Falconer y col., 1992; Kankaanpää y col., 2005; Karlsson y col., 2003; Magalhães y col., 2001; 2003; Mohamed y col., 2003) expuestos a células o toxinas de cianobacteria demuestran la acumulación de MCs y nodularinas en animales acuáticos a niveles que, aunque no son tóxicos para ellos, en algunos casos pueden llevar a un consumo superior a la ingesta diaria tolerable (TDI) recomendada por la OMS, teniendo en cuenta además, que estas toxinas son resistentes al calor, no se destruyen durante la cocción de los alimentos y se bioacumulan en la cadena trófica (Eriksson y col., 1986).

En definitiva, la contaminación provoca unos costes sociales y ambientales muy elevados en cuanto a disminución de la calidad del agua, incremento del coste en el tratamiento del agua, pérdida de turismo y actividades de recreo, afectación en la pesca, alteración del hábitat y pérdida de biodiversidad, intoxicación de animales y problemas de salud en personas). La recuperación de los ecosistemas acuáticos afectados es muy compleja, incluso imposible en muchos casos. Por lo que hay que lograr eliminar o minimizar las fuentes de contaminación en origen. La combinación de normativas, el uso de datos de seguimiento y la aplicación de herramientas de evaluación de riesgos permite la elaboración de una gestión de los recursos hídricos sostenible teniendo en consideración una solución económicamente posible (Geissen y col., 2015).







## 2.1. Introducción

La investigación de los contaminantes orgánicos depende de: los avances en la instrumentación analítica, la síntesis y disponibilidad de estándares, y la sofisticación gradual en las aproximaciones analíticas. Así, la selección de un método de detección específico se basa en la disponibilidad de las diferentes técnicas e instrumentos en los laboratorios, de la experiencia, así como del tipo de información requerida y en muchas ocasiones es útil combinar metodologías. Dos criterios principales a tener en cuenta para obtener datos analíticos fiables son la especificidad y la sensibilidad de las metodologías empleadas.

La espectrometría de masas (MS) es una técnica que proporciona una buena aproximación al análisis de cualquier EC que pueda presentar iones característicos en su espectro de masas. La MS es una herramienta analítica muy potente para identificar compuestos, elucidar el peso molecular e incluso la estructura química de moléculas y para la cuantificación de contaminantes orgánicos en matrices complejas. Además, permite la separación e identificación simultánea de diferentes compuestos en una muestra. En concreto, el acoplamiento de la MS a la cromatografía de líquidos (LC-MS) se aplica al análisis de compuestos poco volátiles, termolábiles y/o polares que son difíciles de analizar por GC/MS. La cantidad de muestra necesaria para el análisis LC-MS es muy pequeña (unos pocos microlitros) y es generalmente compatible con procedimientos simples de preparación de muestra. Normalmente no se necesitan etapas previas de derivatización o extensas purificaciones (Holcapek y col., 2012; Rosen, 2007). Aunque, requieren personal entrenado y altamente cualificado e instrumentos que hasta el momento eran muy costosos.

En el pasado, los equipos de LC-MS no eran muy comunes en los laboratorios de análisis de rutina, sin embargo con el tiempo y los avances tecnológicos su utilización se ha ido extendiendo en cuanto ha aumentado su disponibilidad, se han vuelto más accesibles económicamente y suficientemente robustos. Hoy en día, la aplicación de técnicas instrumentales avanzadas ultra-sensibles de MS (MS/MS) permite simplificar aún más si cabe la preparación de las muestras, ofrece la posibilidad de determinar simultáneamente varias familias de ECs, y/o mejora significativamente los límites de detección (LODs). Además de facilitar la automatización de los métodos.

La utilización de diferentes fuentes de ionización (FAB, ESI, MALDI) y analizadores (Q, QqQ, IT, TOF, LIT, FT-ICR, Orbitrap e instrumentos híbridos como el Q-TOF y el LT-FT-ICR) ha sido aplicada al análisis de numerosas familias de contaminantes orgánicos. Para controlar los niveles de EC ambientales existen principalmente tres tipos de aproximaciones basadas en técnicas de MS:

- (1) Las que permiten obtener las masas nominales (espectrometría de masas de baja resolución, LRMS) y realizan experimentos MS/MS (QqQ o QqLIT) (Faassen y col., 2012; Karlsson y col., 2005; Onghena y col., 2012; Saito y col., 2003; Spoof y col., 2003; Takino y col., 2003; Taniyasu y col., 2005).

- (2) Aquellas que permiten la elucidación de secuencias de fragmentación de masas en tándem en múltiples etapas ( $MS^n$ ) (IT, QqLIT, LTQ-Orbitrap o LT-FT-ICR) (Diehnelt y col., 2005; Zweigenbaum y col., 2000).
- (3) Aquellas capaces de obtener mediciones de masa exacta de precursores y productos por HRMS y fragmentación (TOF, QqTOF, Orbitrap, LT-FT-ICR) (Blay y col., 2011; Cao y col., 2011; Diehnelt y col., 2006; Ferranti y col., 2009 y 2011; Liu y col., 2015; Merel y col., 2009 y 2010; Mil'mana y col., 2011; Munoz y col., 2015; Trier y col., 2011; Wilson y col., 2007).

Las tres aproximaciones son consideradas como herramientas complementarias para el desarrollo de métodos de detección a gran escala. Por un lado, los instrumentos QqQ son los más ampliamente utilizados para el análisis cuantitativo de rutina de analitos pre-seleccionados (*target analysis*). Y por otro lado, las mediciones de masa exacta mediante HRMS, los estudios de fragmentación y los experimentos  $MS^n$  son ideales para permitir la identificación de compuestos desconocidos. En este sentido, recientemente se han publicado interesantes trabajos de revisión sobre la aplicación de la MS en el análisis ambiental y alimentario (Forcisi y col., 2013; Holcapek y col., 2012). Además, varios estudios describen la identificación de EC combinando y comparando diferentes técnicas de MS, medida de masa exacta (AMM) y experimentos MS/MS y  $MS^n$  (Berger y col., 2004; Ferranti y col., 2009 y 2011; James y col., 2005; Krüger y col., 2009; Liu y col., 2015; Munoz y col., 2015; Trier y col., 2011). Incluso, a veces es interesante aplicar técnicas analíticas complementarias a la LC-MS como derivatizaciones, el análisis quiral de aminoácidos, la resonancia magnética nuclear y la espectroscopia UV/Vis, o experimentos de intercambio de deuterio, por ejemplo para la identificación estructural y confirmación de compuestos (Ferranti y col., 2011; James y col., 2005; Krüger y col., 2009; Miles y col., 2012). Por lo general, los métodos convencionales dirigidos a la detección y cuantificación de ECs específicos por LC-MS, utilizan comúnmente la ionización por electroespray (ESI) con MS en tándem (MS/MS) usando un analizador de masas triple cuadrupolo (QqQ). Esta tecnología opera en modo de adquisición SRM proporcionando resultados cuantitativos fiables con un amplio intervalo de linealidad, una adecuada precisión, muy alta sensibilidad y selectividad. Además, se pueden detectar en un mismo análisis LC-MS/MS, analitos de diversos grupos y realizar la determinación cuantitativa de ECs prioritarios en diferentes matrices, como el agua, materiales en suspensión, suelo y biota. Sin embargo, la baja resolución (LR) de los analizadores cuadrupolares hace que la técnica sea susceptible a las interferencias y puedan producirse inexactitudes en la cuantificación, debido al efecto matriz en muestras complejas, con un grave riesgo de presentar falsos positivos y negativos. Además, los métodos convencionales miden sólo ECs seleccionados a priori.

En contraste con los métodos convencionales para el análisis dirigido, en los últimos años los *screening* genéricos para la detección de compuestos químicos basados en cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS) en modo de adquisición *Full Scan* se han convertido en una alternativa atractiva para complementar o reemplazar los métodos específicos

existentes (Hernández y col., 2012). La muestra se analiza de manera integral y en esencia, después del análisis, se extrae la señal de los compuestos de interés a partir de los datos brutos. Esta es una manera eficaz de detectar un gran número de sustancias y una manera económica de determinar ECs no esperados, metabolitos y productos de degradación para los que la aplicación de métodos cuantitativos específicos con el control de calidad analítico asociado no es fácilmente justificable. Otras ventajas a destacar son la capacidad de detección retrospectiva de ECs adicionales sin la necesidad de tener que recoger de nuevo muestra o de volver a re-analizarla, y la detección e identificación de compuestos desconocidos. Para aprovechar plenamente el potencial de esta tecnología en la práctica es necesaria la disponibilidad de softwares de procesamiento de datos adecuados y bases de datos asociadas.

La exactitud y precisión de las medidas de masa han mejorado mucho en la última década, en parte por el aumento de la resolución de los diferentes equipos, pero también por el uso de digitalizadores más rápidos (Marsall y col., 2008). La exactitud de la masa de los diferentes instrumentos disponibles está ampliamente descrita en la bibliografía (Blom y col., 2001; Cortés-Francisco y col., 2011). Además, para determinar la fórmula empírica y la estructura correcta hay que tener en cuenta que es necesaria una exactitud de la medida de masa adecuada y seguir un enfoque heurístico teniendo en cuenta una serie de criterios restrictivos, como el perfil isotópico, el tipo y número de elementos y la regla del nitrógeno, para corregir el cálculo de estas fórmulas empíricas (Kind y col., 2007).

Por lo tanto, en los últimos años hemos sido testigos de un cambio significativo o una alternancia de uso de los analizadores tipo IT, cuadrupolo sencillo y QqQ hacia el empleo de espectrómetros de masas de alta resolución (HR) que proporcionan la masa exacta de los analitos, debido a la emergencia de los instrumentos de transformada de Fourier (Orbitrap y resonancia ciclotrónica, FT-ICR) y los últimos avances hacia la consolidación del análisis mediante analizadores de tiempo de vuelo (TOF), con equipos a más bajo coste y con mejores prestaciones. Dando a los laboratorios la capacidad de realizar los análisis utilizando HRMS, una elevada exactitud de la medida de masa y una mejor especificidad (Lindstrom y col., 2011, Wille y col., 2010). En especial, la aplicación del nuevo analizador de masas de HR Orbitrap, es capaz de confirmar la identificación de contaminantes conocidos de forma rápida y fiable, incluso cuando no hay estándares disponibles (Diehnelt y col., 2005 y 2006; Liu y col., 2015; Merel y col., 2005 y 2006; Mil'man y col., 2011; Munoz y col., 2015). El uso de la HRMS ofrece diversas ventajas (Jiwan y col., 2011). Los falsos positivos y negativos constatados en algunos análisis de LC-MS/MS utilizando un analizador QqQ pueden ser evitados mediante LC-HRMS. La HRMS permite resolver las señales de los analitos de interferencias que co-eluyan con ellos. (Jiwan y col., 2011; Kaufmann y col., 2006; Schürmann y col., 2009). Por otro lado, la posibilidad de dar un falso negativo, cuando las interferencias causan errores, mayores que las tolerancias permitidas por la legislación (Decision 2002/657/EC), en las relaciones de las dos señales (transiciones) registradas en modo SRM mediante el análisis LC-MS/MS, se pueden evitar con la LC-HRMS (Gallart-Ayala y col., 2011). Estos errores en las relaciones entre transiciones hacen inviable la confirmación de la identificación del compuesto mediante MS/MS y



podríamos estar desestimando una sustancia nociva. En conclusión, la HRMS está emergiendo como una aproximación muy útil combinando información cualitativa y cuantitativa conjuntamente, minimizando el efecto de la matriz y las inexactitudes en la cuantificación mediante LC-MS/MS (Kaufmann y col., 2010).

Por su parte, los equipos híbridos (Ham, 2008; Herniman y col., 2005; Kaufmann y col., 2010; Marsall y Hendrickson, 2008), QqTOF, TOF/TOF, LTQ-FT-ICR, LTQ-Orbitrap y Q-Orbitrap son muy útiles en la elucidación de estructuras de compuestos conocidos y desconocidos. Estos instrumentos combinan las capacidades de los diferentes enfoques en MS, por un lado permiten realizar medidas de masa con una exactitud adecuada y, por otro lado realizar experimentos en tándem (MS/MS) o múltiples MS<sup>n</sup> y en consecuencia ofrecer el espectro de masas de los iones fragmentos en HR y con gran exactitud.

Las diferentes metodologías para el análisis de contaminantes orgánicos se van actualizando y van mejorando continuamente, con el fin de aumentar la especificidad, selectividad, sensibilidad y robustez de los métodos analíticos y para reducir el tiempo de análisis y manejo de la muestra, permitiendo el análisis de diferentes tipos de matrices como por ejemplo agua, sedimentos, fangos, algas, peces, orina y sangre y también incluyendo nuevos grupos de ECs.

Entre otras, hoy en día, cabe destacar cuatro tendencias principales en el análisis de contaminantes orgánicos mediante técnicas de MS:

- (1) Un enfoque hacia **métodos de alto rendimiento** para procesar un elevado número de muestras de forma rápida y con un tratamiento y manipulación de la muestra mínimos. En este sentido, técnicas como la cromatografía de líquidos de ultra alto rendimiento (UHPLC) (Castiglioni y col., 2014; Jiang y col., 2013; Neffling y col., 2009; Onghena y col., 2012; Oehrle y col., 2010; Trier y col., 2011), las columnas de cromatografía de núcleo sólido, la extracción en fase sólida (SPE) en línea (Beltrán y col., 2012; Castiglioni y col., 2014; Llorca y col., 2012; Rivasseau y col., 2000; Shan y col., 2011; Wilson y col., 2007; Wode y col., 2012 y 2015), la inyección de muestra directa sin extracción previa o el análisis mediante ionización mediante láser asistida por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF) se han aplicado al análisis de contaminantes orgánicos en trabajos recientes con el fin de realizar análisis rápidos y abaratar costes. En concreto, el análisis por SPE en línea de muestras de agua permite realizar la preparación de la muestra de forma automática, disminuyendo el volumen de muestra necesario y el tiempo de análisis. Por otro lado, el análisis mediante MALDI-TOF es muy interesante en muchas aplicaciones analíticas. Es una técnica de HR sensible que requiere poca manipulación de las muestras, tiene un bajo consumo de muestra, y permite un simple y rápido *screening* de un amplio intervalo de masas moleculares, para la identificación preliminar simultánea de los compuestos presentes en la muestra sin separación cromatográfica previa, obteniendo el perfil de mezclas complejas en muestras medioambientales (Cao y col., 2011; Kawasaki y col., 2009; Welker y col., 2002).

- (2) El desarrollo de **métodos “multi-análisis”**, para el análisis simultáneo de diferentes clases de contaminantes orgánicos (Blay y col., 2011; Chen y col., 2012; Dahlmann y col., 2003; Herrmann y col., 2012; Wode y col., 2012 y 2015; Yen y col., 2011). En concreto, las PFASs y las cianotoxinas, sustancias en estudio en la presente tesis, respectivamente, engloban un amplio tipo de compuestos con diferentes propiedades. De hecho, por ejemplo, no existe un método sencillo pero capaz de detectar todas las cianotoxinas que potencialmente se producen en una muestra de agua. Mientras que los métodos biológicos son por lo general específicos para un tipo de toxina, los métodos físicos como LC-MS también tienen limitaciones y cuantificar varios grupos de cianotoxinas requiere diversos análisis de la muestra utilizando diferentes condiciones cromatográficas. El desarrollo de nuevos métodos capaces de identificar y cuantificar simultáneamente tantas toxinas como sea posible, junto con sus diferentes variantes es un reto interesante.
- (3) El análisis de **nuevos contaminantes ECs** (Cohen y col., 2012; Liou y col., 2010; Liu y col., 2015; Rotander y col., 2015; Sivonen y col., 2010; Trier y col., 2011); **productos de degradación** y **metabolitos**, incluyendo aplicaciones para la identificación fiable, caracterización estructural y elucidación de compuestos mediante MS/MS y HRMS.
- (4) La introducción de **métodos de cuantificación** basados en la dilución isotópica (**IDMS**) utilizando patrones internos, cuantificación ampliamente utilizada por ejemplo en métodos oficiales ISO y USEPA (ISO 25101:2009; Kikuchi y col., 2013; USEPA Method 537). La opción ideal recomendada es la utilización de patrones internos marcados con isótopos estables (Dimitrakopoulos y col., 2010; ISO 25101:2009; Sano y col., 2011; USEPA Method 537). La IDMS es un método de cuantificación fiable y robusto basado en la utilización de un compuesto marcado con isótopos estables ( $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,...) como patrón interno.

En la presente tesis se han estudiado dos familias de ECs desde perspectivas diferentes. El análisis dirigido (*target*) por LC-ESI-MS/MS de dos grupos de PFASs bien definidos, los PFCAs y los PFSAs, y de las MCs más habituales. Y por otro lado, una estrategia integrada de *screening* mediante diferentes técnicas de MS/MS y HRMS para el análisis de MCs, debido a que esta familia de toxinas incluye más de 90 variantes. En ambas metodologías se han puesto a punto, optimizado y validado métodos de extracción, pre-concentración y purificación de alto rendimiento.

A continuación se resumen los avances y desafíos analíticos más significativos en la determinación de PFASs y MCs en agua mediante LC-MS

### **Avances y desafíos analíticos en la determinación de PFASs en agua mediante LC-MS**

Se han publicado diversos estudios exhaustivos, centrándose en el tratamiento previo de la muestra, la extracción, la purificación y la determinación instrumental para el análisis de PFASs (Jahnke y col., 2009; Van Leeuwen y col., 2007; Voogt y col., 2006) En concreto, en la *Tabla 2.1* se revisan algunas de las principales metodologías para el análisis LC-MS de PFASs en muestras acuosas.

Los primeros trabajos en esta área fueron difíciles debido a las concentraciones relativamente bajas encontradas en muchas de las matrices, la falta de estándares puros y patrones internos apropiados, la falta de técnicas de extracción y preparación estandarizadas y procedimientos relativamente limitados de garantía de calidad (Martin y col, 2004; Trojanowicz y col., 2013). De hecho, se dispone de una amplia cantidad de datos que describen las concentraciones de PFAAs en el medio ambiente, la biota, en tejidos humanos y en productos de consumo en diferentes ubicaciones geográficas de todo el mundo. Pero, como se han utilizado diversas técnicas de laboratorio para analizar a los PFAAs en las muestras es difícil comparar o interpretar las concentraciones de PFAAs en matrices biológicas en todo el mundo sin muestras representativas a nivel internacional y métodos analíticos estandarizados. En algunos casos, se ha observado un amplio intervalo de concentraciones y es imposible determinar si esta variabilidad se debe a diferencias de exposición verdaderamente marcadas o a las diferentes técnicas analíticas utilizadas.

Los estudios de comparación entre laboratorios, la estandarización de metodologías a nivel internacional (métodos ISO y USEPA, por ejemplo) y el uso de estándares y materiales de referencia certificados (CRM) ayudan a mejorar la calidad y la comparabilidad de resultados. Una serie de estudios de comparación entre laboratorios en la década de los años 2000s, indicó una relativa pobre comparabilidad entre laboratorios para matrices complejas y variadas como el agua y los peces, con un mejor comportamiento en muestras de suero (Lindstrom y col., 2009; Taniyasu y col., 2013; Van Leeuwen y col., 2006). Paulativamente los resultados fueron coincidiendo mucho mejor, mostrando que la experiencia acumulada de los participantes mejoró su calidad analítica a lo largo de los diferentes ejercicios interlaboratorio internacionales. Los problemas identificados a lo largo de los diferentes ejercicios de inter-comparación fueron: la disponibilidad limitada de estándares nativos y estándares internos (preferiblemente marcados); la calidad de estos estándares; una baja eficiencia de la extracción; problemas con los blancos debido a la contaminación del material de laboratorio e instrumentación; importantes efectos e interferencias de la matriz; la presencia de isómeros ramificados; la utilización de diferentes métodos de calibración (idoneidad de la calibración externa o en disolvente y preferencia por la calibración en matriz); la no expresión de las concentraciones en anión si el estándar de la PFASs es

una sal (por ejemplo, sal de potasio de PFOS), donde los resultados de la cuantificación deben calcularse para el correspondiente anión; y, la falta de protocolos bien establecidos para un aseguramiento de la calidad, como no registrar dos transiciones SRM y calcular la relación iónica entre ellas para la confirmación de los analitos. La falta de materiales de referencia es un problema, especialmente para la validación y desarrollo de métodos. Por lo tanto, un avance importante para el análisis de PFASs esta siendo la reciente disponibilidad comercial de CRM y su creciente uso, para obtener valores de consenso de diferentes compuestos en diversas matrices, proporcionando de este modo una forma de demostrar el rendimiento analítico en cada lote (Keller y col., 2010). Como resultado del creciente interés científico y de vigilancia por los organismos de regulación sobre estos compuestos, laboratorios comerciales han invertido también en obtener estándares de alta pureza y patrones internos marcados isotópicamente de familias que están recibiendo una gran atención como las PFASs, haciendo posible que laboratorios analíticos puedan desarrollar métodos de cuantificación fiables.

Evitar la contaminación de las muestras y los blancos es un reto difícil de resolver en el análisis de trazas de PFASs. Hay que tener un especial cuidado para evitar la contaminación y las pérdidas durante la toma de muestra, almacenamiento, conservación, extracción y purificación de la muestra. Diversos autores (Lloyd y col., 2009; Taniyasu y col., 2005; Yamashita y col., 2004) han investigado exhaustivamente las fuentes potenciales de contaminación en las diferentes etapas del proceso analítico utilizado (contaminación con el material de las botellas para el muestreo, el material de laboratorio fabricado o que contenga fluoropolimeros, como politetrafluoroetileno o compuestos perfluoroalcox en la extracción, purificación, sistema LC-MS, filtros, viales, disolventes, etc) y han propuesto algunas técnicas para reducir esta contaminación. Es importante asegurar la utilización de materiales que no contengan PFASs. La adsorción en el vidrio en matrices complejas como la biota o serum (24), la adsorción de los PFCAs de cadena larga en polipropileno-PP (25) o polietileno de alta densidad (HDPE) en muestras de agua y la adsorción en los filtros puede provocar la pérdida de los compuestos en estudio y/o la contaminación de los blancos. Además, también se han descrito pérdidas por evaporación de las PFASs volátiles (25) como los FTOHs y FASAs o por degradación a PFASs iónicas (PFCAs y PFSAs). El almacenamiento de las muestras a  $-20^{\circ}\text{C}$  generalmente es apropiado para la conservación de las muestras.

Como ya se ha mencionado, las concentraciones encontradas en aguas para las PFASs cubren un intervalo de varios órdenes de magnitud (desde pg/L hasta  $\mu\text{g/L}$  en muestras contaminadas). En muchos casos, se han determinado bajas concentraciones, lo que requiere un enriquecimiento de los analitos en las muestras. Por lo que ha sido conveniente utilizar técnicas de pre-concentración y eliminación de interferencias de la muestra, como la extracción líquido-líquido (LLE) y la SPE. La SPE es el método más ampliamente utilizado en la extracción y purificación de muestras líquidas para el análisis de PFAAs (Boulanger y col., 2004; Hebert y col., 2004; Loewen y col., 2005; Moody y col., 2001; Saito y col., 2003 y 2004; Taniyasu y col., 2005). Antes se debe realizar un pre-tratamiento que para muestras acuosas suele consistir en una sencilla filtración o centrifugación del agua. Por otro lado, la LLE (González-Barreiro y col., 2006; Szostek y col., 2006) también se puede utilizar para la extracción de

muestras acuosas sin la necesidad del pre-tratamiento de la muestra anteriormente indicado. Esta técnica de extracción hace posible analizar conjuntamente las PFASs solubles en el agua y asociadas al particulado. Por otra parte, con el fin de mejorar la sensibilidad, la LLE minimiza las contribuciones al blanco por la contaminación debido al contacto con las piezas de plástico de los sistemas de SPE. Algunos cartuchos de SPE pueden introducir contaminación, debido a que contienen trazas de PFASs, por lo tanto han de ser sustituidos por otro tipo de cartuchos o limpiados previamente con metanol como limpieza adicional (Yamashita y col., 2004). La SPME con análisis mediante GC/MS también se ha sugerido como una buena alternativa de extracción para evitar este inconveniente (Alzaga y Bayona, 2004).

Debido a la diferente polaridad, las PFASs de cada tipo requieren estrategias de extracción diferentes (ver algunos ejemplos en *Tabla 2.1*). Los PFCAs y PFASs iónicos requieren medios moderadamente polares (SPE Oasis WAX o metanol y acetonitrilo) para atrapar eficientemente los compuestos de cadena corta (C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>) solubles en agua. Para cadenas largas, se han utilizado fases de SPE menos polares, mixtas hidrofóbica/polar (Oasis HLB, por ejemplo) o no-polares (hidrofóbicas como la C<sub>18</sub>). El *clean-up* de muestras acuosas generalmente se realiza mediante un paso de limpieza después del paso de la muestra por el cartucho de SPE. Simcik y Dorweiler (2005) utilizaron un *clean-up* adicional con columnas cromatográficas de silica fluorada para la purificación de los extractos de agua superficial, antes del análisis por LC-ESI-MS. La silica fluorada puede aislar selectivamente los PFCs de las potenciales interferencias de la matriz. Después de lavar la columna con un 20% de metanol en MTBE, se eluyeron las PFASs con tetrahidrofurano y metanol. El método eliminó adecuadamente las interferencias con unas recuperaciones del 98% (fortificadas después del *clean-up*).

La LLE y la SPE son a menudo procesos largos e imprecisos, que como se ha descrito requieren una etapa adicional de purificación. Los métodos de SPE *off-line* pueden ser fácilmente automatizados (*on-line*, volumen altos de inyección) y son más idóneos para su aplicabilidad en laboratorios de rutina. Para evitar estos inconvenientes y simplificar el tratamiento de la muestra se han aplicado métodos alternativos de análisis directo del agua utilizando volúmenes grandes de inyección, 0,5 mL, (Schultz y col., 2004 y 2006). También, con el objetivo de mejorar la reproducibilidad de los métodos, reducir el tiempo de análisis, aumentar el rendimiento analítico y automatizar el análisis de rutina, una opción viable es la utilización de métodos de SPE en línea. En la bibliografía se han descrito varios sistemas de SPE en línea al LC-MS para el análisis de PFASs utilizando columnas de enriquecimiento de (C<sub>18</sub> y C<sub>18</sub> modificada) (Castiglioni y col., 2014; Kuklenyik y col., 2005; Liu y col., 2015; Llorca y col., 2012). Otra aproximación empleada ha sido la cromatografía de flujo turbulento (Takino y col., 2003) para el análisis de muestras de agua de río. Además estos métodos simplifican y minimizan la manipulación de la muestra, evitando la contaminación, mejorando los blancos y la sensibilidad de las metodologías analíticas.

**Tabla 2.1.** Revisión de metodologías analíticas LC-MS para el análisis de PFASs en muestras acuosas.

PFCA	PFSA	Otros analitos	Matriz	Extracción	Método analítico	Volumen muestra (mL)/LOQ (ng/L)	Ref.
4-12, 14, 16, 18 8:2 FTCA y FTUCA	4, 6 y 8	10:1, 7:1 FTOH PFOSA y N-EtFOSA	Agua de mar	SPE Oasis HLB y Oasis WAX	LC-ESI-MS/MS (QqQ, SRM) Betasil C <sub>18</sub> 50 × 2,1 mm y 5 μm	100-200 / 0,004-4 (LOD)	Taniyasu y col., 2005
8	8	PFOSA, N-EtFOSA PFOSulfinato N-EtFOSE PFOSAA y N- EtFOSAA,	Agua de lago	SPE Alltech C <sub>18</sub> Extract-Clean de alta capacidad (10 g)	LC-ESI-MS(/MS) (QqQ: SIM, SRM) Zorbax C <sub>18</sub> 150 × 2,1 mm y 5μm	50 L / 0,2-13	Boulanger y col., 2004
5-8 y 12	4, 6 y 8	Na	Agua superficial	SPE Supelclean ENVI-18	LC-ESI-MS/MS (QqQ, SRM) y RMN Genesis C <sub>8</sub> 50 × 2,1 mm y 4 μm	0,2-200 / 1-8 pg (LOD)	Moody y col., 2001
8-12	8	6:2, 8:2, 10:2 FTCA 6:2, 8:2 y 10:2 FTUCA	Agua de lluvia	SPE C <sub>18</sub> sílica gel	LC-ESI-MS/MS (QqQ, SRM) Discovery C <sub>18</sub> 50 × 2,1 mm y 5μm	4000 / 0,04-7,2 (MDL)	Loewen y col., 2005
8	8	Na	Agua superficial	SPE Presep-C Agri SDVB	LC-ESI-MS (Q, SIM) Zorbax XDB C <sub>18</sub> 150 × 2,1 mm y 5μm	1000 / 0,04-0,1	Saito y col., 2003 y 2004
6-12	8 y 10	PFOSA y N-EtFOSA	Agua residual y de río	LLE (MTBE) SPE Isolute C <sub>18</sub> EC	LC-ESI-MS/MS (QqQ, SRM) Luna C <sub>18</sub> 100 × 2,0 mm y 5 μm	400-900 / 0,94-16	González-Barreiro y col., 2006
Na	Na	6:2, 8:2 y 10:2 FTOH	Agua	LLE (acetonitrilo o MTBE)	LC-ESI-MS/MS (3 QqQ diferentes; SRM) XTerra MS C <sub>18</sub> 30 × 2,1 mm y 2,5μm Zorbax SB-C <sub>18</sub> 150 × 2,1 mm y 5μm Fluorous PF-C <sub>8</sub> 50 × 2,1 mm y 5μm	3 / 2-3	Szostek y col., 2006
8 y 9	4, 6 y 8	PFOSA 6:2 FTS	Agua de mar	SPE Oasis HLB y Sep-pak C <sub>18</sub>	LC-ESI-MS/MS (QqQ, SRM) Betasil C <sub>18</sub> 50 × 2,1 mm y 5 μm	1000 / 0,4-5,2 pg/L (LOD)	Yamashita y col., 2004
6-8	4, 6 y 8	4:2, 6:2 y 8:2 FTS	Agua subterránea de una base militar	Centrifugación e inyección directa	LC-ESI-MS/MS (QqQ, SRM) Betasil C <sub>18</sub> 150 × 2,0 mm FAB-MS (sector magnético)	Na / 500-600	Schultz y col., 2004

Continuación Tabla 2.1. Revisión de metodologías analíticas LC-MS para el análisis de PFASs en muestras acuosas.

PFCA	PFSA	Otros analitos	Matriz	Extracción	Método analítico	Volumen muestra (mL)/LOQ (ng/L)	Ref.
6-10	4, 6, 8 y 10	6:2 FTS PFOSA	Agua residual	Volumen grande de inyección Pre-columna C <sub>18</sub> 4 × 3 mm	LC-ESI-MS/MS (QqQ, SRM) Betasil C <sub>18</sub> 150 × 2,0 mm	0,5 / 0,5	Schultz y col., 2006
Na	8	Na	Agua de río	TFC C <sub>18</sub> 50 × 1,0 mm y 50 μm	LC-APPI-MS (Q, Full Scan, SIM) Zorbax XDB C <sub>18</sub> 150 × 4,6 mm y 5 μm	1 / 18	Takino y col., 2003
4-12	4, 6 y 8	Na	Agua residual, subterránea, de río y potable	SPE Oasis HLB SPE en línea Hypersil Gold aQ (C <sub>18</sub> modificada) 20 × 2,1 mm y 12 μm	LC-ESI-MS/MS (QqQ, SRM) XTerra MS C <sub>18</sub> , 100 × 2,1 mm y 3,5 μm UHPLC-ESI-MS/MS Hypersil GOLD PFP 50 × 2,1 mm y 1,9 μm	100-500 / 0,2-1,6 5 / 1-20	Castiglioni y col., 2014
4-14, 16 y 18	4, 6, 8 y 10	PFOSA PFHxPA, PFOPA y PFDPA	Agua residual, de río, de grifo y mineral embotellada	SPE en línea Hypersil Gold aQ (C <sub>18</sub> modificada) 20 × 2,1 mm y 12 μm	LC-ESI-MS/MS (QqQ, SRM) Hypersil Gold PFP 50 × 3,0 mm y 3,0 μm	5 / 2,8-50	Llorca y col., 2012
4-14, 16 y 18	6-10	Na	Agua residual y de río	SPE Oasis WAX	LC-ESI-MS/MS (QqQ, SRM): C <sub>18</sub> 150 × 2,0 mm y 3 μm UHPLC-ESI-MS/MS (QqQ, SRM): C <sub>18</sub> 50 × 2,1 mm y 1,8 μm CLC-ESI-MS (Q, SIM): C <sub>18</sub> 150 × 0,5 mm y 3,5 μm	250 / 0,3-6; 0,006-6; 0,009-15	Onghena y col., 2012
6-12	6 y 8	PFOSA y N-MeFOSA	Agua potable (y otras matrices: leche, pescado, carne y hígado de cerdo)	Discos SPE Atlantis HLB (0,5 μm) 70–86 mL/min	LC-ESI-MS/MS (QqQ, SRM) Kinetex C <sub>18</sub> 50 × 2,1 mm y 2,6 μm	500 / 1,40-110	Chang y col., 2012
8	8	Na	Agua superficial	SPE en línea miniaturizado Kromasil C <sub>18</sub> 5 × 1,0 mm y 5 μm	NanoLC-Nanospray-MS (TOF, HRMS, Full Scan) Kromasil C <sub>18</sub> 150 × 0,1 mm y 3,5 μm	1 / 0,5 y 1000 (LOD)	Wilson y col., 2007
4-14, 16 y 18	4, 6, 8, y 10	PFOSA 6:2 FTS	Agua residual, superficial y de grifo	SPE Strata X-AW	LDTD/APCI-Orbitrap-MS (Q-Exactive, HRMS, MS/HRMS, Full Scan)	250 / 0,3-4 (LOD) 1000 / 0,03-0,2 (LOD)	Munoz y col., 2015

Continuación Tabla 2.1. Revisión de metodologías analíticas LC-MS para el análisis de PFASs en muestras acuosas.

PFCA	PFSA	Otros analitos	Matriz	Extracción	Método analítico	Volumen muestra (mL)/LOQ (ng/L)	Ref.
8	8	Na	Agua de grifo	SPE Sep-Pak Plus C <sub>18</sub>	DIOS-TOF-MS ( <i>matrix-free</i> LDI-TOF-MS) (HRMS, <i>Full Scan</i> )	500 / 1	Kawasaki y col., 2009
8-10	4, 6 y 8	Na	Agua residual y de río	SPE Alltech C <sub>18</sub>	MALDI-TOF (HRMS, <i>Full Scan</i> )	500/ (LOD) 0,010-0,15	Cao y col., 2011
5-13	4, 6, 8 y 10	PFOSA	Agua de alcantarillado, superficial y de mar	SPE Oasis HLB	LC-TOF-MS (HRMS, <i>Full Scan</i> ) Luna C <sub>18</sub> (2) 250 × 2,0 mm y 5µm	50 o 250 / 2-200	Wille y col., 2010
<i>Screening</i> de nuevas PFASs (H-PFCAs, Cl-PFCAs, PFSs, H-PFE/As y Cl-PFE/As)		(H-PFCAs, Cl-PFCAs, PFSs, H-PFE/As y Cl-PFE/As)	Agua residual	SPE en línea Hypersil Gold C <sub>18</sub> 20 × 2,1 mm y 12 µm	LC-LTQ-Orbitrap (HRMS, MS/HRMS, <i>Full Scan</i> ) Hypersil GOLD C <sub>18</sub> 50 × 2,1 mm y 1,9 µm Ascentis Express F5 10 × 2,1 mm y 2,7 µm	2 o 5 / 0,003-o,2 ng F/mL	Liu y col., 2015
5, 8-10 y 12	8	PFOSA 6:2, 8:2, 10:2 FTOH 4:2, 6:2, 8:2, 10:2 Mono PAPS 4:2/4:2, 6:2/6:2, 8:2/8:2, 10:2/10:2 DiPAPs S-diPAPs Fluoroetoxilatos	Estándares analíticos y mezclas industriales	Na	UHPLC-ESI-Q-TOF (HRMS, MS/HRMS, <i>Full Scan</i> ) C <sub>18</sub> BEH-shield 150 × 2,1 mm y 1,7 µm C <sub>18</sub> BEH-shield 50 × 2,1 mm y 1,7 µm Perfluorinated C <sub>5</sub> 150 × 2,0 mm y 3 µm	Ni	Trier y col., 2011

Ref.: referencia; Na: no aplica; Ni: no indicado; LOQ: límite de cuantificación; TFC: cromatografía de flujo turbulento en línea; FTS: fluorotelómeros sulfonatos; H-PFCAs: perfluorocarboxilados hidro-sustituidos; Cl-PFCAs: perfluorocarboxilados cloro-sustituidos; PFSs: sulfonados polifluorados; H-PFE/As: éteres/alcoholes perfluorados insaturados hidro-sustituidos; Cl-PFE/As: éteres/alcoholes perfluorados insaturados cloro-sustituidos.



La LC-MS/MS (QqQ) se ha convertido en la aproximación estándar aplicada por la mayoría de los laboratorios para el análisis cuantitativo de las PFASs iónicas en muestras medioambientales, garantizando una adecuada sensibilidad y productividad. De hecho, como ya se ha mencionado anteriormente en el *Capítulo 1*, los métodos oficiales para el análisis de PFOA y PFOS (ISO 25101) y de algunos PFAAs en agua (Método USEPA 537) son metodologías analíticas basadas en la SPE y LC-MS/MS. Pero, aunque los instrumentos QqQ son los más comúnmente utilizados en el análisis mediante LC-MS de las PFASs, diferentes analizadores como los cuadrupolos sencillos, trampas de iones en el espacio (IT) y en el tiempo (QqLIT), tiempo de vuelo (TOF) y Q-TOF han sido también aplicados. Algunos de estos estudios están resumidos en la *Tabla 2.1*. Con el fin de mejorar la selectividad de los análisis por MS se utilizan analizadores como el QqQ, el TOF o la trampa de iones. El cuadrupolo sencillo debido a su baja selectividad solo debe usarse si hay una seguridad de que no existen interferencias o al menos que su efecto se ha minimizado.

La separación cromatográfica se realiza normalmente con columnas de fase reversa ( $C_8$  y  $C_{18}$ ), aunque algunos estudios utilizan columnas fluoradas de fase reversa con una selectividad adicional vía interacción fluór-fluór entre moléculas fluoradas (Castiglioni y col., 2014; Llorca y col., 2012; Schröder 2003), en que los diferentes isómeros lineales y ramificados se separan también, además de obtener una separación basada en la diferente longitud de la cadena alquílica. Con estas columnas fluoradas también se mejora la eficiencia cromatográfica, reduciendo posibles interferencias de la matriz que pudieran co-eluir y minimizando la supresión o incremento iónico. En cuanto a la fase móvil, normalmente se utilizan mezclas de acetonitrilo-agua y metanol-agua, muchas veces modificadas con acetato de amonio (desde 1,0 a 50 mM) para mejorar la LC separación y la MS sensibilidad. Onghena y col., (2012) en su trabajo comparan tres generaciones de sistemas HPLC para la determinación de PFASs en agua mediante LC-MS/MS en un QqQ. Se estudia un sistema de HPLC convencional con una columna  $C_{18}$  (150× 2 mm, 3  $\mu$ m), un sistema UHPLC (50 × 2,1 mm y 1,8  $\mu$ m) y también un sistema de cromatografía de líquidos capilar (CLC) con una columna 15 × 0,5 mm y 3,5  $\mu$ m. El sistema de UHPLC proporciona los menores tiempos de análisis y los mejores LODs para la mayoría de los analitos. Por su parte, con la CLC se obtuvo la mejor precisión y una buena sensibilidad, aunque presenta la dificultad de trabajar con flujos bajos (15  $\mu$ L/min). Otra aproximación, es la utilización de columnas de núcleo sólido, una de estas columnas de  $C_{18}$  (50 × 2,1 mm y 2,6  $\mu$ m) se ha aplicado para la separación de diez PFASs (PFCA de 6 a 12 carbonos; PFSA de 6 y 8 carbonos; y PFOSA) en agua potable (Chang y col., 2012). Por último también se han utilizado columnas de diámetro interno reducido (0,1 mm ID) acopladas a una fuente de nanospray. Wilson y col. (2007) desarrollaron un método en línea SPE-LC-MS miniaturizado para intentar obtener una elevada sensibilidad para el PFOA y el PFOS en agua. Los LODs en masa obtenidos fueron de 0,5 y 1,0 pg, para el PFOA y el PFOS, respectivamente, que corresponden a LODs de 500 pg/L y 1 ng/L, respectivamente.

El ESI operando en modo de ionización negativo es la fuente de ionización más ampliamente utilizada para el análisis mediante LC-MS de los PFAAs, objeto de estudio

de la presente de tesis, debido a su naturaleza aniónica. Sin embargo la ionización química a presión atmosférica (APCI) y la fotoionización a presión atmosférica (APPI) se han utilizado también en algunas aplicaciones concretas. La APCI se ha utilizado en la determinación de tensioactivos no iónicos en lodos de depuradora en modo de ionización positivo (Schröder, 2003) y para el análisis de PFOS (tensioactivo aniónico) en serum humano (Sottani y col., 2002). Y la APPI para el análisis de PFOS en agua de río con el método *on-line* de extracción mediante cromatografía de flujo turbulento (Takino y col., 2003). La APCI y la APPI son menos susceptibles al efecto matriz que el ESI. Recientemente, Munoz y col., (2015) han determinado 15 PFASs (PFCAs de 4 a 12 carbonos, PFASs de 4, 6, 8 y 10 carbonos, FOSA y 6:2 FTS) en matrices acuosas mediante desorción térmica con un láser de diodo-ionización química a presión atmosférica (LDTD/APCI) acoplada a HRMS con un analizador Orbitrap. La desorción de la muestra se logra aplicando un láser de IR focalizado (980 nm, 20 W, continua) que al impactar produce indirectamente la vaporización de los analitos por transferencia térmica. Luego el gas portador (aire purificado), lleva a estos analitos desorbidos a través de un tubo de transferencia de cuarzo hacia la región de APCI para ser ionizados antes de la transmisión en la entrada del MS. Con esta técnica han conseguido determinar 15 PFASs (PFCAs de 4 a 12 carbonos, PFASs de 4, 6, 8 y 10 carbonos, FOSA y 6:2 FTS) en un solo análisis reduciendo el tiempo de análisis a pocos segundos, eliminando el paso previo de separación cromatográfica. Además, redujeron el consumo de disolventes y el riesgo potencial de contaminación con compuestos perfluorados que pueden provocar los tubos de la fase móvil. En otros estudios anteriores también se aplicaron métodos para el análisis de PFASs sin separación cromatográfica. Un primer estudio demostró que la técnica de desorción/ionización en silicio poroso (DIOS) acoplada a la MS era capaz de determinar PFOS a niveles de ppb en agua de grifo, pero el método presentó una baja sensibilidad para el PFOA, al ser menos hidrofóbico (Kawasaki y col., 2009). DIOS-MS y LDTD/APCI-MS son técnicas de ionización sin matriz que evitan la presencia de las señales de  $m/z$  baja de esta matriz y ofrecen una tecnología para el análisis rápido. La ionización mediante láser asistida por matriz (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation*, MALDI) se utilizó para cuantificar PFAAs en agua mediante una metodología de SPE seguida de MALDI-TOF-MS utilizando una matriz de 1,8-bis (tetrametilguanidino)-naftaleno (TMGN) (Cao y col., 2011). El método se comparó con el análisis mediante LC-MS/MS para agua de río y residual demostrando ser una alternativa fiable.

Como ya hemos mencionado anteriormente, la resolución de la detección cuadrupolar puede no ser suficiente para evitar la existencia de un falso negativo o positivo debido a la co-elución de interferencias isobáricas de la matriz. Por lo que una alternativa útil es el uso de la HRMS, que además es interesante para el desarrollo de nuevos métodos para determinar los diferentes isómeros y nuevas clases de PFASs (por ejemplo, PAP), uno de los retos analíticos que se plantean en perspectiva para la determinación de PFASs en medio acuoso. Ruan y col., 2015 resumen las metodologías analíticas, de preparación de las muestras y las estrategias de MS para la elucidación de los metabolitos y productos de transformación de las PFASs en el medio ambiente. Para verificar la presencia de sustancias, varios requisitos deben cumplirse para obtener suficientes puntos de identificación de acuerdo con la Directiva 2002/657/EC

de la UE. Entre ellos se incluyen, la importancia de los iones producto diagnósticos (es decir, la cantidad de información estructural que contiene este ion), el número de transiciones de ion precursor a ion producto requerido (dos transiciones en LRMS y una en HRMS) y la intensidad relativa entre las señales de transición del ion precursor al ion producto (mínimo del 10%). Procedimientos de garantía de calidad más exhaustivos que incluyen estos criterios se están aplicando, y como en el caso del PFOS, se ha diferenciado de interferencias comunes de la matriz, ayudando a refinar su identificación y mejorar la exactitud considerablemente (Benskin y col., 2007). Por ejemplo, en matrices como los peces, el taurodeoxicolato interfiere en la transición 399>80 para el PFOS, y algunas hormonas del embarazo, 5-pregnan-3,20-diol-sulfato en la transición 399>80 y el isótopo natural  $^{34}\text{S}$ -3-hidroxi-5-pregnan-20-un-sulfato en la transición 399>99.

Por lo tanto el método cuantitativo debe tener en cuenta al menos un ion producto significativo que se utiliza para la confirmación. Wille y col., 2010 utilizaron la HRMS con un equipo TOF para el control de PFASs en muestras del Mar del Norte y del estuario Escalda. En este trabajo desarrollaron una técnica de MS altamente selectiva para la detección de 14 PFASs en matrices acuosas complejas, como el agua superficial, de alcantarillado y el agua de mar, utilizando ventanas de  $m/z$  muy estrechas con una pequeña tolerancia (< 10 ppm). Por su parte, el nuevo analizador de HRMS Orbitrap se ha aplicado a la determinación de PFASs en peces (Kadar y col., 2011) comparándolo con estrategias de LR y en la identificación de productos de transformación potenciales de PFOA en estudios de biodegradabilidad (Liou y col., 2010).

Recientemente, los métodos de análisis de HRMS utilizando instrumentos Orbitrap y la nueva generación de TOF y Q-TOF están teniendo un papel fundamental en aplicaciones de *screening* de desconocidos, en la identificación de nuevas PFASs introducidas actualmente en sustitución de los compuestos ya regulados, que se han dejado de producir en procesos industriales o formulaciones como el PFOS y el PFOA, o en los estudios de los metabolitos y productos de transformación en el medio ambiente (Liu y col., 2015; Rotander y col., 2015). En concreto, por ejemplo, Liu y col., (2015) desarrollaron un método con un esquema de trabajo para el descubrimiento y caracterización de PFASs desconocidos en muestras ambientales mediante HPLC-LTQ-Orbitrap-MS. El método consistió en dos inyecciones. La primera para la asignación de la fórmula empírica y la comprobación del tiempo de retención por HPLC de los compuestos desconocidos. Y la segunda inyección para el estudio MS/MS dirigido en HRMS de los compuestos detectados en la primera inyección, su caracterización estructural y la confirmación de la fórmula empírica. También, la UHPLC-ESI-Q-TOF se ha utilizado para el *screening* de mezclas de PFASs (Trier y col., 2011). Para distinguir a las PFASs de otros productos químicos se utilizaron el defecto de masa negativo característico de los compuestos perfluorados (los átomos de flúor tienen un defecto de masa negativo relativo a su masa nominal [ $m/z$  -0,0016]), mientras que por ejemplo los átomos de hidrógeno tienen un defecto de masa positivo [ $m/z$  +0,0079] sus pérdidas específicas de 20 Da (HF), y la presencia de una secuencia de picos cromatográficos que pertenecen a series homólogas con  $m/z$  de  $(n \times 50)$  Da (CF<sub>2</sub>) o  $(n \times 100)$  Da (CF<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>). Los métodos MS/MS pueden beneficiarse del uso de iones

diagnóstico que contienen flúor, iones moleculares comunes de la serie homóloga, o pérdidas neutras para los *screening*.

### **Avances y desafíos analíticos en la determinación de MCs en agua mediante LC-MS**

Debido al elevado número de variantes de MCs con un nivel de toxicidad que varía hasta diversos órdenes de magnitud, la correcta identificación de los diferentes congéneres y su precisa y exacta cuantificación es crucial, para lograr una adecuada valoración toxicológica, gestión y control de del suministro público de agua.

Uno de los retos analíticos que sigue siendo una limitación en el desarrollo e implementación de los métodos analíticos en el estudio de MCs es la falta de estándares analíticos para las toxinas de cianobacteria. Se han publicado una variedad de métodos para extraer y purificar MCs de cianobacterias aisladas, muchos de ellos como ya se ha descrito anteriormente involucran la extracción de las células en un solvente y la concentración y separación con fases estacionarias  $C_{18}$ . Sin embargo, el mantenimiento de los cultivos de cianobacterias en el laboratorio consume mucho tiempo, y la subsiguiente purificación con columnas cromatográficas preparativas puede ser cara, haciendo que solo la purificación a escala pequeña sea posible en muchos laboratorios (Lawton y Edwards, 2001). Actualmente, solo algunas toxinas se encuentran disponibles comercialmente, en concreto de las más de 90 variantes de MCs, solo existen 12 estándares comerciales (MC-dmLR, -dmRR, -HilR, -HtyR, -LA, -LF, -LR, -LW, -LY, -RR, -WR, -YR), que en general están obtenidos para su utilización en estudios biológicos, pudiendo no ser adecuadas para realizar análisis cuantitativos. Además, los laboratorios se enfrentan a la necesidad de trabajar bajo normas BPL (buenas prácticas de laboratorio), certificación y/o acreditación (ISO 17025) que requieren métodos validados, patrones de calibración de calidad y CRM. Y surge la necesidad de estandarizar y armonizar métodos tanto analíticos como de muestreo y de participar en ejercicios de intercomparación. Fastner y col., 2002, en un ejercicio internacional de intercomparación para la determinación de MCs pusieron de manifiesto las dificultades del análisis de una misma muestra tanto empleando diferentes métodos (HPLC-PDA/UV principalmente, pero también ELISA, PPA y HPLC-MS) como en diferentes laboratorios y utilizando diferentes equipos. Los resultados para el patrón y las muestras de campo suministrados fueron en general satisfactorios, pero con las muestras se demostró la necesidad de mejorar la normalización entre laboratorios. Por ello, las concentraciones detectadas de MCs deben considerarse como estimaciones de las concentraciones reales. Por otra parte, la cuantificación con los estándares de cada laboratorio (*in-house*) en comparación con la cuantificación utilizando el patrón suministrado en el propio ejercicio de intercomparación, indicó que el análisis de rutina de MCs en los laboratorios puede estar también influenciado

por la variabilidad en los estándares disponibles, haciendo hincapié en la necesidad de la producción de CRM.

Las primeras aproximaciones para la identificación de las diferentes especies son de los años 1950s en un *bloom* de *Microcystis aeruginosa*, antes de conocer el mecanismo de toxicidad de las MCs (Bishop y col., 1959; Botes y col., 1982; Elleman y col., 1978). Poco a poco, se fueron identificando los diferentes amino ácidos de las MCs, pero la elucidación de la estructura completa no se completó hasta 1984 (Botes y col., 1984). Inicialmente, para la caracterización estructural y el descubrimiento de nuevas variantes de MCs, se emplearon técnicas como la RMN (Harada y col., 1990a), la electroforesis capilar (CE) (Bateman y col., 1995) y la MS con baja y HR con fuentes de ionización tipo *Fast Atom Bombardment* (FAB)-MS y analizadores de sector magnético, así como la (GC)-MS para la investigación de la estereoquímica (Namikoshi y col., 1990). Es importante indicar para la elucidación estructural exhaustiva de las MCs, normalmente se requiere una combinación de las diferentes técnicas que pueden ser complementarias, incluyendo, por ejemplo, la degradación química, el análisis de los amino ácidos quirales, la RMN y la MS (Namikoshi y col., 1992a; Sano y Kaya, 1998; Sivonen y col., 1990a). En concreto, los métodos basados en ionización FAB en combinación con los instrumentos (multi-)sector han contribuido enormemente al descubrimiento de muchas de las variantes de las MCs.

Más recientemente, técnicas como la LC acoplada a UV, fluorescencia y a la MS han permitido el descubrimiento y la cuantificación de las MCs. El método oficial ISO para la determinación de MCs en agua se desarrolló mediante SPE y HPLC-UV (ISO 20179:2005). Pero la falta de especificidad de la detección UV, dificulta la identificación de las MC en presencia de interferencias procedentes de la materia orgánica natural de agua. En cambio, la LC/MS permite separar, identificar y cuantificar las diferentes variantes de MC, mejorando la especificidad, eliminando interferencias, confirmando su identificación y encontrando nuevas variantes mediante técnicas de MS/MS y de HRMS. Por lo tanto, a principios de este año (2015) la USEPA ha publicado un método oficial para la determinación de MCs y nodularina en agua de bebida por SPE y LC-MS/MS (método USEPA 544).

En diversos trabajos se han resumido los métodos de extracción y detección para la identificación y cuantificación de MCs (Bortoli y col., 2014; Kauskik y col., 2013; McElhiney y Lawton, 2005; Merel y col., 2013; Meriluoto y col., 1997; Msagati y col., 2006; Pérez y col., 2005; Vilariño y col., 2013). En concreto, en la *Tabla 2.2* se revisan las metodologías analíticas LC-MS para el análisis de MCs en muestras acuosas y cultivos. De forma general cabe diferenciar en si es necesario analizar el contenido total de toxina (intracelular más extracelular) o si es más conveniente determinar la toxina en cada fracción por separado. En el primer caso, una etapa inicial induciendo la lisis de las células de cianobacterias permite determinar el contenido total de toxina sin determinar su reparto. Pero, para el análisis independiente de las dos fracciones es necesario filtrar la muestra inicialmente. El agua filtrada permite determinar la cianotoxina disuelta (extracelular) y las células retenidas en el filtro después de su lisis

proporcionan el contenido intracelular. La lisis de las células se obtiene normalmente por congelación-descongelación, liofilización, ultrasonicación o añadiendo metanol en la muestra entera o en el filtro. Estos métodos directamente dañan la membrana de las células y liberan las toxinas intracelulares (Harada y col., 1999). El metanol además se utiliza para la extracción sólido-líquido de la fracción intracelular o sestónica (definida como las partículas retenidas en un filtro de 0,7  $\mu\text{m}$ ) muchas veces acidificado con TFA o ácido fórmico. El pH aparece como un factor importante para la extracción de las MCs de las células del alga. Debido a que las MCs contienen en su estructura dos grupos carboxílicos y diversos grupos amino ionizables, a diferentes pHs encontramos diferentes especies dominantes. La relación entre pH y eficiencia de extracción no ha sido estudiada extensivamente, por lo general se obtienen mejores recuperaciones a pHs básicos (pH 10) (Westhuizen y Eloff, 1982) debido a que a bajos pHs las MCs son más hidrofóbicas y también a que como en el caso de la MC-LR a pHs ácidos se vuelven menos solubles (De Maagd y col., 1998). También se han utilizado diferentes mezclas de ácido acético/agua o alcohol/agua (50-80 %) y dióxido de carbono supercrítico como disolventes de extracción (Harada et al., 1997; Pyo y Shin, 1999), pero el metanol ha resultado ser el disolvente más efectivo para la extracción simultánea de las toxinas hidrofílicas e hidrofóbicas, además tiene la ventaja añadida de que permite la concentración rápida de la muestra por evaporación. Otros procesos simples de rotura de las células y extracción, como el calentamiento en un baño de agua hirviendo o la utilización de un horno microondas han resultado efectivos para un amplia gama de MCs incluidas las más hidrofóbica como la MC-LW o la MC-LF (Metcalf y col., 2001). Esta metodología que incluye sonicación, es preferible cuando los disolventes como el metanol pudieran interferir en la subsiguiente determinación analítica

**Tabla 2.2.** Revisión de metodologías analíticas LC-MS para el análisis de MCs en muestras acuosas y cultivos.

MCs	Otras toxinas	Matriz	Extracción	Método analítico	Volumen muestra (mL)/LOQ	Ref.
RR, [D-Asp <sup>3</sup> ]RR, YR, LR, 3 variantes LR, AR, FR, WR, LA, LF, LW	Nod	Agua superficial y Cultivo	SPE Oasis HLB IAC (Silica y sefarosa)	LC-ESI-MS (QqQ, Full Scan) Symmetry C <sub>18</sub> 150 × 1.0 mm y 3,5 μm	250 / 25 y 10-14 ng (abs)	Aranda-Rodríguez y col., 2003
MCs	Nods	Agua superficial	SPE C <sub>18</sub> EC	LC-ESI-MS (Full Scan, SIM) Kromasil 100 × 2,1 mm y 3,5 μm Kromasil 100 × 1,0 mm y 3,5 μm	500 / 0,077-2,057 ng (abs) en Full Scan y 0,021-1,153 ng en SIM 60-340 pg en Full Scan y 6-72 pg en SIM	Barco y col., 2002
LR, D-Asp-LR, Dha-LR, DMAdda-LR, M-glu-LR, AR, LW, VF, LF, LY	Na	Cultivo (células liofilizadas, fracción sestónica)	Ultrasonidos, SPE C <sub>18</sub>	ELISA CE y LC en línea LC/ESI-MS, MS/MS (QqQ, Full Scan, SIM, SRM) Vydac 218TP52 250 × 2,1 mm	0,5 g / 50 (LC-MS) y 200 (CE-MS) μg/L (LOD)	Bateman y col., 1995
dmLR, LR, LY, LA, LW, LF, dmRR, RR, dmYR, YR	Nod, Nod lineal, dm-Nod	Bloom natural MC total (intra+extra)	Ultrasonidos (MeOH:H <sub>2</sub> O 1:1), SPE C <sub>18</sub>	Fast LC o UHPLC-ESI-MS (IT, Full Scan) 8 columnas de 50 × 2-2,1 mm y 1,8-2,7 μm, C <sub>12</sub> (Synergy MAX-RP), C <sub>18</sub> (Fortis, Zorbax Eclipse plus, Synergi Hydro-RP), C <sub>18</sub> de núcleo sólido (Ascentis Express), C <sub>18</sub> con un grupo polar (Synergi Fusion-RP), fenil éter ligado (Synergi Polar-RP) o de silica monolítica porosa (Chromolith FastGradient)	Ni / 15 ng/mL	Neffling y col., 2009
LA, LF, LR, LW, LY, RR, YR	ATX-a, CYN	Agua superficial (lago y río) MC total (intra+extra)	Ultrasonidos	UHPLC-ESI-MS/MS (QqQ, SRM) Acquity UPLC HSS T3 100 × 2,1 mm y 1,8 μm	Ni / 0,10-0,21 ppb (LOD)	Oehrle y col., 2010
LR, RR, YR, LY, LW, LF	Nod	Agua superficial y de bebida	SPE en línea Oasis HLB 20 × 2,1 mm y 25 μm	UHPLC-ESI-MS/MS (QqQ, SRM) Acquity UPLC BEH C <sub>18</sub> 50 × 2,1 mm y 1,7 μm	1 / 2-40,5 ng/L (LOD)	Beltrán y col., 2012

Continuación Tabla 2.2. Revisión de metodologías analíticas LC-MS para el análisis de MCs en muestras acuosas y cultivos.

MCs	Otras toxinas	Matriz	Extracción	Método analítico	Volumen muestra (mL)/LOQ	Ref.
LA, LF, LR, LW, LY, RR, YR	ATX-a, CYN	Agua superficial (lago y río) MC total (intra+extra)	Ultrasonidos	UHPLC-ESI-MS/MS (QqQ, SRM) Acquity UPLC HSS T3 100 × 2,1 mm y 1,8 μm	Ni / 0,10-0,21 ppb (LOD)	Oehrle y col., 2010
LR, RR, YR, LY, LW, LF	Nod	Agua superficial y de bebida	SPE en línea Oasis HLB 20 × 2,1 mm y 25 μm	UHPLC-ESI-MS/MS (QqQ, SRM) Acquity UPLC BEH C <sub>18</sub> 50 × 2,1 mm y 1,7 μm	1 / 2-40,5 ng/L (LOD)	Beltrán y col., 2012
MCs LR, RR, YR	Na	Agua superficial y de bebida	Micro-SPE en línea LC Packings C <sub>18</sub> 5 × 1 mm y 5 μm	Micro-LC UV, MS (Q, Full Scan) Hypersil BDS C <sub>18</sub> 255 × 1 mm y 5 μm	5 / < 40 ng/L	Rivasseau y col., 2000
RR, LR, LY, LA, LW, LF, YR	Nod	Agua de lago y de grifo	Micro-SPE en línea Pre-column Micro-Tech Scientific C <sub>18</sub> 15 × 0,3 mm y 5 μm	CLC-ESI-MS/MS (QTRAP, SRM) Micro-Tech Scientific C <sub>18</sub> 100 × 0,3 mm y 5 μm	0,1 / < 57 ng/L (LOD)	Shan y col., 2011
MCs LR, XR, LW	Na	Agua de lago (fracción sestónica)	Ultrasonidos (MeOH:H <sub>2</sub> O 70:30) C <sub>8</sub> Opti-guard 2 × 1,0 mm	LC-ESI-MS/MS (IT, Full Scan, MS <sup>2</sup> , MS <sup>3</sup> ) Betasil C <sub>18</sub> 100 × 1,0 mm	0,010 / 250 pg (abs)	Zweigenbaum y col., 2000
LR, RR, YR, LF	Nod	Agua y alga MC total (intra+extra)	Análisis directo de agua	MALDI-TOF (HRMS, Full Scan)	0,010 / 0,023-0,071 μM (LOD)	Howard y col., 2007
RR, YR, LR, LY, LW, LF, dmLR, dmRR	Nod, dmNod	Cultivo (células liofilizadas, fracción sestónica)	Ultrasonidos (MeOH:H <sub>2</sub> O 75:25)	LC-ESI-MS (QqQ, SIR) Purospher-STAR RP-18 EC 30 × 4 mm y 3 μm LC-UV RP-Amide C <sub>16</sub> 100 × 4 mm y 3 μm	35 mg / 50-100 pg (abs) LR	Meriluoto y col., 2004
didmRR, dmRR, RR, dmLR, LR, didmLR, didmYR, dmYR, YR, LW, LF, LY	Nod	Agua dulce y salobre (fracción sestónica)	Ultrasonidos (MeOH:H <sub>2</sub> O 75:25)	LC-ESI-MS (SIM) y MS/MS (QqQ, SRM) Purospher STAR RP-18 EC 30 × 4,0 mm y 3 μm	Ni / 0,2 μg/L	Spoof y col., 2003
LR	Na	Agua superficial MC total (intra+extra)	Ultrasonidos (lisis) SPE HLB	LC-ESI-MS/MS (IT, CID, Full Scan) Luna C <sub>18</sub> (2) 150 × 2,0 mm, 5 μm	1000 / 2,6 ng/L	Zhang y col., 2004



Continuación Tabla 2.2. Revisión de metodologías analíticas LC-MS para el análisis de MCs en muestras acuosas y cultivos.

MCs	Otras toxinas	Matriz	Extracción	Método analítico	Volumen muestra (mL)/LOQ	Ref.
MCs	Na	Agua de lago	Fracción intracelular: Ultrasonidos (solución 5% CH <sub>3</sub> COOH) Fracción extracelular: SPE ODS	LC-ESI-MS/MS (IT, Full Scan y product ion scan) TSK-gel Super ODS 100 × 2,0 mm	100 mg / Ni	Mayumi y col., 2006
MCs	Na	Agua de lago	SPE C <sub>18</sub>	LC-UV Atlantis C <sub>18</sub> 150 × 3,2 mm y 5 μm LC-ESI-MS/MS (IT, Full Scan y product ion scan) Luna C <sub>18</sub> (2) 150 × 2,0 mm y 5 μm	50 / < 0,1 ng (abs) (LOD)	Ortea y col., 2004
LA, LR, YR, RR, [D-Asp <sup>3</sup> , E-Dhb <sup>7</sup> ]RR, [Leu <sup>3</sup> ]LR <i>Screening</i>	Na	Cultivo liofilizadas, (células fracción sestónica)	Ultrasonidos (MeOH:H <sub>2</sub> O 1:1) Fraccionamiento (Luna C <sub>18</sub> (2) 250 × 4,6 mm, 5 μm)	Infusión directa ESI (-) chip LTQ-Orbitrap; Q-TOF (HRMS, Full Scan)	50 mg / Ni	Dörr y col., 2011
MCs	Na	Cultivo liofilizadas, (células fracción sestónica)	Ultrasonidos (70% MeOH acuoso) SPE C <sub>18</sub>	MALDI-TOF (HRMS, Full Scan) LC-ESI-Q-TOF (HRMS, Full Scan) MED SEA18 250 × 4,6 mm y 5 μm	Ni / Ni	Del campo y col., 2010
RR, YR, LR, LW, LF	Na	Agua de lago	SPE C <sub>18</sub> EC	CLC-ESI-Q-TOF-MS/MS (HRMS, Full Scan) Atlantis C <sub>18</sub> 15 cm × 100μm LC-ESI(+/-)-MS/MS (IT, SRM, MS <sup>3</sup> ) Luna C <sub>18</sub> 250 × 3,0 mm y 4 μm MALDI-TOF-MS (HRMS, Full Scan)	100 / 0,1, 0,5-1, 1-2 ng/mL	Ferranti y col., 2009
LR, YR, RR	Na	Agua superficial (agua y filtro)	Ultrasonidos (MeOH:H <sub>2</sub> O 9:1, 0,1% TFA) SPE Bond Elut-ENV	LC-ESI(-)-MS/MS (IT, SRM) GraceSmart RP-18 150 × 2,1 mm y 3 μm	200 / 16, 32, 18 ng/L	Rodrigues y col., 2013
LR, RR, YR	Nod	Estándares comerciales	Na	LT-FT-ICR-MS (HRMS, Full Scan, MS <sup>2</sup> , MS <sup>3</sup> ) Columna Ni	Na/ Ni	Diehnelt y col., 2005

Continuación tabla 2.2. Revisión de metodologías analíticas LC-MS para el análisis de MCs en muestras acuosas y cultivos.

MCs	Otras toxinas	Matriz	Extracción	Método analítico	Volumen muestra (mL)/LOQ (ng/L)	Ref.
LA, [Asp <sup>3</sup> ]LA, LAba, LF, LL, [Asp <sup>3</sup> ]LL, LR, [MeSer <sup>7</sup> ]LR, RR, YR	Nod	Cultivo MC total (intra+extra)	Discos Empore C <sub>18</sub>	LC/LT-FT-ICR-MS (HRMS, <i>Full Scan</i> , MS/MS) BetaBasic C <sub>18</sub> 100 × 1,0 mm	175 / Ni	Diehnelt y col., 2006
LR	Subproductos de cloración de la MC-LR	Agua ultrapura fortificada con MC-LR	Inyección directa	LC-MS (Q), LC-HRMS (LTQ-Orbitrap, <i>Full Scan</i> , MS <sup>2</sup> ) C <sub>18</sub> Synergi 4 μ Hydro-RP 80A	0,020 / Ni	Merel y col., 2009
dmLR	Na	Agua de lago (células liofilizadas, fracción sestónica)	Ultrasonidos, ACN:H <sub>2</sub> O:TFA 80:20:0,05	LC-HRMS (LTQ-Orbitrap, MS <sup>2</sup> y HCD) Hypersil Gold 100 × 3,0 mm y 3 μm	20-40 mg /Ni	Mil'man y col., 2011
LR, RR, YR, LA, LW, LF	Nod, ATX, CYN	Agua de lago, tratada (EDAR) y de grifo MC total (intra+extra)	Ultrasonidos, SPE dual (C <sub>18</sub> y ENVI-carb)	LC-MS (Q, SIM) RP-18e 100 × 4,6 mm y 3 μm	1500-3000 / 2-100 ng/L (MDL)	Yen y col., 2011
LR, RR (gradiente 1)	ATX-a, C, CYN, dcGTX, dcNEO, dcSTX, doCYN, GTX, NEO, STX (gradiente 2)	<i>Bloom</i> natural (células liofilizadas, fracción sestónica)	Agitación 80:19,9:0,1	ACN:H <sub>2</sub> O:HCOOH LC-ESI-MS(/MS) (QqQ, SIM, SRM) TSK gel Amide-80 HILIC 250 × 2,0 mm y 5 μm	20-40 mg / 60-600 fmol	Dell'Aversano y col., 2004
LR, RR, YR, LW, LF	ATX-a, Nod	Agua de río y residual	SPE (discos C <sub>18</sub> -RPS)	LC-ESI-HRMS (TOF, <i>Full Scan</i> ) Luna C <sub>18</sub> 150 × 1,0 mm y 3 μm Fenil Hexil 150 × 1,0 mm y 3 μm	100 / 0,5 ng (abs)	Maizels y Budde, 2004

Ref.: referencia; Na: no aplica; Ni: no indicado; LOQ: límite de cuantificación; IAC: inmunoafinidad; abs: absolutos (inyectados); TFA: ácido trifluoroacético; Nod: nodularina; ATX: anatoxina; CYN: cilindrospermopsina; STX: saxitoxina; GTX: goniautoxina; NEO: neo-STX. Cuando no se indica el modo de ionización se ha trabajado en positivo.

Para la determinación de las cianotoxinas en el agua a niveles trazas es necesario incluir una etapa de purificación así como de extracción y pre-concentración de los analitos de interés. Para el análisis de MC estos tratamientos se han realizado generalmente a través de una SPE. De esta forma se pueden concentrar las cianotoxinas hasta 3 órdenes de magnitud, y por lo tanto se mejora el LOD de cualquier método analítico subsiguiente. Normalmente, al menos, 500 mL del filtrado se concentran a través de un cartucho que contiene un sorbente, por lo general una fase reversa C<sub>18</sub>, aunque otras fases estacionarias como las poliméricas (cartuchos HLB), también han sido utilizados (Aranda-Rodríguez y col., 2003; Zhang y col., 2004). La elección de los cartuchos de SPE es muy crítica. Varios parámetros, como el tamaño de poro, la carga de carbón *end-capping* y la funcionalidad (mono- o tri-) puede ser no uniforme para todos los cartuchos. El tamaño de poro debe ser suficiente para excluir a las proteínas (Edward y col., 1993; Meriluoto, 1997). Las cianobacterias se consideran ricas en proteínas y este alto contenido en ellas interfiere seriamente en el análisis mediante HPLC de las cianotoxinas. Las proteínas se desnaturalizan en el material empaquetado de fase reversa dando lugar a múltiples señales o a picos con forma distorsionada. Otra interferencia habitual en las muestras es la materia orgánica natural (NOM) del agua que es extraída con los cartuchos de C<sub>18</sub>. Se han desarrollado procedimientos que involucran la selectiva elución de las toxinas frente a las interferencias que se pueden co-extraer como la NOM utilizando cartuchos de inmunoafinidad para la concentración y la purificación de las toxinas (Nicholson y Burch, 2001). También como opción más selectiva a los cartuchos de SPE convencionales (C<sub>18</sub>), recientemente, anticuerpos recombinados y receptores sintéticos, también conocidos como MIPs, se han aplicado para la concentración y purificación de las muestras ambientales antes del análisis mediante HPLC (Chianella y col., 2003). Las toxinas se suelen eluir usando metanol y agua (por lo general 90% de metanol).

Para la separación de las diferentes variantes de MCs se han utilizado técnicas como la GC (Harada y col., 1995 y 1997; Sano y col., 1992; Tanaka y col., 1993; Tsuji y col., 2001), la LC (Barco y col., 2002; Meriluoto, 1997) y la CE (Bateman y col., 1995), siendo la LC la más empleada en el análisis de rutina de estos compuestos. La CG requiere procesos de derivatización previos o técnicas de ionización en matriz (FAB) y analizadores clásicos como los sectores magnéticos. Y la CE hasta el momento ha presentado una sensibilidad limitada.

Como se ha mencionado en el *Capítulo 1*, la separación cromatográfica se ha realizado normalmente con columnas cromatográficas de fase reversa C<sub>18</sub> o HILIC y metanol/agua o agua/acetonitrilo con una cierta proporción de ácido (ácido trifluoroacético o ácido fórmico) como fase móvil.

Algunas mejoras en el procedimiento de extracción (Lawton y col., 1994), el uso de diferentes columnas HPLC (Neffling y col., 2009) y fases móviles (Spoof y col., 2001) se han descrito en diferentes trabajos.

Con el fin de disponer de métodos más rápidos para el análisis de toxinas, se han aplicado en varias trabajos técnicas como la UHPLC (Jian y col., 2013; Neffling y

col., 2009; Oehrle y col., 2010), la SPE en línea (Beltrán, y col., 2012; Lee y col., 1999; Rivasseau y col., 2000; Shan y col., 2011) y el análisis directo sin extracción previa (Busetti y col., 2012; Zweigenbaum y col., 2000) o mediante MALDI-TOF sin separación cromatográfica (Howard y col., 2007; Welker y col., 2002).

En la *Tabla 2.2* se han indicado las técnicas de MS que han permitido la identificación y caracterización estructural de las diferentes variantes de MCs. La tabla muestra claramente que se han utilizado una amplia gama de diferentes técnicas de ionización (FAB, EI, ESI, APCI y MALDI) y analizadores (Q, IT, sector magnético, TOF, FT-ICR, QqQ, Q-TOF, LIT, Orbitrap, TOF/TOF). De hecho, la cuantificación de las MCs a niveles ultra-traza se ha realizado comúnmente utilizando modos de barrido muy selectivos y sensibles, como el SRM mediante espectrómetros de masas tipo QqQ con un amplio intervalo dinámico lineal y una excelente capacidad de cuantificación (Karlsson y col., 2005; Meriluoto y col., 2004; Spooft y col., 2003; Zhang y col., 2004) o rutinas de adquisición que tienen las ventajas de las capacidades de captura de las trampas de iones (Mayumi y col., 2006; Neffling y col., 2009; Ortea y col., 2004; Zweigenbaum y col., 2000) 3D (IT) y lineales (LIT) (Shan y col., 2011) o métodos rápidos de *screening* mediante MALDI-TOF (Howard y col., 2007; Welker y col., 2002) o los instrumentos híbridos Q-TOF (Dörr y col., 2011; del Campo y col., 2010; Ferranti y col., 2009;). Algunos trabajos, como el de Ferranti y col., 2009, prueban y comparan diferentes métodos basados en MS (en concreto: LC-ESI-IT-MS/MS, MALDI-TOF-MS y LC-ESI-Q-TOF-MS/MS) en términos de sensibilidad, reproducibilidad, selectividad y especificidad. En este trabajo, el analizador Q-TOF-MS resultó ser el más sensible y reproducible, permitiendo un análisis de las MCs altamente selectivo.

El modo de ionización positivo es el modo empleado normalmente para la ionización de las MCs. La presencia de diferentes aminoácidos dentro de su estructura cíclica permite múltiples posibilidades para la localización de la carga, así como la protonación (o cationización) y la desprotonación. Por lo tanto, recientemente se ha aplicado al análisis de MCs la ionización ESI en modo negativo (Dörr y col., 2011; Gambaro y col., 2012; Rodrigues y col., 2013). Este modo de ionización permite obtener información estructural complementaria y metodologías sensibles con LODs similares o incluso menores que los obtenidos en ESI positivo, ya que el modo de ionización negativo genera menos especies que puedan interferir, solo iones  $[M-H]^-$ . En positivo además de los iones  $[M+H]^+$  se pueden formar aductos con sodio, litio, amonio, potasio y otras especies catiónicas y las correspondientes señales doblemente cargadas.

La sensibilidad y la selectividad de los métodos químicos basados en MS para la determinación de MCs se han ido mejorando paulativamente mediante los modos de adquisición de registro selectivo de iones (SIR) y de transiciones (SRM). Por ejemplo, Spooft y col. (2003) y Ortea y col., (2004) mejoraron la sensibilidad en el análisis de MCs en células de algas trabajando en ESI-MS/MS y mediante LC-ESI-IT-MS, respectivamente, obteniendo unos LODs de 0,2  $\mu\text{g/L}$  y 0,1 ng (absolutos) en  $\text{MS}^2$  para la MC-LR. También, Zweigenbaum y col., (2000) utilizaron la LC-MS con una IT para medir cantidades traza de MCs en muestras ambientales con un LOD de 250 pg para la

MC-LR, y aplicaron experimentos de MS<sup>3</sup> para la identificación de sus estructuras. Por su parte, Mayumi y col., (2006) describen en su trabajo una metodología LC-MS<sup>n</sup> con un IT como una herramienta muy útil para el *screening* y la caracterización estructural de MCs. Después de una sencilla extracción con un volumen muy pequeño de muestra, los autores obtienen los perfiles generados mediante experimentos MS<sup>2</sup> y MS<sup>3</sup>, obteniendo información estructural crucial. En este trabajo, utilizan el espectro CID de las MCs conocidas para caracterizar variantes desconocidas, descubriendo una nueva variante y elucidando parcialmente la estructura de otra. Por su parte, el análisis mediante MALDI-TOF ha sido ampliamente utilizado debido a que permite una identificación rápida de los diferentes tipos de toxinas directamente sin separación cromatográfica previa y mediante HRMS. Welker y col. (2002) identificaron las variantes de MCs utilizando la fragmentación *post-source-decay* por MALDI-TOF-MS. En 2010, del Campo y col., descubrieron tres nuevas MCs en cultivos de *M. aeruginosa* utilizando HPLC-QqTOF-MS. Para la elucidación estructural de MCs, Miles y col. (2012) han desarrollado recientemente una técnica de derivatización con tioles previa al análisis LC-MS. Los iones producto obtenidos de las MCs derivatizadas por fragmentación CID, permiten una rápida diferenciación entre los residuos Mdha o Dha de MSer y Ser. Los experimentos se han realizado con un instrumento QqQ y también se han confirmado por HRMS con un LIT-Orbitrap, para diferenciar entre las variantes que contienen Mdha o Dhb y otras MCs análogas que co-eluyen en mezclas complejas.

Desde los años 1980-1990s con el análisis por HRMS de cianotoxinas utilizando analizadores clásicos de sector magnético e ionización FAB, con los espectrómetros de masas FT-ICR, la introducción de nuevos analizadores de HR, en concreto el Orbitrap, la actualización y mejora de los equipos de TOF y los nuevos diseños híbridos QqTOF (Thevis y Volmer, 2012), actualmente la HR y las medidas de masa exacta se han vuelto muy populares en diversas áreas bioanalíticas. Aunque, ya en los años 1980s y 1990s se obtenían resultados comparables con los experimentos de HRMS mediante FAB e instrumentos (multi)sector actualmente la nueva generación de espectrómetros de masas, FT-ICR, Q-TOF u Orbitrap, es mucho más sencilla de utilizar. Por lo que, los *screening* genéricos en modo de adquisición *Full Scan* para la detección de biotoxinas basados en LC-HRMS (Blay y col., 2011; Diehnelt y col., 2005 y 2006; Howard y Boyer, 2007; Merel y col., 2009 y 2010; Mil'man y col., 2011; Welker y col., 2002 [JCA](#)), están emergiendo con fuerza como un método complementario o alternativo a la MS/MS. Las principales aplicaciones de la HRMS son la determinación de nuevas variantes, metabolitos y productos de degradación y la confirmación de variantes conocidas (análisis cualitativo) y la cuantificación en mezclas complejas, eliminando posibles interferencias. Para la elucidación estructural, la HRMS permite medir de forma exacta y precisa la relación *m/z* de cada compuesto y asignar su fórmula empírica. En concreto, la aplicación del analizador de HRMS Orbitrap es capaz de proporcionar una identificación rápida y fiable de las toxinas, incluso cuando los estándares no estaban comercialmente disponibles (Diehnelt y col., 2005 y 2006; Merel y col., 2009 y 2010; Mil'man y col., 2011).

Para finalizar, cabe mencionar que uno de los retos analíticos en el estudio de toxinas sería utilizar un único método para extraer y detectar todas las toxinas de una

muestra. Recientemente, Yen y col., (2011) describen un método para la detección simultánea de nueve cianotoxinas (MC-LR, RR, YR, LA, LW, LF, Nod, ATX y CYN) en agua natural y potable utilizando una extracción dual de SPE acoplada al análisis LC-MS. Anteriormente otros estudios mediante LC-MS habían sido desarrollados para el estudio simultáneo de diferentes grupos de toxinas (Dell'Aversano y col., 2004; Maizels y Budde, 2004).

## 2.2. Estándares y reactivos

Todos los reactivos utilizados en esta tesis han sido de calidad analítica o para HPLC. El acetonitrilo, metanol, diclorometano y ácido clorhídrico han sido suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania). El alcohol isopropílico ha sido proporcionado por Carlo Erba (Rodano, Milan, Italia), los ácidos L(+)-ascórbico y fórmico de Panreac (Montcada i Reixac, Barcelona, Spain) y el ácido trifluoroacético de Fisons (Loughborough, UK). Se ha usado agua de alta pureza producida por un sistema Milli-Q Synergy UV system (Millipore, Bedford, MA, USA). La matriz empleada en el análisis por ionización mediante láser asistida por matriz acoplada a un analizador híbrido de tiempo de vuelo/tiempo de vuelo (MALDI-TOF/TOF), ácido  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnámico ( $\alpha$ -CHCA) se ha obtenido de Sigma (Steinheim, Alemania).

Los estándares analíticos de ácido perfluoro-n-octanoico (PFOA) y propanoico (PFPrA) y de la sal potásica de perfluoro-1-octanosulfonato (PFOS) han sido adquiridos a través de Aldrich (Steinheim, Alemania). Un estándar mezcla de ácidos perfluoro-n-butanoico (PFBA), pentanoico (PFPeA), hexanoico (PFHxA), heptanoico (PFHpA), octanoico (PFOA), nonanoico (PFNA) y decanoico (PFDA) y de sal potásica de perfluoro-1-butano, hexano y octano sulfonatos (PFBS, PFHxS y PFOS) y los estándares internos (>99%) de ácido  $^{13}\text{C}_4$ -perfluoro-n-butanoico ( $^{13}\text{C}_4$ -PFBA),  $^{18}\text{O}_2$ -sodio perfluoro-1-hexanosulfonato ( $^{18}\text{O}_2$ -PFHxS),  $^{13}\text{C}_4$ -sodio perfluoro-1-octanosulfonato ( $^{13}\text{C}_4$ -PFOS), ácido  $^{13}\text{C}_4$ -perfluoro-n-octanoico (>99%) y ácido  $^{13}\text{C}_2$ -perfluoro-n-decanoico (>99%) ( $^{13}\text{C}_2$ -PFDA) se han obtenido a través de Wellington Laboratories (Guelph, Ontario, Canada). Todas las soluciones madre han sido guardadas a 4 °C. <las soluciones madre (50 ng/ $\mu\text{L}$ ) de los productos sólidos (PFOA y PFOS) y del líquido (PFPrA) han sido preparadas individualmente por pesada en metanol. Las soluciones intermedias han sido preparadas semanalmente mediante la dilución correspondiente de la solución madre en metanol o agua para el análisis mediante LLE o SPE en línea, respectivamente. Las rectas de calibración en metanol que oscilaron entre 1 y 300 pg/ $\mu\text{L}$  para el PFOA y entre 0,5 y 500 pg/ $\mu\text{L}$  para el PFOS se han preparado diariamente con 50 y 150 pg/ $\mu\text{L}$  de los compuestos marcados, respectivamente. Y para la SPE en línea las rectas de calibración se han preparado también diariamente de 0,1 a 200 ng/L con 50 ng/L de los estándares internos.

Los estándares de MC-LA, -LR, -RR, -WR, -YR, y nodularina han sido suministrados por Alexis Biochemicals (San Diego, CA, USA). Soluciones estándar madre de cada analito individual (100 or 500 µg/mL) se han preparado por pesada en metanol y se han almacenado a -20°C. Las soluciones intermedias se han preparado semanalmente a partir de las soluciones estándar madre a través de su dilución conveniente en metanol. Soluciones metanólicas de MC-LF, -LW y -LY de entre 5 y 10 µg/mL han sido proporcionadas por Sigma (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). La MC-dmRR de 10 µg/mL en metanol ha sido adquirida a través de Cyano Biotech GmbH (Berlin, Alemania). Finalmente, la solución de 10 µg/mL en metanol de MC-dmLR ha sido suministrada por DHI (Hørsholm, Dinamarca). Las soluciones mezcla para la calibración estándar de todas las MCs se han preparado a diario con la nodularina como patrón interno.

El nitrógeno (pureza >99,999%) utilizado en las fuentes ESI y H-ESI y como gas de colisión en el espectrómetro de masas Orbitrap y el argón (Ar<sub>1</sub>) usado como gas de colisión en el QqQ han sido obtenidos a través de Air Liquide (Madrid, Spain).

### 2.3. Metodologías analíticas

Los métodos optimizados y desarrollados en la presente tesis se resumen en la *Tabla 2.3*. En todo proceso analítico podemos diferenciar claramente tres partes: pre-tratamiento, extracción y purificación y análisis instrumental.

En el análisis de PFAAs, con el objetivo de minimizar la posibilidad de contaminación con PFASs de las muestras, se evitaron los materiales de fluoropolímeros.

#### 2.3.1. Pre-tratamiento

De forma general, el pre-tratamiento realizado en todos los casos se ha limitado a algunas simples operaciones como la filtración, el ajuste del pH de la muestra y la adición de los patrones internos.

Cuando se han recibido aguas tratadas, se ha añadido ácido ascórbico al agua filtrada con el fin de eliminar el posible cloro residual presente en la muestra que podría reaccionar con los analitos (FWR, 1993; Tsuji y col., 1997). Si la muestra contiene cloro residual se inactiva añadiendo 2 mL/L de ácido ascórbico por cada 2 ppm de Cl<sub>2</sub>.

### **PFAAs**

En los métodos para el análisis de PFAAs, sencillamente, se ha acidificado la muestra a pH 2 con una solución de ácido clorhídrico diluido y se han añadido los patrones internos. Para la SPE en línea, se comprobó la adición de diferentes cantidades de ácido fórmico (0; 0,13; 0,67 y 1,33 %). Los mejores resultados se obtuvieron sin añadir ácido fórmico, por lo que se ha trabajado sin variar el pH de la muestra.

### **MCs**

Para el análisis de MCs, una vez recibidas las muestras de agua en el laboratorio se filtran inmediatamente para separar el agua (fracción extracelular o disuelta) del alga que queda retenida en el filtro (fracción intracelular o sestónica). De esta manera se determina el contenido total de MC en la muestras, diferenciando entre las MCs extracelulares del agua filtrada y las MCs intracelulares del interior de las células de cianobacteria del alga. Se utilizan filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F (Maidstone, Kent, Reino Unido) y la fracción sestónica queda definida como las partículas retenidas en estos filtros de 0,7  $\mu\text{m}$ . El filtro con la biomasa se congela y descongela para favorecer la lisis de las células y la extracción de las toxinas. Cuando las muestras han contenido una cantidad importante de alga después de filtrar toda la muestra se ha procedido a su liofilización para poder obtener y conservar esta material para diversos estudios.

El agua filtrada se conserva refrigerada a 4°C hasta su análisis (habitualmente en las 48 h siguientes al muestreo). Para su almacenamiento durante un tiempo más prolongado, éstas se conservan en el congelador a -20°C para prevenir la degradación biológica y física.

El filtro con las células de cianobacterias retenidas o el liofilizado obtenido se conservan congelados (-20°C) hasta su análisis. El proceso de congelación-descongelación favorece la ruptura de la membrana celular de las células de cianobacteria para que liberen la toxina intracelular, mejorando así la extracción de las MCs intracelulares contenidas en su interior (Gjolme y Utkilen, 1994).



**Tabla 2.3.** Información general de los métodos optimizados y desarrollados en la presente tesis.

	PFAAs			MCs y compuestos relacionados				
	Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Método 5	Método 6		
Análisis	Tipo	<b>Dirigido</b>						
	Analitos	PFOA y PFOS	PFCAs (C3-C10) y PFSAAs (C4, C6 y C8)	dmRR, RR, dmLR, LR, YR, WR, LA, LF, LW, Nod	<b>Screening</b> de MCs y compuestos relacionados			
	Matriz	Agua superficial, tratada, potable y subterránea		Agua superficial, tratada y potable	Agua superficial	Agua superficial y cultivos		
	Fracción	Na	Na	Extracelular	Intracelular			
Pretratamiento	Eliminar Cl <sub>2</sub> residual, acidificación a pH 2 y adición IS		Eliminar Cl <sub>2</sub> residual y adición IS	Eliminar Cl <sub>2</sub> residual, filtrar y adición IS	Filtrar y adición IS	Filtrar, liofilizar y congelar-descongelar, adición IS		
Extracción y purificación	Extracción	LLE, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :IPA 90:10		SPE en línea EQuan		Inyección directa 10 o 100 µL	Ultrasonidos, MeOH 0,16% HCOOH	
	Columna SPE	Na	Strata-X (20 × 2,0 mm y 25 µm) + Hypersil Gold C18 (10 × 2,1 mm y 12 µm)	Hypersil Gold C18 (10 × 2,1 mm, 12 µm)		Na	Na	
	Fase móvil carga	Na	100%H <sub>2</sub> O		95% H <sub>2</sub> O 0,08%HCOOH 5% ACN 0,08%HCOOH	Na	Na	
	Flujo	Na	1 mL/min		Na	Na		
	Volumen muestra	200 o 1000 mL		1 mL		10 o 100 µL	25 mg liofilizado	
	Recuperaciones (%)	86-95PFOA y 69-82 PFOS		75-119 (27 PFPrA)		89-121	67-133	61-89
Cromatografía	Columna analítica	Hypersil Gold C18 (Pre-columnaC18 XBridge)			Phenomenex Luna C18(2)			
	Dimensiones	50 × 2,1 mm(10 × 2,1 mm)			150 × 2,0 mm			
	Tamaño partícula	1,9 µm (2,5 µm)			5 µm			
	Volumen inyección	10 µL		1 mL		10 o 100 µL	10 µL	
	Fase móvil	Gradiente lineal MeOH: H <sub>2</sub> O			Gradiente lineal ACN:H <sub>2</sub> O con HCOOH 0,08%			
Flujo	200 µL/min							
MS	Instrumento	LC-ESI-MS/MS, QqQ TSQ QUANTUM			LC-ESI-HRMS Orbitrap-Exactive HCD		4800 Plus MALDI-TOF/TOF-MS	
	Ionización	ESI (-)			ESI (+)		ESI (+/-)	MALDI (+/-)
	Modo de adquisición	SRM			Full Scan y AIF		Full Scan y MS/MS	
	Resolución <sup>a</sup>	Δm:0,1 Q1 y 0,7 (unitaria) Q3			50000		20000	
	Exactitud	Na			< 3 ppm (calibración externa)		< 6 ppm (cal. externa)	
Método	IPs mínimos	4			9 o 11 (si la MC tiene también señal [M+2H] <sup>2+</sup> )		7	
	LOQ (ng/L)	4,2 PFOA Y 1,1 PFOS		0,5-10		20	60-200	10

<sup>a</sup> Resolución especificada en el experimento de MS del instrumento; ACN: Acetonitrilo; IPs: Puntos de identificación.

Na: no aplica.

### 2.3.2. Tratamiento, extracción y purificación

#### PFAAs

La extracción y purificación de las muestras acuosas para el análisis de PFAAs se ha realizado, inicialmente por LLE (PFOA y el PFOS) y finalmente por SPE en línea al sistema LC-ESI-MS/MS (QqQ) para un total de 11 PFAAs (C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> PFCAs y C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub> y C<sub>8</sub> PFSAs).

Para el análisis en un primer estudio de la presencia de PFOS y PFOA en aguas superficiales de Cataluña (España) y su eliminación en una ETAP, las muestras de agua se concentraron mediante LLE de acuerdo con el método desarrollado por Barco y col. (2003) con algunas ligeras modificaciones. Brevemente, 200 o 1000 mL de agua superficial o tratada, respectivamente, se han utilizado para la extracción después de su ajuste a pH 2 con una solución de ácido clorhídrico diluido. A continuación, se han añadido los patrones internos, <sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFOA and <sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFOS, para la cuantificación por dilución isotópica, y las muestras de agua se han extraído dos veces consecutivas con 100 mL de una mezcla de diclorometano / alcohol isopropílico (90:10 v/v). Los extractos se filtraron con filtros de papel Whatman (Maidstone, U.K.). Los dos extractos se recogen y se mezclan para evaporar a sequedad a 40 °C bajo una ligera corriente de nitrógeno. Los extractos son reconstituídos en 500 µL de metanol, fortificando con <sup>13</sup>C<sub>2</sub>-PFDA como patrón de recuperación, y finalmente se han filtrado en jeringa con un filtro de nylon de 0,22 µm. La cuantificación de los analitos se ha realizado por dilución isotópica (IDMS). En una fase inicial de la validación del método e llevaron a cabo una serie de experimentos para determinar la precisión y exactitud de la extracción y del procedimiento analítico. Para definir la recuperación del PFOA y del PFOS, una mezcla de ambos compuestos se fortificó en agua prístina envasada a dos niveles de concentración (a 10 y 150 ng/L del PFOA y a 5,0 y 250 ng/L del PFOS). Estas muestras se extrajeron siguiendo el mismo procedimiento que las muestras reales. Las recuperaciones calculadas oscilaron ente 86-95% y 69-82% para el PFOA y el PFOS respectivamente (ver *Tabla 2.3*). Para comprobar las recuperaciones en la extracción de cada muestra, se calcula la recuperación de los patrones internos, <sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFOA and <sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFOS, añadidos antes de la extracción, con respecto al <sup>13</sup>C<sub>2</sub>-PFDA, incorporado al final. El LOD y de el límite de cuantificación (LOQ) se han calculado como la señal media de los analitos en muestras blanco (agua prístina envasada, n=5) más tres y diez veces la desviación estándar, respectivamente. El LOD determinado ha sido de 1,9 y 0,4 ng/L para PFOA y PFOS, respectivamente, y el LOQ de 4,2 y 1,1 ng/L, como se muestra en la *Tabla 2.3*.

El método de SPE en línea para el análisis de PFCAs (C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>) y PFSAs (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>8</sub>) se describe detalladamente en el *apartado 2.5 (2.5.1)*.

## MCs

Después de filtrar la muestra (agua y alga) en el pre-tratamiento para el análisis de MCs, se obtienen dos fracciones: el agua filtrada (fracción intracelular) y la fracción sestónica o intracelular. Cada fracción se analiza independientemente.

Para la extracción y purificación del agua filtrada se ha desarrollado un método de SPE en línea al sistema LC-ESI-MS/MS (QqQ) para el análisis dirigido de las MCs más habituales de las que se dispone de patrón comercial, y un método de inyección directa y análisis mediante cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución con ionización por electroespray (LC-ESI-HRMS, Orbitrap-Exactive HCD) para el *screening* de las más de 90 variantes conocidas de MCs. Antes del análisis, una alícuota de 10 mL de la muestra de agua filtrada libre de cloro se fortifica con nodularina para la cuantificación por calibración interna a una concentración final de 1 µg/L (20 µL de 0,5 ng/µL). El volumen de inyección es de 1 mL de la muestra por SPE y de 10 o 100 µL, según se trate de una muestra de bajo o alto nivel de concentración, si se introduce por inyección directa en el sistema LC/ESI-HRMS. El método de SPE en línea para el análisis de MCs se describe detalladamente en el apartado 2.5 (2.5.2).

Por su parte la fracción intracelular se ha determinado de forma cualitativa con un proceso muy sencillo de preparación de muestra para su análisis por MALDI-TOF/TOF-MS y una extracción con MeOH acidificado para su análisis por LC-ESI-HRMS (Orbitrap-Exactive HCD) que se describen a continuación.

De forma rápida, el análisis cualitativo de la fracción sestónica se ha realizado directamente sobre el sólido liofilizado sin pre-concentración ni separación cromatográfica por MALDI-TOF/TOF. Una pequeña cantidad de liofilizado se ha disuelto en una disolución 0,1% de ácido trifluoroacético en H<sub>2</sub>O/acetonitrilo (1/1, v/v). 1 µL de esta disolución de la muestra se ha mezclado con 24 µL de la disolución de matriz, se ha depositado en la placa de MALDI y se ha dejado secar a temperatura ambiente. La matriz utilizada ha sido una solución de α-CHCA (10 mg/mL de α-CHCA en la misma disolución de 0,1% ácido trifluoroacético en H<sub>2</sub>O/acetonitrilo (1/1, v/v)).

En cambio, para llevar a cabo la determinación cuantitativa de MCs a nivel intracelular mediante LC-ESI-HRMS, una cantidad definida de células de cianobacteria, liofilizadas o retenidas en un filtro según el caso, se ha fortificado con nodularina como patrón interno y se ha extraído con metanol acidificado siguiendo el método de Barco y col. (2005). La extracción de la fracción intracelular se ha realizado de forma equivalente con el filtro y el liofilizado. De forma breve, inicialmente, una solución estándar de nodularina se ha añadido directamente sobre el filtro o el liofilizado para obtener una concentración final de 0,2 ng/µL (20 µL de 10 ng/µL). Se han realizado 3

extracciones seguidas de 15 minutos cada una con metanol acidificado en un baño de ultrasonidos, los extractos se han mezclado y se han concentrado hasta sequedad con una corriente de N<sub>2</sub> a 40°C. El extracto final se ha reconstituido en 1 mL de metanol.

### 2.3.3. Análisis instrumental

Se ha trabajado con tres sistemas diferentes de MS (ver esquemas en Figuras 2.1, 2.2 y 2.3):

**LC-ESI-MS/MS:** espectrómetro de masas QqQ modelo TSQ Quantum (Thermo Fisher Scientific San Jose, CA, EE.UU.) equipado con una fuente de ionización ESI, dos bombas de líquidos Surveyor MS Plus y LC Plus para la separación cromatográfica y la pre-concentración, respectivamente, un automuestreador HTC PAL y una válvula de inyección de seis puertos. Como se muestra en la Figura 2.1 la fuente de ESI es *off-axis* y la celda de colisión forma un ángulo de 90°.

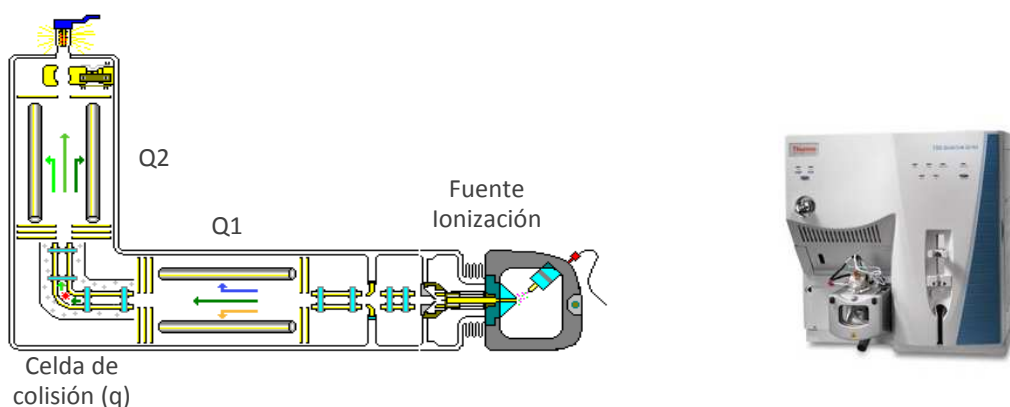


Figura 2.1. Esquema y fotografía del espectrómetro de masas QqQ (TSQ Quantum).

**LC-ESI-HRMS:** espectrómetro de masas modelo Orbitrap-Exactive HCD (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania) equipado con una fuente de ionización por electroespray asistido térmicamente (H-ESI II), una bomba de líquidos Surveyor MS Plus y un automuestreador Accela Open AS (Thermo Fisher Scientific, San Jose, California) termostatzado a 15°C. La fuente H-ESI es muy similar a la del QqQ (*off-axis*) pero asistida térmicamente. El C-Trap acumula los iones para enviarlos hacia el analizador Orbitrap. La celda HCD es una celda de colisión de alta energía.

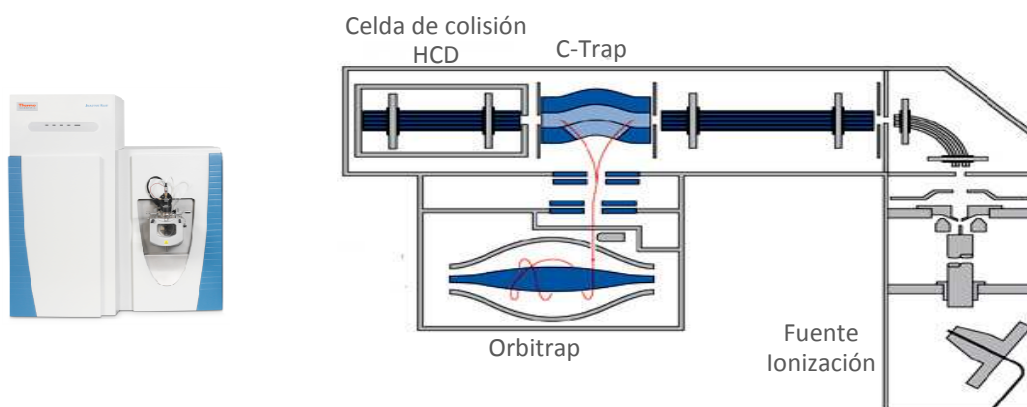


Figura 2.2. Esquema y fotografía del espectrómetro de masas Orbitrap-Exactive HCD.

**MALDI-TOF/TOF-MS:** espectrómetro de masas modelo 4800 Plus (ABSciex - 2010, Foster City, CA) equipado con un láser Nd:YAG (355 nm, 200 Hz, 3-7 ns) y con reflectrón.

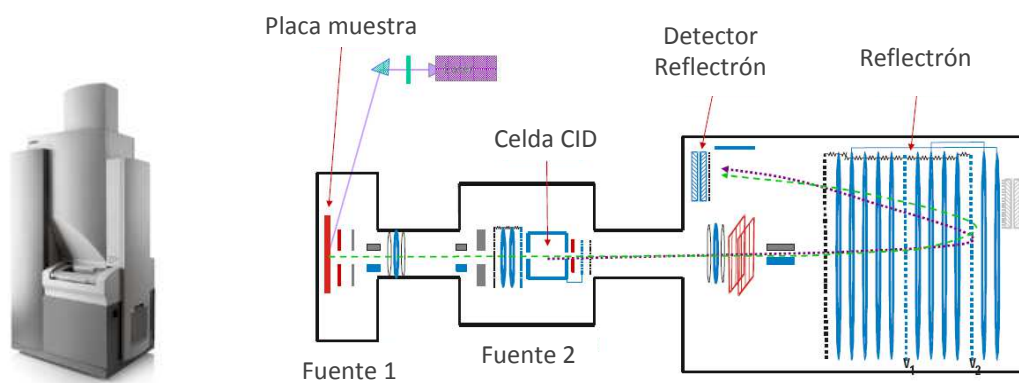
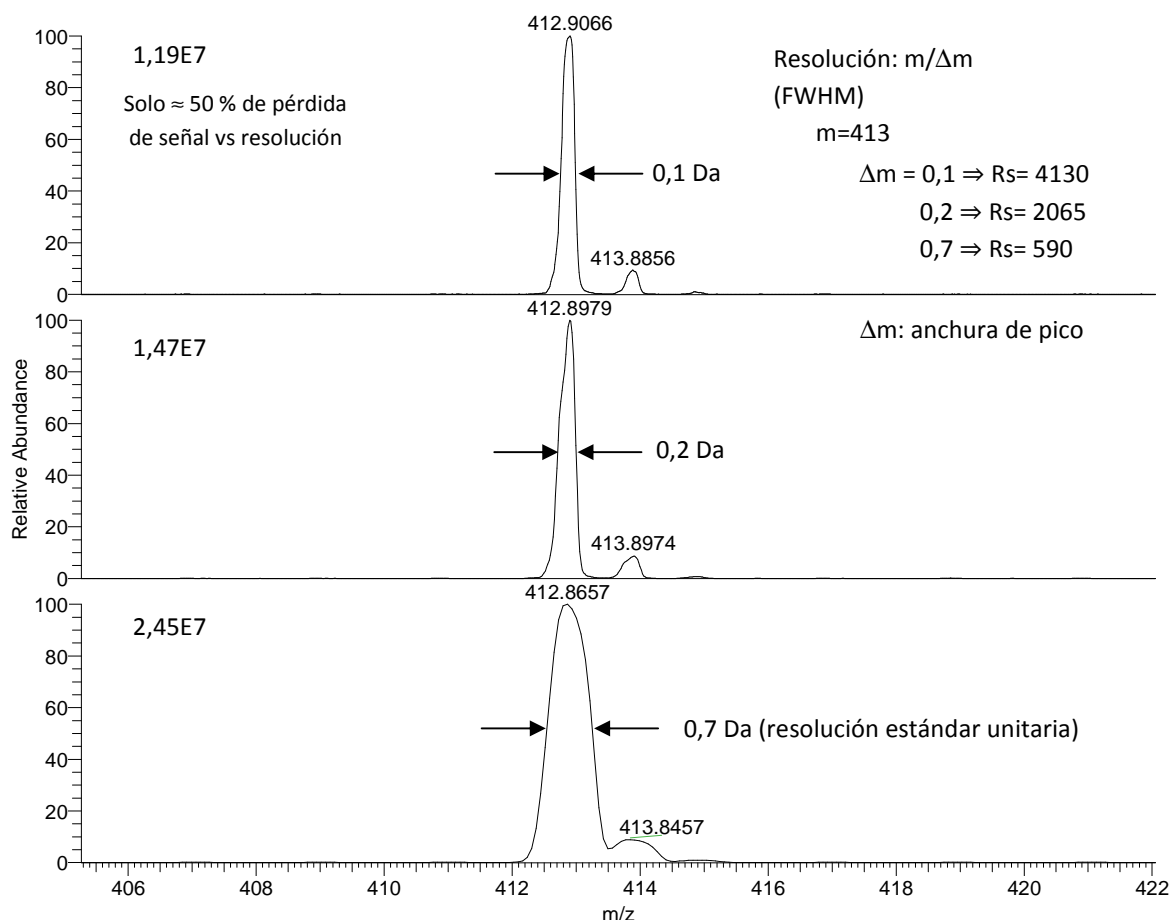


Figura 2.3. Esquema y fotografía del espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF 4800 Plus.

El cuadrupolo por definición tiene resolución unitaria ( $\Delta m$ : 0,7 Da). Los cuadrupolos de este espectrómetro de masas son hiperbólicos, lo que ha permitido trabajar en modo *High-Selected Reaction Monitoring* (H-SRM) con cierta resolución (< 0,7 Da; en concreto en nuestro método hemos adquirido a 0,1 Da en el primer cuadrupolo) y realizar medidas de masa exacta con errores menores de 5mDa, sin una pérdida importante de sensibilidad como se muestra en la *Figura 2.4*. Con el instrumento híbrido tiempo de vuelo/tiempo de vuelo (TOF/TOF) y el analizador Orbitrap, la resolución experimental (*Full Width at Half Maximum*, FWHM) fue siempre superior a 18000 y a 27000 (teóricamente 50000 a  $m/z$  200 y velocidad de 2Hz en el experimento) respectivamente, en todo el intervalo de masas de interés. Hay que destacar que el Orbitrap puede trabajar a la misma resolución en los dos modos de adquisición, *Full Scan* y *All Ion Fragmentation* (AIF). En cambio el TOF/TOF trabaja a menor resolución (9000) para el modo de fragmentación con respecto al *Full Scan* (18000). Con los equipos de HRMS se ha trabajado siempre con calibración externa y la exactitud de masa expresada como partes por millón (ppm). La exactitud de masa con valor absoluto en todos los casos fue inferior a 3 ppm para los iones moleculares y fragmentos. Aunque, cabe destacar que para las señales con intensidad media siempre fue incluso inferior a 1,5 ppm y que osciló entre 1,5 y 3 ppm para las señales de intensidad baja. Por lo tanto, para la identificación de las señales, se ha trabajado con una ventana de extracción máxima de  $\pm 3$  ppm. La *Tabla 2.3* muestra la resolución y exactitud de masa en todos los equipos.

Para la elucidación estructural y la identificación de las sustancias es crucial conocer su masa exacta y correcta composición elemental. Para calcular la masa exacta teórica de los analitos ( $m/z$  calculada), se ha tenido en cuenta la masa del electrón (0,00055 Da). Además de una HR y exactitud adecuadas, para garantizar la identificación y las fórmulas elementales propuestas, se utilizaron los siguientes criterios restrictivos: limitar los elementos ha considerar de acuerdo con la fórmula empírica teórica, en el caso de las MCs (C:30-60, H:50-90, O:0-20, N:0-20, S:0-1); comparar el perfil isotópico,  $\Delta < 20\%$  en las señales M+1 y M+2; y, tener en cuenta la carga, el RDB (*Ring plus Double Bond equivalents*) y la regla del nitrógeno. La combinación de la HR, AMM y los criterios restrictivos ha sido crucial para la identificación inequívoca de los compuestos a analizar y de sustancias desconocidas así como para una precisa cuantificación de los analitos.



**Figura 2.4.** Resolución de aislamiento del precursor con el espectrómetro de masas TSQ Quantum para el PFOA. Modo de adquisición H-SRM.

A continuación se describen las condiciones analíticas para cada análisis. En todas las metodologías que incluyen separación analítica por LC, el tiempo de retención específico de cada compuesto se utiliza como herramienta primaria de identificación. El tiempo de retención en los patrones de la recta de calibrado y en las muestras debe coincidir: la relación entre el tiempo de retención cromatográfico del analito y del patrón interno (respectivo PFAAs marcado isotópicamente con  $^{13}\text{C}$  o nodularina), se ajustará al de las soluciones de calibración con una tolerancia de  $\pm 2,5\%$ .

### Análisis LC-ESI-MS/MS de PFAAs

10 µL de los extractos del tratamiento de LLE para el análisis de PFOA y PFOS, han sido inyectados en el espectrómetro de masas QqQ para su análisis por LC-ESI-MS/MS. Para la separación cromatográfica se ha utilizado una columna de fase reversa Hypersil Gold (50 x 2,1 mm y 1,9 µm, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) precedida de una pre-columna C<sub>18</sub> XBridge (10 x 2,1 mm y 2,5 µm, Waters, Mildford, MA, USA) y un gradiente de elución lineal entre agua y metanol como fases móviles A y B, respectivamente, a un flujo de 200 µL/min (ver *Tabla 2.4*). Se empieza al 30% de B y se va subiendo el % de fase orgánica hasta el 100 % en 7 min. Este porcentaje se mantiene 3 min y se vuelve a las condiciones iniciales con un tiempo de re-equilibración de 10 min. Los análisis se han realizado en ESI negativo con las condiciones óptimas descritas en el *apartado 2.4.1.* de la presente tesis. Los datos han sido adquiridos en modo H-SRM, con una anchura de pico de 0,1 y 0,7 Da definida al 50% de altura (FWHM) para el primer y tercer cuadrupolo, respectivamente, a 0,01 Da/barrido. Lo que quiere decir que el aislamiento del ion precursor en cada transición se ha hecho con 0,1 Da de resolución y un error < 5 mDa, eliminando posibles interferencias que pudieran dificultar la identificación, confirmación y cuantificación de los analitos. Las transiciones monitorizadas y las condiciones MS/MS óptimas se resumen en la *Tabla 2.9*. En el modo de adquisición SRM se han monitorizado dos transiciones para cada compuesto, una para la cuantificación y una segunda para la confirmación, excepto para los patrones internos. Se calcula una relación entre estas dos transiciones (Decisión 2002/657/CE) que debe cumplir una tolerancia recogida en esta normativa cuando se compara su valor en las muestra con los patrones de cuantificación. La adquisición de los datos se ha realizado con el software Xcalibur 2.0.7 (Thermo Fisher Scientific).

**Tabla 2.4.** Gradiente de elución lineal para la separación analítica de los PFAAs con la columna Hypersil Gold C<sub>18</sub> 50 × 2,1 mm, 1,9 µm. Flujo de 200 µL/min.

Tiempo(min)	%A	%B
0	70	30
3,0	70	30
10,0	25	75
13,0	0	100
15,0	70	30
25,0	70	30

Posteriormente, para el análisis de los 11 PFAAs por SPE en línea al sistema LC-ESI-MS/MS se han utilizado las mismas condiciones analíticas (columna, pre-columna, fases móviles y gradiente) descritas para el análisis de los extractos de la LLE, añadiendo las transiciones óptimas de todos los analitos (ver *Tabla 2.9*) y las condiciones de la SPE en línea. En el *apartado 2.5* se detalla este proceso de SPE en línea.



### **Análisis LC-ESI-MS de MCs (QqQ-MS/MS; Orbitrap-HRMS y AIF)**

Con el equipo QqQ, el análisis de las dos fracciones, intra- y extracelular, se ha llevado a cabo en modo ESI positivo en las condiciones de voltajes, temperatura y gases descritas en el apartado 2.4.1 y resumidas en la Tabla 2.6. Para el screening de las diferentes variantes de MCs, los datos fueron adquiridos en el modo *Full Scan* ( $m/z$  400-1200, 1,2 seg/barrido) y en el modo SRM para el análisis dirigido de la MC-LR, -RR, -YR y nodularina (patrón interno), inicialmente. Más tarde se incluyó en el experimento SRM la -dmRR por ser una variante muy frecuente en las muestras analizadas, y finalmente se ajustó el método para las MC de las que se dispuso de patrón comercial (MC-dmLR, -dmRR, -LA, -LF, -LR, -LW, -LY, -RR -WR y -YR). En el modo de adquisición SRM se han monitorizado dos transiciones para cada compuesto, una para la cuantificación y una segunda para la confirmación. Se calcula una relación entre estas dos transiciones (Decisión 2002/657/CE). Las condiciones de MS/MS óptimas para cada MC se muestran en la Tabla 2.10.

Por otra parte, la determinación de las MCs intra- y extracelulares en las dos fracciones por LC/ESI-HRMS se ha realizado en el espectrómetro de masas Orbitrap-Exactive HCD. Los análisis se llevaron a cabo en modo de ionización ESI positivo y negativo, por lo que el instrumento se calibró diariamente en ambos modos de ionización. Las condiciones de trabajo óptimas se describen en el apartado 2.4 y Tabla 2.6. Los datos han sido adquiridos alternadamente en modo *Full Scan* y fragmentación de todos los iones (AIF), sin necesidad de aislar el precursor. Tres segmentos de tiempo han sido establecidos en cada modo de ionización. En ESI positivo se adoptaron: dos experimentos de análisis MS en el primer segmento (0-12 min) sin y con AIF (HCD 30 eV); tres experimentos de análisis MS en el segundo segmento (12-30 min) sin y con AIF (HCD 50 y 70 eV); y tres experimentos de análisis MS en el tercer segmento (30-65 min) sin y con AIF (HCD 32 y 60 eV). Por su parte, en ESI negativo se aplicaron: dos experimentos de análisis MS en el primer segmento (0-12 min) sin y con AIF (HCD 32 eV); tres experimentos de análisis MS en el segundo segmento (12-30 min) sin y con AIF (HCD 51 y 57 eV); y tres experimentos de análisis MS en el tercer segmento (30-65 min) sin y con AIF (HCD 50 y 60 eV). El intervalo de masas de trabajo ha sido  $m/z$  400-1200 en modo de adquisición *Full Scan* y  $m/z$  60-1200 en modo AIF. El control automático de ganancia (AGC) se ha establecido como "equilibrado" con un tiempo de inyección máxima de 250 ms. En el método se ha trabajado con la opción de HR (50000, 2Hz) y la resolución experimental ha sido inferior a 40000 para todo el intervalo de  $m/z$  de trabajo. Los datos se han procesado con el software Xcalibur 2.1 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania)

Para la separación cromatográfica en las metodologías LC-ESI-MS/MS y LC-ESI-HRMS se ha utilizado una columna de fase reversa Phenomenex Luna C<sub>18</sub> (2) (150 x 2,0 mm y 5 μm). Las fases móviles empleadas han sido agua Milli Q como disolvente A y acetonitrilo como disolvente B, conteniendo ambas ácido fórmico al 0,08% (v/v). La

velocidad de flujo de trabajo ha sido de 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Para el análisis dirigido de las MCs más frecuentes en las muestras estudiadas (MC-LR, -RR, -YR y-dmRR) se ha trabajado en modo isocrático 70:30 A:B, adquiriendo en modo SRM en el caso del espectrómetro de masas QqQ para mejorar la sensibilidad del método. En cambio, el programa de elución en gradiente lineal para el estudio exhaustivo de las muestras y el *screening* de las más de 90 variantes de MCs descritas en la bibliografía ha sido: 10-30% de B 10 min, 30-35% de B 20 min, 35-55% de B 15 min, 55% de B 5 min, 55-90% de B 2 min, 90% de B 3 min y por último se regresa a las condiciones iniciales para reequilibrar el sistema (10% de B 10 min). La duración total del método es de 11 minutos en modo isocrático y de 65 minutos si se trabaja con el gradiente entre las fases móviles.

El volumen de inyección del extracto en ambos equipos, QqQ y Orbitrap, ha sido de 10  $\mu\text{L}$  para el extracto metanólico de la fracción intracelular y para la inyección directa del agua filtrada para muestras concentradas. Para la inyección directa del agua filtrada en muestras de bajo nivel de concentración se han inyectado 100  $\mu\text{L}$ . Y, por último en el análisis por SPE en línea al sistema LC-ESI-MS/MS el volumen de muestra ha sido de 1 mL. Las condiciones para este último método se describen en el *apartado* 2.6.

### **Análisis MALDI-TOF/TOF-MS de MCs**

Para obtener los espectros de masas, el equipo MALDI-TOF/TOF modelo 4800 Plus se ha utilizado en el modo de reflectrón, y los experimentos se han llevado a cabo en el modo de ionización positivo y negativo, en el intervalo de masas  $m/z$  400-2000. 400 nanosegundos después de la incidencia del láser, se ha aplicado un voltaje de aceleración de 20 kV. Los iones se han reorientado en el reflectrón de dos etapas y se han detectado en el segundo detector. El voltaje del espejo 2 a la fuente 1 se ha mantenido constante en una relación de 1,105. Para trabajar en MS/MS, el voltaje de la fuente 1 se ha mantenido a 8 kV, y el valor de láser se ha utilizado 1000 unidades más alto que en los experimentos de MS. Para la fragmentación, los iones precursores se han seleccionado por medio de un selector de iones transitorio con una resolución de 250 (FWHM). Los iones seleccionados han desacelerado antes de su llegada a la cámara de colisión, y se han disociado, como ya se ha mencionado anteriormente, por colisión con aire a una energía cinética de 1 keV (alta energía de CID). Los iones fragmento se han re-acelerado en la segunda fuente a 15 kV después de un breve retraso. El supresor metaestable se ha activado en todos los experimentos MS/MS para evitar la detección de iones precursores restantes y fragmentos metaestables no deseados. Los espectros MS/MS se han adquirido también en ambos modos de ionización, positivo y negativo, en el intervalo de masas  $m/z$  9-1200. Como se ha mencionado anteriormente, la resolución experimental para todo el intervalo de  $m/z$  de trabajo ha sido superior a 18000 y 9000 en MS y MS/MS, respectivamente. La

calibración de masa externa se realizó con estándares de péptidos de baja masa (PerSeptiveBiosystems, Monza, Italia). El software utilizado para el tratamiento espectral ha sido el Data Explorer (incluyendo suavización y filtrado de ruido).

#### 2.4. Caracterización de compuestos emergentes por espectrometría de masas

La MS se ha utilizado para la determinación del peso molecular de compuestos purificados. Junto a la información proporcionada por HRMS, MS/MS y RMN, ha permitido la caracterización de nuevas sustancias. El FAB ha sido una de las primeras fuentes de ionización utilizadas para la MS de compuestos no volátiles y polares, como los péptidos y proteínas. Sin embargo, RMN y FAB-MS no se utilizan en el análisis de rutina ya que normalmente requieren cantidades de muestra relativamente grandes y compuestos completamente purificados (Botes y col., 1984; Harada, 1996; Namikoshi y col., 1995).

Desde la introducción de la ionización ESI para la MS (Fenn y col., 1989), esta técnica se ha aplicado por acoplada al análisis de compuestos obteniéndose unos perfiles de fragmentación muy similares a los de FAB-MS y espectros más sencillos con menos cantidad de muestra y sin necesidad de utilizar una matriz para la ionización.

También se ha descrito la utilización de MALDI-TOF para la identificación de sustancias empleando volúmenes de muestra muy pequeña, menos de 1 µg, y sin ningún tipo de separación previa. La formación de iones en MALDI es pulsante por lo que se ha utilizado preferentemente acoplado a analizadores TOF.

Para la elucidación estructural exhaustiva de la estructura de nuevos compuestos es útil combinar la MS con otras técnicas complementarias, incluyendo la RMN, la degradación química y el análisis de aminoácidos quirales, etc.

En la primera parte de este capítulo se muestra la caracterización de los compuestos en estudio por MS con fuentes de ionización ESI y MALDI y por fragmentación con diferentes mecanismos (CID, HCD), técnicas disponibles durante la realización de este trabajo. Se han utilizado tres instrumentos (un ESI-QqQ, un ESI-Orbitrap-Exacte-HCD-MS y un MALDI-TOF/TOF-MS) en diferentes modos de adquisición (*Full Scan*, MS/MS y AIF).

Típicamente, el modo de ionización más frecuentemente utilizado para el análisis de PFAAs y MCs, respectivamente, es el negativo y positivo. Recientemente, también la ionización ESI en modo negativo se ha aplicado al análisis de MCs (Dörr y col., 2011; Gambaro y col., 2012; Rodrigues y col., 2013).

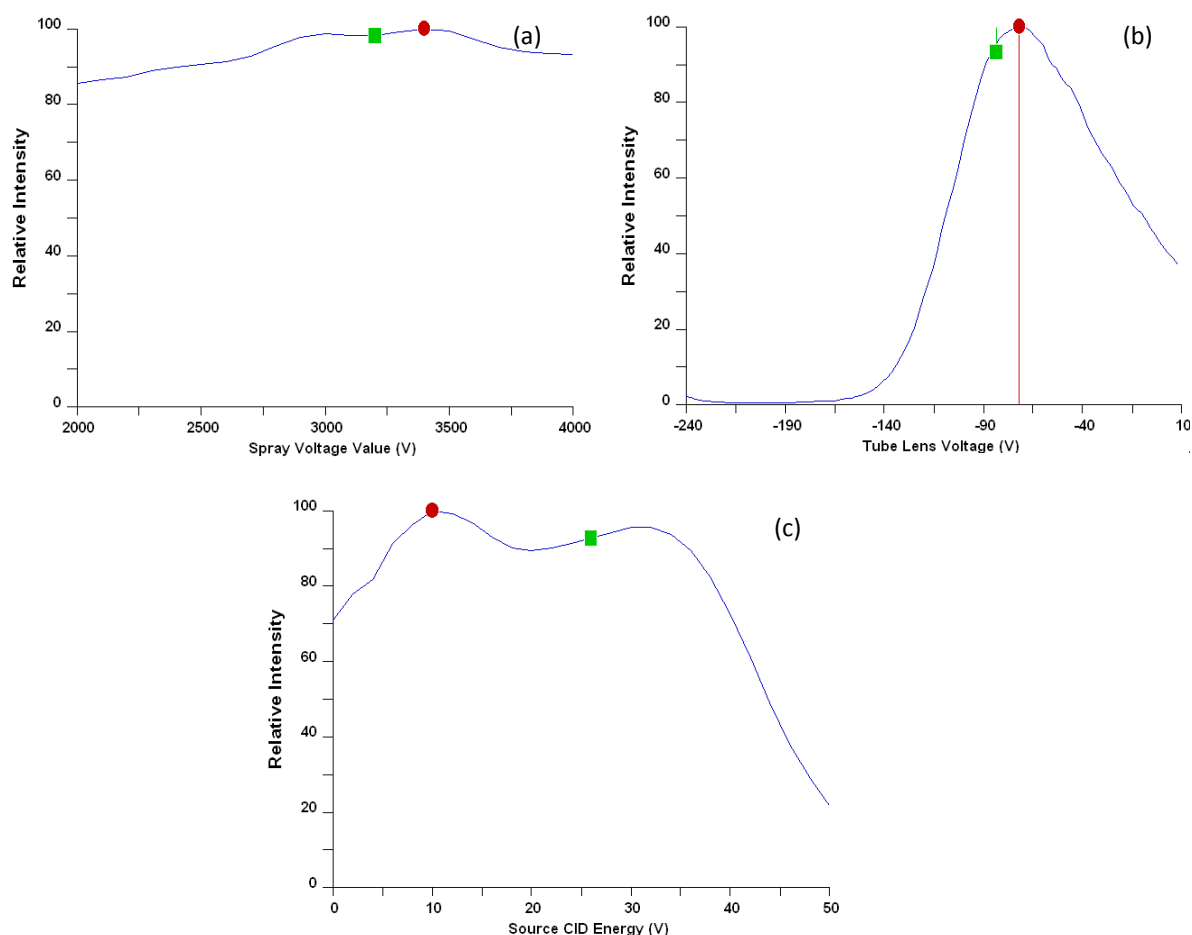
Inicialmente, se ha verificado y optimizado la ionización de los patrones comerciales disponibles de los compuestos en estudio individualmente y en mezclas. Posteriormente, las técnicas de ionización se aplicaron a muestras reales.

El espectro de masas de cada sustancia individual es como su “huella dactilar”, y la identificación se realiza por comparación con su estándar. Los espectros de masas son relativamente fáciles de interpretar y proporcionan el peso molecular. En el espectro de masa se detectan principalmente la especie desprotonada y protonada,  $[M-H]^-$  y  $[M+H]^+$ , en modo de ionización negativo y positivo, respectivamente, y en el caso específico del ESI-MS, adicionalmente se pueden producir iones multicargados como los divalentes  $[M+2H]^{2+}$ . Extensivamente, los perfiles de fragmentación que se obtienen mediante fragmentación en la fuente o MS/MS son muy útiles para confirmar la identificación de los analitos, para obtener información estructural de las sustancias y para la detección de compuestos desconocidos en matrices complejas. En particular se suelen utilizar iones fragmentos característicos como herramienta de diagnóstico para la identificación y confirmación de contaminantes orgánicos en muestras ambientales susceptibles de contener un gran número de compuestos interferentes.

#### 2.4.1. Ionización ESI y MALDI

En ESI se ha trabajado con un espectrómetro de masas QqQ para el análisis de PFAAs y MCs por SPE en línea con la LC-ESI-MS/MS y con un equipo equipado con un Orbitrap para el análisis de MCs y péptidos relacionados mediante LC-ESI-HRMS. Para optimizar las condiciones de la fuente y la transmisión para la ionización ESI, una solución estándar en metanol de 1 mg/L de cada compuesto se ha infundido a una velocidad de flujo de 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  usando una bomba de jeringa. En el caso del espectrómetro de masas QqQ la jeringa está integrada en el mismo equipo y para el sistema Orbitrap la jeringa está en un dispositivo externo modelo Chemyx Fusion 100 (Thermo Fisher Scientific). En ambos casos, la disolución estándar se mezcla con la fase móvil (200  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) mediante una unión en *t-Valco* de volumen muerto cero (Supelco, Alcobendas, España). La fase móvil para los PFAAs ha sido  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$  (50:50 v/v); y para las MCs  $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}:\text{HCOOH}$  (50:50:0,08, v/v). Las condiciones a optimizar son los voltajes (de la sonda de ESI, del capilar, de la lente de tubo y del *skimmer*) y las condiciones de la fuente (temperatura y gases). Se varían las condiciones en el intervalo de trabajo del instrumento y se obtienen unas gráficas con el máximo en el valor óptimo de cada condición (ver *Tabla 2.5*). El voltaje de la lente de tubo es un parámetro crítico y característico de cada compuesto con un valor óptimo para cada  $m/z$ , se utiliza para evitar los clústeres con la fase móvil pero si su valor es demasiado elevado puede producir la fragmentación en la fuente. Cuando se trabaja en *Full Scan* este parámetro funciona en el equipo QqQ siguiendo la tabla de calibración del equipo. Se calibra con politirosina que da tres señales en todo el intervalo de trabajo

( $m/z$  180,1; 506,2; y 995,4 en modo de ionización negativo). En cambio en el equipo Orbitrap funciona como un valor único para todo el intervalo de  $m/z$  de trabajo. Los datos fueron adquiridos inicialmente en el modo *Full Scan* ( $m/z$  30-1200, 0,6 seg/barrido) abarcando todo el intervalo de trabajo del instrumento para ver que señales se obtienen en cada caso, por si se produjeran fragmentaciones, iones multicargados, clústeres o especies multiméricas. Para la optimización de los parámetros se escoge la señal mayoritaria y característica de cada compuesto para su monitorización.



**Figura 2.5.** Curvas de optimización de los voltajes aplicados en: (a) la sonda de ESI (*spray voltage*); (b) la lente de tubo (*tube lens*); y, (c) el *skimmer*, para el PFOS ( $m/z$  499,0) en el QqQ.

En la *Tablas 2.5* y *2.6* se muestran las condiciones de trabajo en las que se han obtenido los espectros de masas de los PFAAs en modo de ionización ESI negativo y de las MCs en modo de ionización ESI positivo y negativo. Aunque la fuente de ionización del Orbitrap es de ESI asistido térmicamente (H-ESI), se ha trabajado a una temperatura de la sonda de 30 °C.

**Tabla 2.5.** Condiciones de trabajo para el análisis de PFAAs por espectrometría de masas en modo de ionización ESI negativo.

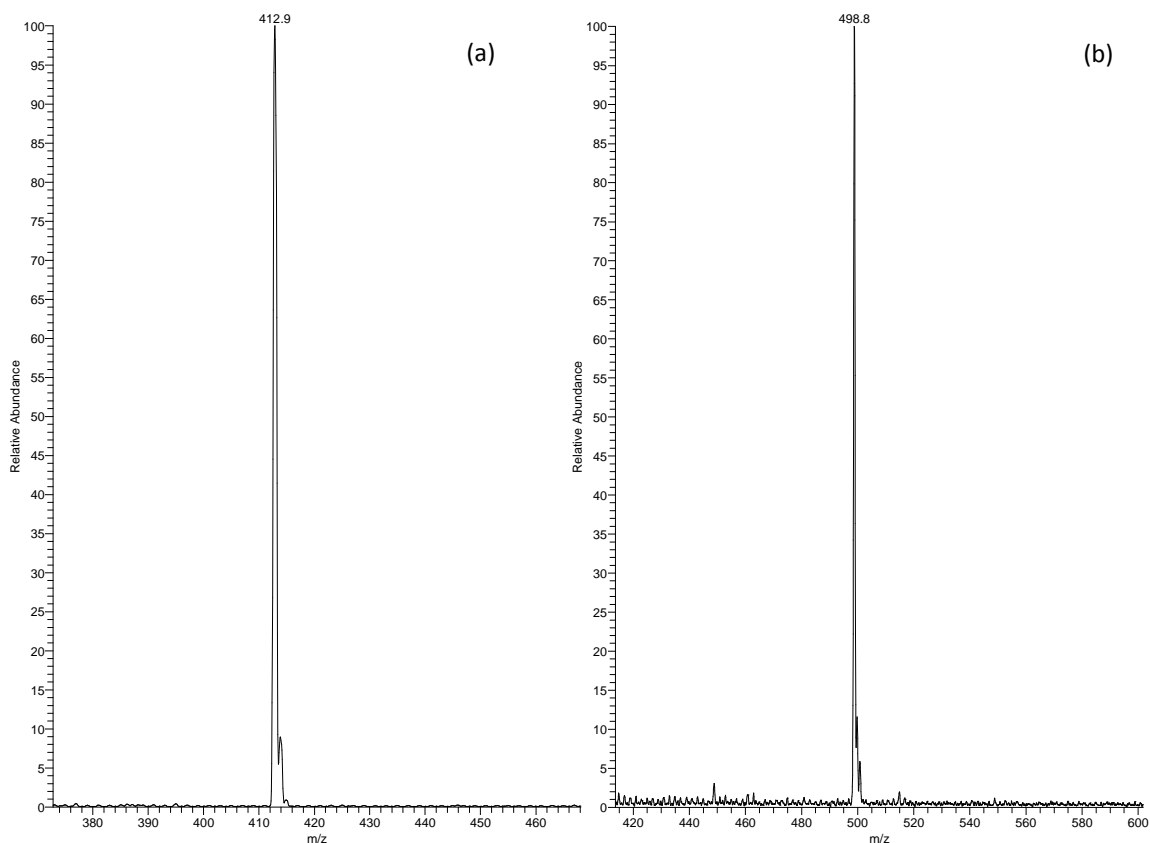
Introducción de la muestra	Infusión
Ionización	ESI negativo
Resolución	Unitaria, $\Delta m$ : 0,7
Barrido	$m/z$ 100-600 velocidad de barrido 1,2 barridos/sec
Modo de adquisición	Profile/Continuo
Voltaje de la sonda ESI	3,5 kV
Temperatura del capilar	350 °C
Presión del gas de nebulización	30 psi
Presión del gas de barrido de iones	5 u.a.
Presión del gas auxiliar	0
	Tabla de calibración según $m/z$ del calibrante (politirosina)
Voltaje de la lente de tubo	-113 V ( $m/z$ 180,1)
	-138 V ( $m/z$ 506,2)
	-226 V ( $m/z$ 995,4)
Voltaje del <i>skimmer</i>	-10 V

**Tabla 2.6.** Condiciones de trabajo para el análisis de MCs por espectrometría de masas en modo de ionización ESI positivo y negativo en los dos instrumentos (QqQ y Orbitrap).

Introducción de la muestra	Infusión
Ionización	ESI positivo y negativo
Resolución	Unitaria, $\Delta m$ : 0,7 (QqQ) 50000 ( $m/z$ 200; 2 Hz) (Orbitrap)
Barrido	$m/z$ 400-1200 velocidad de barrido 1,2 barridos/sec
Modo de adquisición	Profile/Continuo
Voltaje de la sonda ESI	4,25 y - 2,75 kV
Temperatura del capilar	250 °C
Temperatura de la sonda H-ESI calentada	30 °C (Orbitrap)
Presión del gas de nebulización	42 psi
Presión del gas de barrido de iones	10 u.a.
Presión del gas auxiliar	0
Voltaje del capilar	35 y -35 V
Voltaje de la lente de tubo	186 y -186
Voltaje del <i>skimmer</i>	35 y -18 V

### Espectros MS PFAAs

Los PFAAs en estudio tienen un grupo ácido (-COOH en los PFCAs y -SO<sub>3</sub>H en los PFSAs) claramente ionizable en modo negativo. Estos compuestos tienen tendencia a desprotonarse y en los pHs típicos en el medio ambiente aparecen como especies iónicas. Como ya se ha explicado anteriormente, los espectros de masas en ESI-MS negativo, proporcionan como señal mayoritaria el ion mono-cargado desprotonado, [M-H]<sup>-</sup>. En la *Figura 2.6* se muestra el espectro de masas de dos de los compuestos más representativos de esta familia, el PFOA y el PFOS.

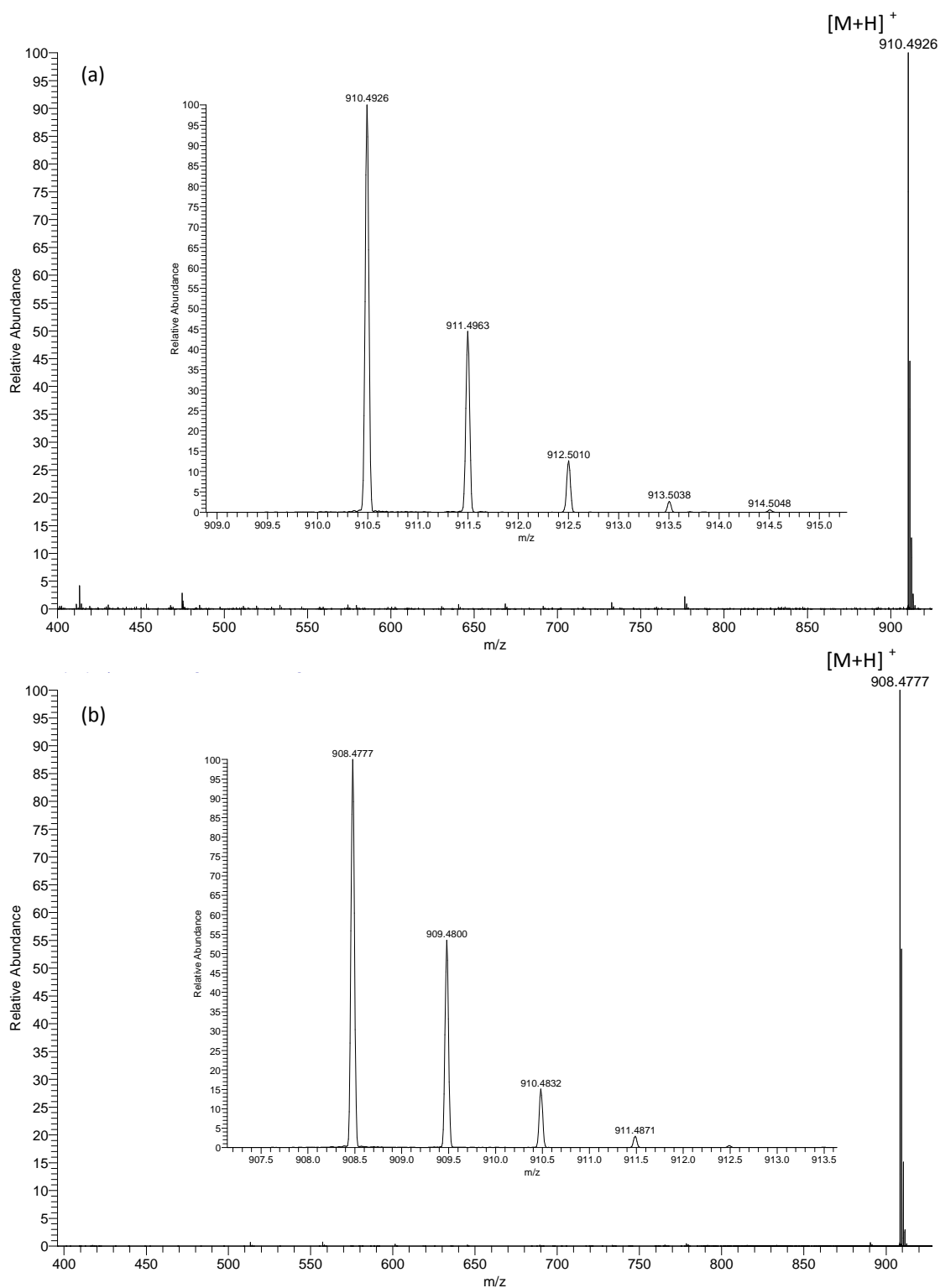


**Figura 2.6.** Espectros de masas en modo de ionización ESI negativo ([M-H]<sup>-</sup>) de 1 ng inyectado de un patrón individual de:(a) PFOA,  $m/z$  412,9; y (b) PFOS,  $m/z$  498,8, registrado en las condiciones óptimas mediante LC-ESI-MS.

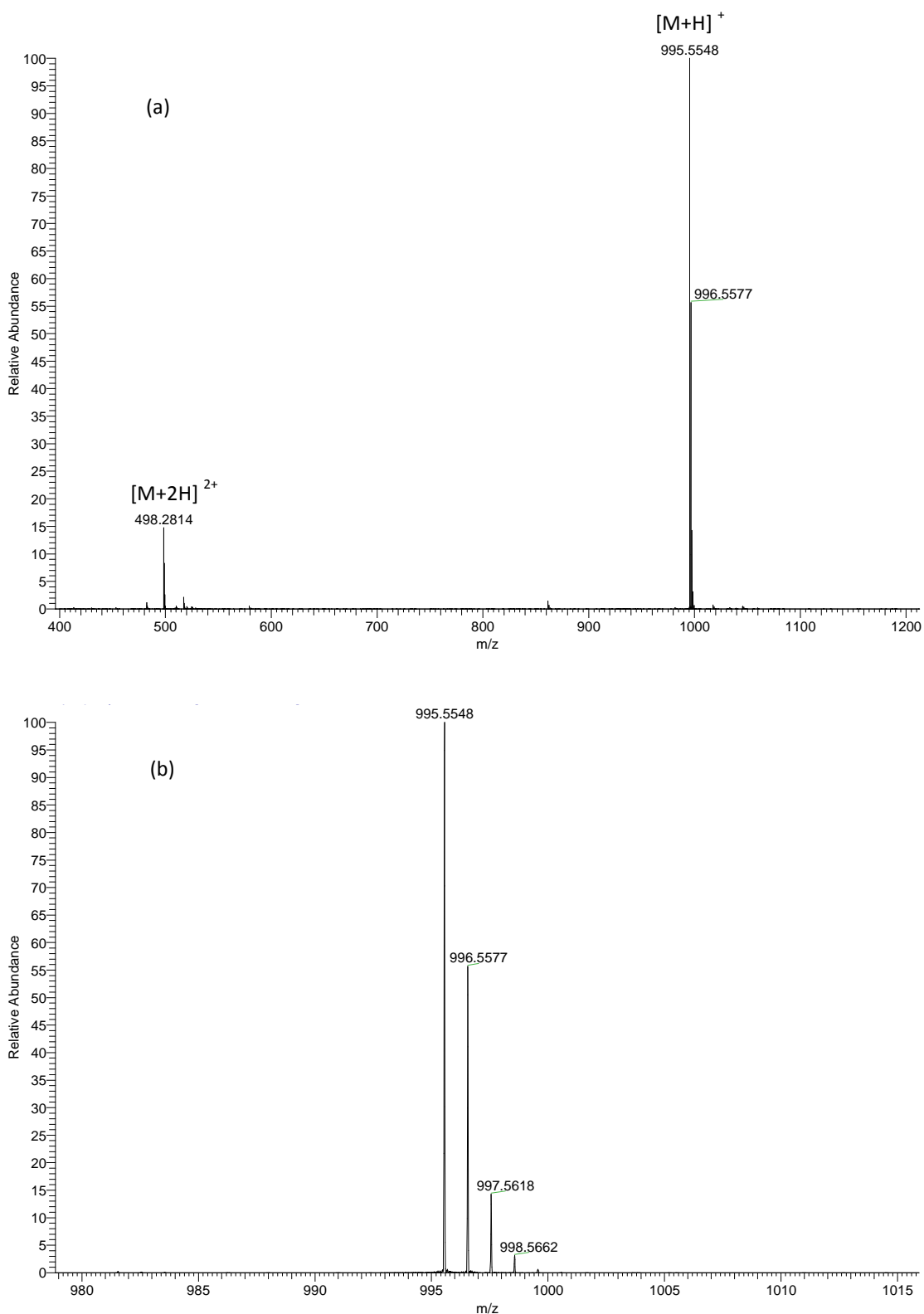
### ***Espectros MS MCs***

En el caso de las MCs, el modo de ionización positivo ha sido el más comúnmente utilizado. Adicionalmente, el modo ESI negativo ha sido recientemente aplicado al análisis de estos péptidos (Dörr y col., 2011; Gambaro y col., 2012; Rodrigues y col., 2013). La presencia de diferentes aminoácidos en la estructura cíclica de las MCs ofrece múltiples posibilidades para la localización de la carga, pudiéndose protonar (y formar aductos con cationes) o desprotonar fácilmente. Las MCs tienen en las posiciones 3 y 6 de su estructura dos grupos (Glu y MeAsp/Asp) con el ácido carboxílico libre fácilmente ionizables en modo negativo. De acuerdo con ello, se han implementado las condiciones para las fuentes ESI y MALDI con el objetivo de comparar, combinar y utilizar la información acumulada proporcionada para la identificación inequívoca y la confirmación de la detección de cianotoxinas. Los espectros de masas en ESI y MALDI-MS en modo de ionización positivo y negativo muestran el ion mono-cargado protonado o desprotonado,  $[M+H]^+$  y  $[M-H]^-$  (ver *Figura 2.7*), respectivamente, excepto para las MCs que contienen dos aminoácidos Arg en su estructura (MC-dmRR and MC-RR) que se detectan como especies doblemente cargadas,  $[M+2H]^{2+}$ , en ESI positivo (Yuan y col., 1999a y b). Como se muestra en la *Figura 2.8* para la MC-LR, las MC con un único residuo Arg en su estructura (MC-dmLR, -LR, -WR and -YR) presentan mediante ESI, ambas señales,  $[M+H]^+$  y  $[M+2H]^{2+}$ , y el ion mono-cargado es normalmente la especie más intensa. La capacidad de generar iones doblemente cargados del ESI es una clara ventaja respecto a otras técnicas de desorción como el MALDI o el FAB. De hecho, el ion característico doblemente cargado (*Figura 2.9*) lo utilizamos para diferenciar las MCs de otras familias de péptidos y ha sido adoptado como un ion diagnóstico de la detección de MC con Arg en su estructura. Las condiciones ácidas utilizadas para el análisis de MCs (0,1% de ácido trifluoroacético o 0,08% de ácido fórmico mediante las técnicas MALDI y ESI, respectivamente) han sido capaces de minimizar la presencia de iones aducto como  $[M+Na]^+$  y/o  $[M+K]^+$ , favoreciendo y aumentando la señal  $[M+H]^+$  y mejorando la sensibilidad del análisis. Yuan y col. (1999b) describen que algunas MCs, especialmente las que no tienen Arg en su estructura como la MC-LA, pueden mostrar estos iones aducto derivados de sales de metal alcalino traza presentes en muestras ambientales y cepas cultivadas o en el vidrio de los recipientes utilizados para la toma, transporte y manipulación de la muestra.

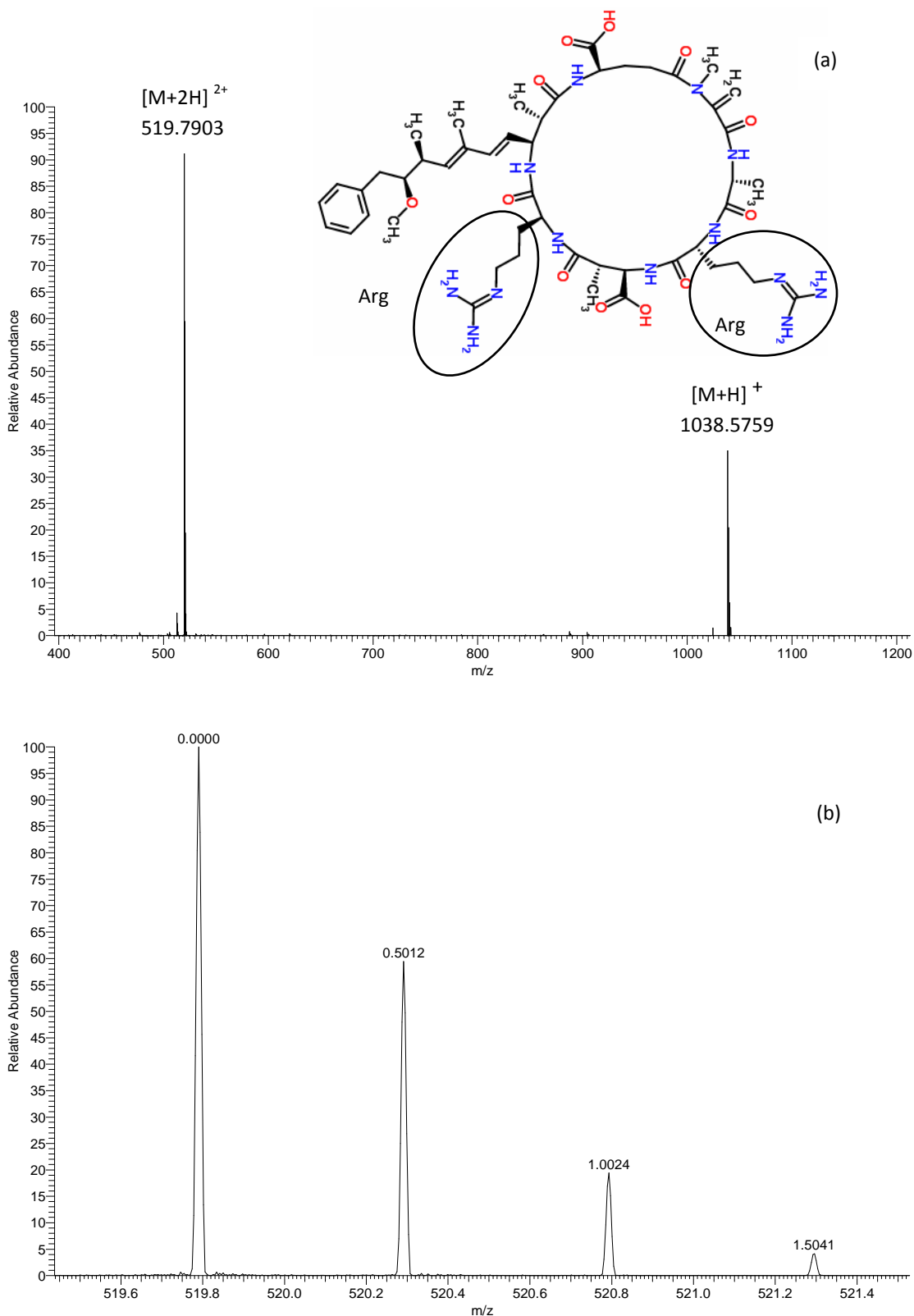




**Figura 2.7.** Espectros de masas de la MC-LA en ESI: (a) positivo (resolución: 27300; error AMM: 0,6 ppm); y, (b) negativo (resolución: 27300; error AMM: 0,2 ppm), registrados en el sistema LC-ESI-HRMS.



**Figura 2.8.** (a) Espectro ESI(+)-HRMS de la MC-LR; (b) perfil isotópico característico de la señal  $[MC-LR+H]^+$  (zoom  $m/z$  979,9-1020,0; resolución: 26800; error AMM: 1,2 ppm).



**Figura 2.9.** (a) Espectro ESI(+)-MS de la MC-RR de una muestra real (*bloom* del embalse de Alcántara); (b) perfil isotópico característico de la señal  $[MC-RR+2H]^{2+}$  (zoom  $m/z$  519,6-521,4; resolución: 35700; error AMM: 0,2 ppm).

Por MALDI-TOF se ha realizado el análisis cualitativo rápido y directo de la fracción sestónica, sin ninguna extracción ni separación cromatográfica. Como no existe separación cromatográfica, todas las MCs se ionizan simultáneamente. De esta forma de una manera rápida, directa y sencilla, se obtiene el perfil de las variantes de MC observadas en cada muestra (ver *Figura 2.10*). Esta aproximación permite la determinación rápida de MCs y también se consigue la captura rápida de la presencia y perfiles de la biosíntesis de otros péptidos como las anabaenopeptinas, microgininas, aeruginosinas y cianopeptolinas. Esta técnica proporciona información sustancial de la diversidad genotípica de las especies presentes en el medio ambiente (Welker y col., 2002). Analizando el peptidoma, ha sido posible asignar los perfiles particulares de la producción de péptidos como los quemotipos en colonias de *Microcystis*.

En la *Tabla 2.7* se muestran las condiciones de trabajo óptimas en las que se han obtenido los espectros de masas de las MCs en modo de ionización MALDI positivo y negativo.

**Tabla 2.7.** Condiciones de trabajo para el análisis de MCs por MALDI-TOF.

Ionización	MALDI +/-
Modo de operación	Reflectrón
Modo de extracción	Retardado
Tiempo de retraso	400 ns
Resolución	20000
Barrido	<i>m/z</i> 400-2000 a 100 pulsos por espectro
Voltaje de aceleración	20000 V
Modo de adquisición	Profile/Continuo

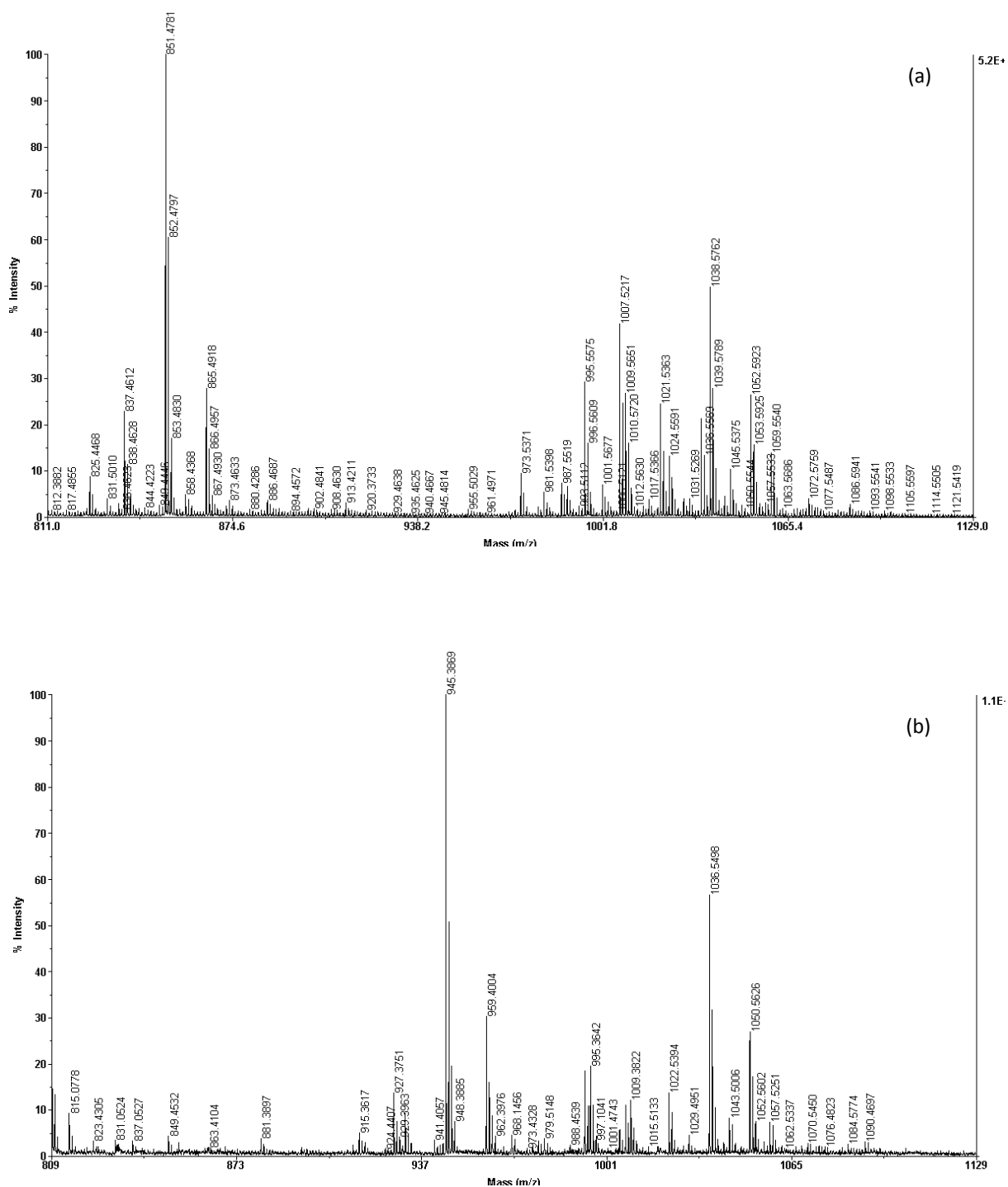


Figura 2.10. Espectro de masas MALDI-TOF-MS (resolución: 18000) de una muestra real de una floración aparecida en el embalse de Alcántara el año 2009 en modo de ionización: (a) positivo; y, (b) negativo.

### 2.4.2. Estudios de fragmentación

El espectro de masas de fragmentación de los analitos se ha registrado para el análisis cualitativo detallado. Cada compuesto tiene un espectro de fragmentación característico. Este perfil de fragmentación se utiliza para la identificación estructural de los analitos y compuestos relacionados, especialmente cuando no se dispone de patrones comerciales para todos los análogos como es el caso de las MCs. Los diferentes iones fragmentos proporcionan información relevante sobre la estructura de los compuestos en estudio. Combinar la elucidación estructural en modo de ionización positivo y negativo aporta información complementaria para las asignaciones estructurales.

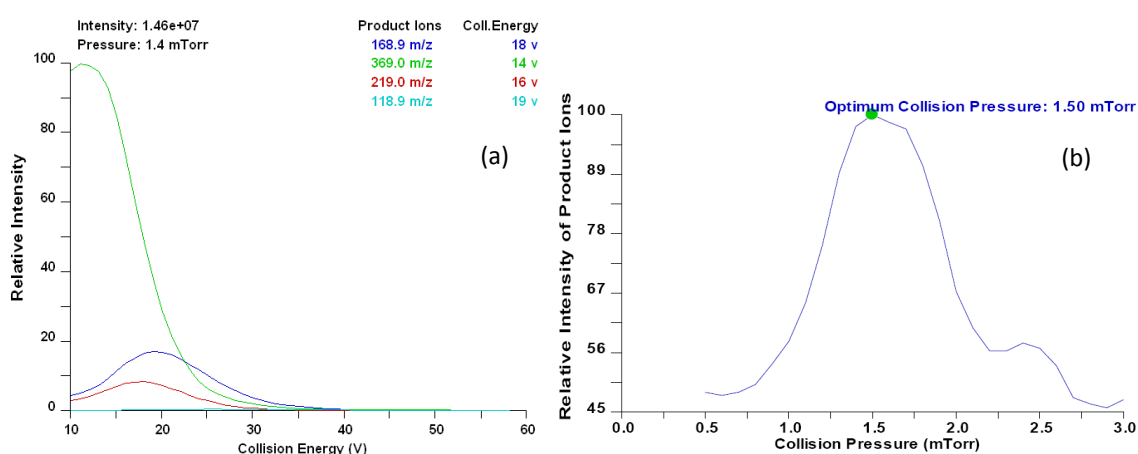
El método de fragmentación por excelencia en MS es la disociación inducida por colisión (CID), en el que se producen fragmentos de las moléculas a analizar mediante colisión con átomos o moléculas de gases nobles como el argón o xenón (QqQ) o helio (trampa de iones). En el presente trabajo, se ha aplicado la técnica de fragmentación por CID en tres variantes diferentes: en un QqQ con el segundo cuadrupolo actuando como celda de colisión; de alta energía en un TOF/TOF; y la disociación por colisión de alta energía (HCD) en la celda de colisión HCD de un Orbitrap-Exactive. La fragmentación HCD tiene lugar en una celda especial de colisión similar a la utilizada en los QqQ y los espectros MS/MS son análogos a los registrados con el QqQ. En la fragmentación es importante tener en cuenta el gas de colisión utilizado, su presión y la energía de colisión (CE). El gas de colisión aplicado en cada caso ha sido argón, aire y nitrógeno, respectivamente. Es importante mencionar que la utilización de diferentes gases de colisión implica CE óptimas diferentes, como se muestra en la *Tabla 2.8*, a modo de ejemplo para el análisis de las MCs más frecuentes en las muestras y la nodularina. Se trabajó en la determinación de esta familia de toxinas mediante MS/MS con tres espectrómetros de masas de tipo QqQ diferentes (Equipo 1, 2 y 3), utilizando nitrógeno, argón y kriptón como gases de colisión. Se puso de manifiesto como al utilizar un gas de colisión con un tamaño y peso molecular (MW) mayor ( $N_2 < Ar < Kr$ ), la CE necesaria para fragmentar la misma molécula disminuye (ver *Tabla 2.8*)

Las condiciones a optimizar en la fragmentación son la presión y la energía aplicadas a este gas de colisión. En la *Figura 2.11* se muestran, a modo de ejemplo, las curvas de optimización de estos dos parámetros para el PFOA en el QqQ. La energía de fragmentación aplicada para los PFAAs ha sido de entre 10 y 21 eV para los PFCAs que se fragmentan más fácilmente, el grupo -COOH es más lábil, y de entre 30 y 55 eV para los PFSAs. Para las MCs la energía de fragmentación aplicada ha sido típicamente de 1 keV en el análisis mediante TOF/TOF y de 30-70 eV en los experimentos CID y HCD con los analizadores QqQ y Orbitrap, respectivamente, dependiendo de si la señal del

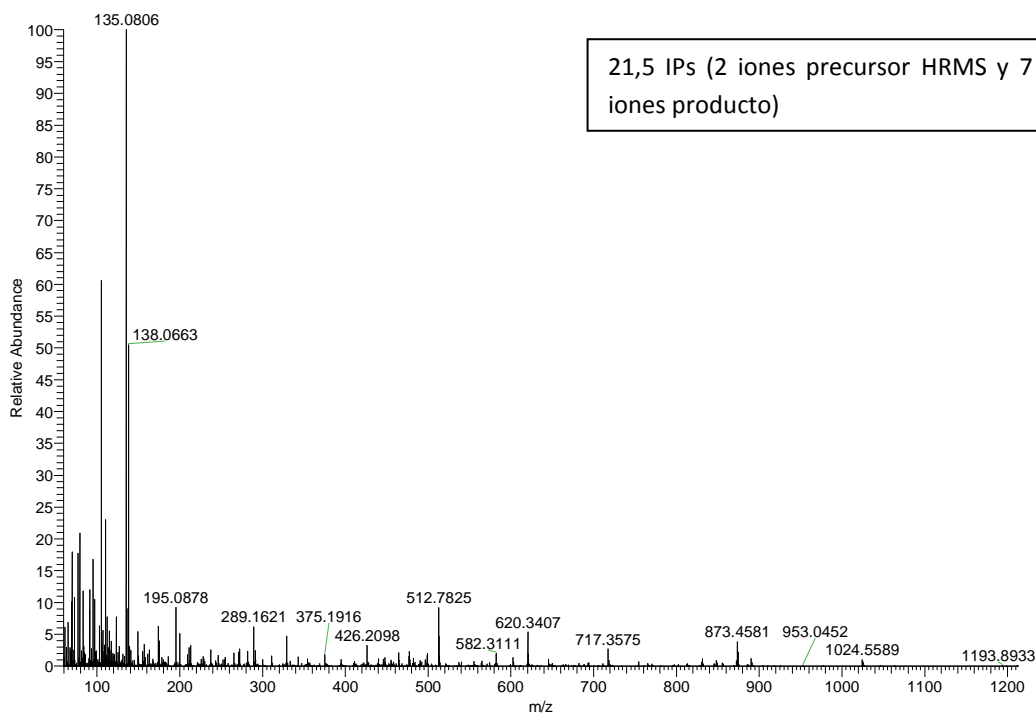
precursor ha sido doble o mono-cargada. Normalmente, se necesita menos energía para la fragmentación de señales  $[MC+2H]^{2+}$  (Dongré y col., 1996). La energía necesaria para la óptima fragmentación de las MC con señal doblemente cargada (MC-dmRR and MC-RR) ha sido de 30 eV y para las otras variantes que presentan como ion mayoritario la especie mono-cargada típicamente se han necesitado energías de fragmentación de 50-70 eV. A modo de ejemplo, la *Figura 2.12* muestra el espectro ESI-HRMS AIF de la  $[MC-dmRR+2H]^{2+}$  obtenido con el instrumento Orbitrap-Exactive HCD. Este espectrómetro de masas tiene un solo analizador y una celda de colisión HCD y no es un equipo híbrido con dos analizadores, por lo que es capaz de fragmentar todo sin una selección previa de un único precursor, de forma similar a la fragmentación en la fuente (Makarov y Scigelova, 2010). Con el Orbitrap los fragmentos son analizados y registrados en HR.

**Tabla 2.8.** Energías de colisión óptimas para la fragmentación de algunas MCs (-RR, YR y LR) y para la nodularina en tres equipos QqQ con la introducción de diferentes gases de colisión en la celda para la fragmentación.

Instrumento Compuesto	Equipo 1	Equipo 2	Equipo 3
<b>CE (eV)</b>			
MC-RR	43,0	27,0	13,5
MC-YR	81,0	62,0	36,5
MC-LR	105,0	76,0	40,5
Nodularina	97,0	53,0	37,5
<b>Gas de Colisión (MW)</b>	<b>N<sub>2</sub> (28)</b>	<b>Ar (40)</b>	<b>Kr (84)</b>
Precursor ion	[M+H] <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>



**Figura 2.11.** Curvas de optimización de los parámetros de la celda de colisión en el QqQ para el PFOA: (a) energía de colisión (CE); y (b) presión del gas de colisión.



**Figura 2.12.** Espectro de fragmentación HCD de la  $[MC-dmRR+2H]^{2+}$  ( $m/z$  512,7824) de una muestra real, floración del embalse de Vilasouto, obtenido mediante ESI(+)-Orbitrap.

La presión del gas de colisión óptima en el QqQ ha sido de 1,5 mTorr para todos lo analitos (PFAAs y MCs). Las condiciones de MS/MS óptimas para cada analito se muestran en las *Tablas 2.9* y *2.10*. Cada transición tiene su CE óptima. Se ha trabajado en modo SRM. El análisis en modo de adquisición SRM introduce una alta especificidad debido a que se basa en la detección de ambos iones, precursores y productos, simultáneamente. De acuerdo con la Decisión 2002/657/CE, se monitorizan dos transiciones (precursor > producto) para cada compuesto, una para la cuantificación y una segunda para la confirmación. Se calcula una relación entre estas dos transiciones que ha de cumplir una cierta tolerancia respecto a la relación teórica calculada en la recta de calibración. Para los patrones internos solo se ha monitorizado una transición.



**Tabla 2.9.** Condiciones MS/MS para los PFAAs en estudio en el espectrómetro de masas QqQ (tiempo de barrido de cada transición: 40 mseg).

Analito	Ion Precursor $m_1/z$	Lente de Tubo (V)	Ion Producto $m_2/z$	CE (eV)
PFPrA	163,0	-35	119,0	12
PFBA	213,0	-39	169,0	11
PFPA	263,0	-45	219,0	10
PFBS	298,9	-50	80,0	42
			99,0	30
PFHxA	313,0	-52	119,0	21
			269,0	11
PFHpA	363,0	-55	169,0	19
			319,0	12
PFHxS	398,9	-59	80,0	42
			99,0	36
PFOA	413,0	-72	169,0	18
			369,0	14
PFNA	463,0	-90	219,0	16
			419,0	13
PFOS	499,0	-110	80,0	55
			98,9	54
PFDA	513,0	-120	269,0	18
			469,0	13
<sup>13</sup> C <sub>4</sub> -PFBA	217,1	-40	172,0	11
<sup>18</sup> O <sub>2</sub> -PFHxS	402,9	-60	84,2	41
<sup>13</sup> C <sub>4</sub> -PFOA	416,9	-75	372,0	14
<sup>13</sup> C <sub>4</sub> -PFOS	502,9	-115	99,0	40
<sup>13</sup> C <sub>2</sub> -PFDA	515,0	-125	470,0	13
LOD (pg inyectados)				
	PFOA		8	
	PFOS		10	

**Tabla 2.10.** Condiciones MS/MS de las MCs en estudio en el espectrómetro de masas QqQ (tiempo de barrido de cada transición: 100 mseg).

Analito	Ion Precursor ( $m/z_1$ )	Señal	Lente de Tubo (V)	Ion Producto $m_2/z$	CE (eV)	
dmRR	512,8	[M+2H] <sup>2+</sup>	135	102,8	51	
				135,1	26	
RR	519,8		137	127,0	41	
				135,0	28	
LA	910,5		208	135,1	40	
				375,2	31	
dmLR	981,5		215	135,1	58	
				213,1	53	
LF	986,5		217	135,1	37	
				248,9	26	
LR	995,6	224	135,1	55		
			213,1	45		
LY	1002,5	[M+H] <sup>+</sup>	227	135,1	45	
				265,1	31	
LW	1025,5		230	135,1	51	
				213,1	29	
YR	1045,5		236	135,1	57	
				213,1	40	
WR	1068,6		245	135,1	63	
				213,1	53	
Nodularina	825,5			202	135,1	50

### Fragmentación PFAAs

Como se muestra en la *Figura 2.13*, para el PFOA y el patrón interno <sup>13</sup>C<sub>2</sub>-PFDA, las fragmentaciones típicas de los PFCAs son la pérdida del grupo ácido (-CO<sub>2</sub>, -44 Da) característica de compuestos ácidos y las pérdidas consecutivas de grupos CF<sub>2</sub> (-50 Da) o (CF<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (100 Da), representativas de compuestos perfluorados. Estas fragmentaciones también se observan en los espectros MS/MS de los PFSAs (ver *Figura 2.14* para el PFOS). Pero a diferencia de la pérdida del grupo CO<sub>2</sub>, los PFSAs tienen como fragmentos propios y más intensos, los iones SO<sub>3</sub><sup>-</sup> y FSO<sub>3</sub><sup>-</sup> de  $m/z$  80,0 y 99,0 respectivamente. El patrón interno pierde uno de sus <sup>13</sup>C en la primera fragmentación y la segunda y última marca al producir el siguiente ion fragmento. La pérdida del grupo ácido para los PFCAs y la transición al ion fragmento SO<sub>3</sub><sup>-</sup> son las fragmentaciones más intensas y escogidas como transiciones de cuantificación (ver *Tabla 2.9*). El segundo fragmento más intenso típico en compuestos perfluorados para los PFCAs y el ión fragmento FSO<sub>3</sub><sup>-</sup> se utilizan como transición de confirmación.



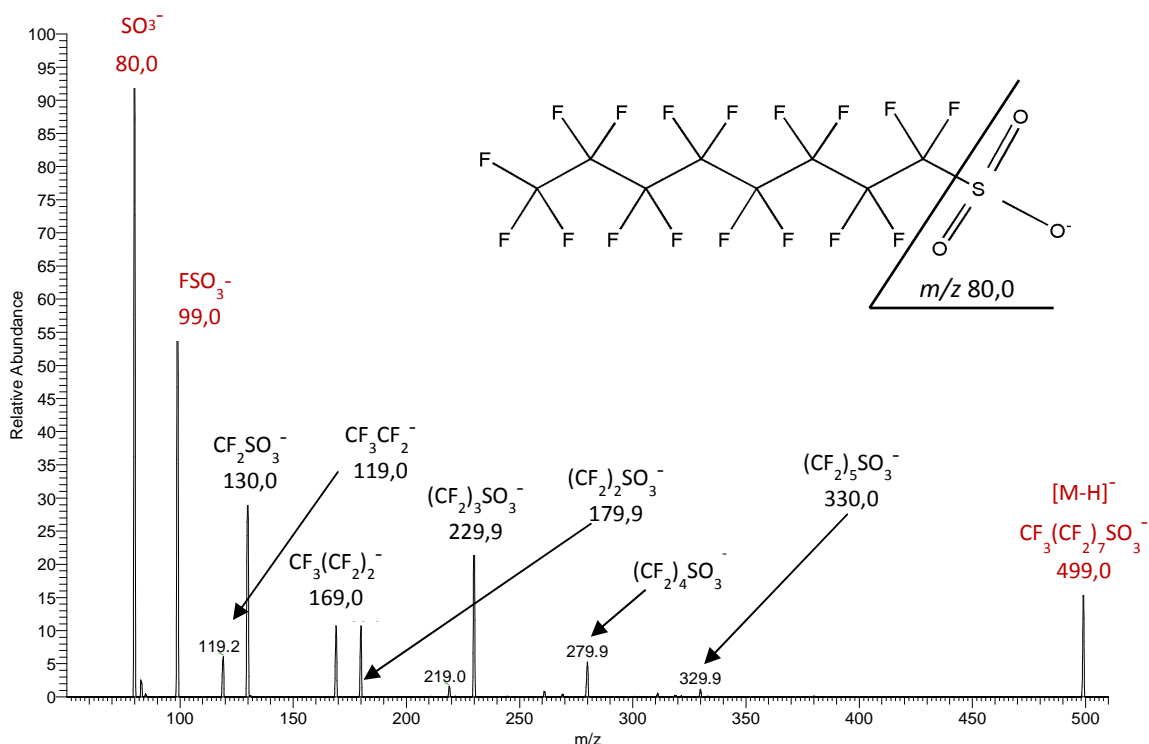


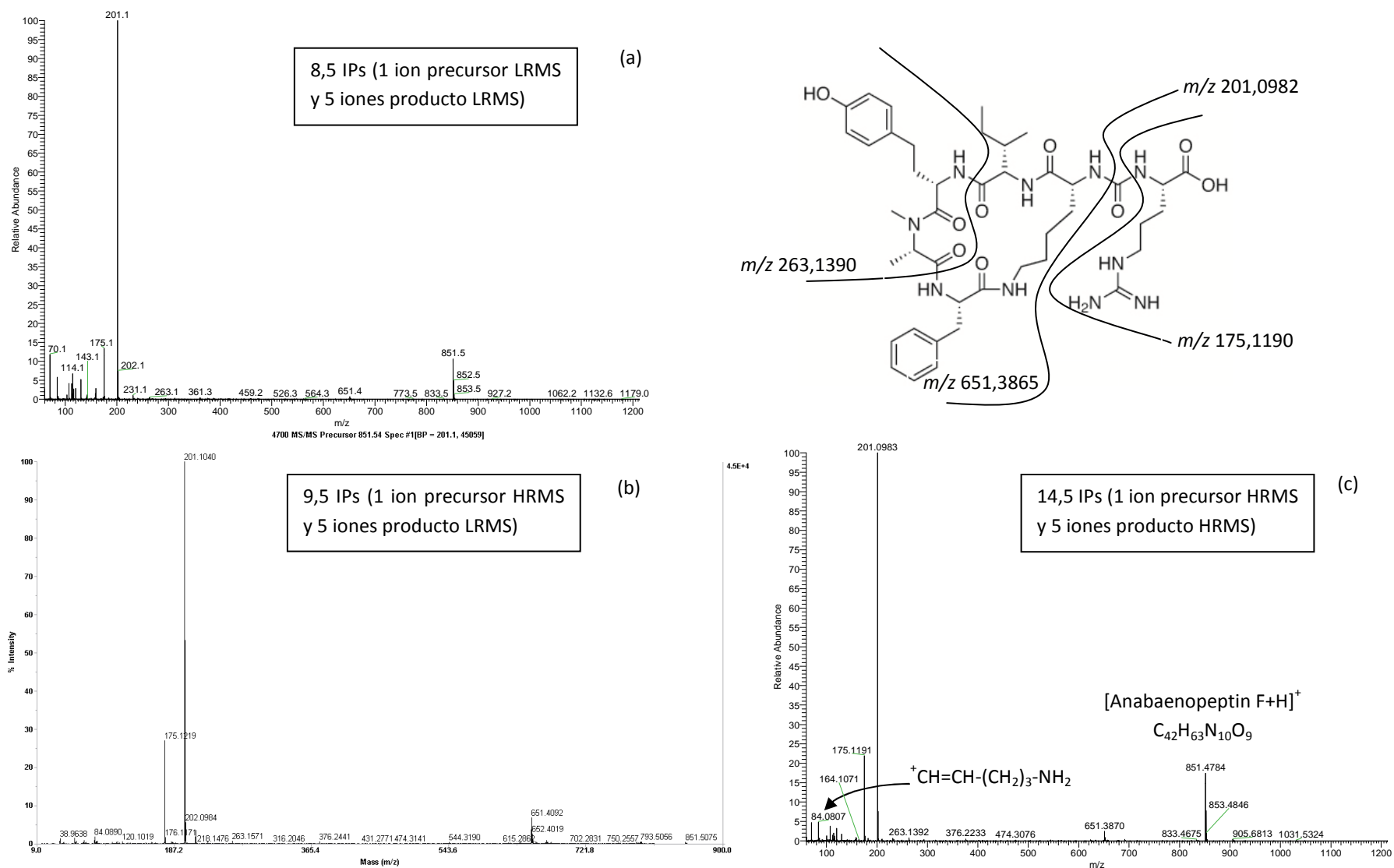
Figura 2.14. Espectro de fragmentación del PFOS mediante LC-ESI-MS/MS (QqQ).

### Fragmentación MCs

El análisis de MCs y su fragmentación, además de por ESI-MS/MS, también se estudió mediante MALDI-TOF/TOF y ESI-HRMS (Orbitrap-Exactive HCD). Como se muestra en la Figura 2.11 para el espectro de fragmentación de la anabaenopeptina F, péptido cíclico detectado frecuentemente en las algas verde-azules *Microcystis aeruginosa* y *Planktothrix rubescens* (Barco y col., 2004; Erhard y col., 1997 y 1999), obtenido con los diferentes espectrómetros de masas (QqQ, TOF/TOF y HCD Orbitrap), la fragmentación con las tres aproximaciones ha sido equivalente para todos los analitos en estudio. Las principales señales de su espectro de fragmentación son las cadenas laterales ( $\text{CO}+\text{Arg}$ ,  $m/z$  201,0982) y del aminoácido Arg ( $\text{Arg}+2\text{H}$ ,  $m/z$  175,1190). También se detectan iones fragmento de  $m/z$  84,0808; 263,1390 y 651,3865. El ion de  $m/z$  84,0808 que proviene de la escisión de la lisina es característico de todas las anabaenopeptinas (ion Lys-imonio), mientras que la señal de  $m/z$  651,3865 corresponde al anillo completo ( $\text{Lys}+\text{Phe}+\text{Mala}+\text{Htyr}+\text{Ile}+2\text{H}$ ) y el ion fragmento de  $m/z$  263,1390 fue identificado como  $[\text{Mala}+\text{HTyr}+\text{H}]^+$  en un estudio anterior (Erhard y col., 1999).

Los espectros MS/MS de las MCs mediante MALDI-TOF/TOF se obtuvieron aplicando una alta energía de CID con aire (1keV) y se adquirieron también en ambos modos de ionización, positivo y negativo, en el intervalo de masas  $m/z$  9-1200.

Con el espectrómetro de masas Orbitrap la fragmentación también se realizó en ambos modos de ionización por AIF en la celda HCD mediante colisión con  $\text{N}_2$  y aplicando las CE ya detalladas anteriormente. El espectro de fragmentación se adquirió en el intervalo de  $m/z$  60-1200.



**Figura 2.15.** Espectro de fragmentación de la señal [Anabaenopeptina F + H]<sup>+</sup> (masa exacta m/z 851,4774) de una muestra real registrado con los siguientes equipos: (a) ESI-QqQ adquirido a una energía CID (Ar) de 30 eV; (b) MALDI-TOF/TOF adquirido a 1 keV; y (c) ESI-Orbitrap adquirido a una energía HCD (N<sub>2</sub>) de 50 eV.

A modo de ejemplo, la *Figura 2.16* muestra el espectro de fragmentación de la MC-LR detectada en una muestra real, la floración del embalse de Alcántara, mediante ESI-Orbitrap en los modos de ionización positivo y negativo. Los iones fragmento mayoritarios se han incluido en la *Tabla 2.12*. Los diferentes iones fragmento observados han sido evaluados con fines confirmatorios. Todas las MCs tienen en sus espectros de fragmentación señales comunes (Dörr y col., 2011; Rodrigues y col., 2013; Yuan y col., 1999a). Como se muestra en la *Figura 2.16* y en la *Tabla 2.11*, son importantes iones fragmento genéricos característicos de las MCs en modo de ionización positivo (Bortoli y Volmer, 2014): el ion fragmento de  $m/z$  135,0804, característico de esta familia de compuestos que se forma al romperse el enlace del grupo metoxi en posición  $\alpha$  del aminoácido Adda ( $\text{PhCH}_2\text{CH}(\text{OMe})$ ) (Botes y col., 1985); la señal de  $m/z$  213,0870, que corresponde a un ion producto de Glu+Mdha; el pico a  $m/z$  375,1915 de Adda+Glu+Mdha; y, los iones imonio ( $\text{H}_2\text{N}^+=\text{CH-R}$ ) de los aminoácidos constituyentes. Además, la *Figura 2.16* presenta un producto típico de disociación de  $m/z$  70,0651 representativo de las MCs que contienen Arg (MC-LR en este espectro). En modo de ionización positivo, otros iones productos comunes a algunas MCs son los de  $m/z$  599,3552 ( $[\text{Arg}+\text{Adda}+\text{Glu}+\text{H}]^+$ );  $m/z$  163,1117 y 446,2286 (iones que contienen la unidad  $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}$  como el de  $m/z$  375,1914,  $[\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}+\text{H}]^+$  y  $[\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}+\text{Glu}+\text{Mdha}+\text{Ala}+\text{H}]^+$ , respectivamente); y  $m/z$  155,0815 ( $[\text{Mdha}+\text{Ala}+\text{H}]^+$ ) (Lawton y col., 1995; Welker y col., 2002). Productos de disociación a  $m/z$  199,0713 y 361,1758 en lugar de a  $m/z$  213,0870 y 375,1914 indican la desmetilación del grupo Mdha, indicando la presencia de Dha en la posición 7, como observaron Welker y col. mediante experimentos de *post-source decay* (PSD) (Welker y col., 2002). En el espectro CID también se detectan iones producto característicos del isoglutamato metilado  $[\text{Glu}(\text{OCH}_3)]$  a  $m/z$  227,1026 y 389,2071 (Lawton y col., 1995). Variaciones en el inusual aminoácido Adda, como la acetilación (ADMAdda), muestran un ion diagnóstico de  $m/z$  341,1991 (Namikoshi y col., 1990; Sivonen y col., 1992b). Por último para la leucina y la homo-tirosina se observan iones imonio de  $m/z$  86,0964 y 150,0913 respectivamente.

Yuan y col. (1999a) compararon el patrón de fragmentación de diferentes MCs mediante LC-ESI(+)-MS. Los espectros de masas de los iones precursores  $[\text{M}+\text{H}]^+$  de las MCs pusieron de manifiesto dos tipos de patrón de fragmentación diferentes, con diferencias entre las moléculas que contienen Arg (MC-LR, -RR, -WR, -YR) en su estructura y otras MCs como las MC-LF y -LW que no incluyen el residuo Arg. Las diferencias son atribuibles a los diferentes sitios de protonación en los iones  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Mientras la posición de protonación para las MCs que contienen Arg es este mismo residuo, en las MC-LF y -LW es el grupo metoxi del residuo Adda el que se protona. En el espectro de masas de la MC-YR, además de la detección de los iones fragmento típicos de las MCs, otros iones fragmento como los de  $m/z$  141,0658; 271,1162; 602,2813; y 952,5013, les son característicos (*Tabla 2.11*). De igual forma, los fragmentos de  $m/z$  470,2721 y 953,5455 son característicos de la MC-dmLR y los iones de  $m/z$  426,2095 y 553,3053 de las MC-dmRR y -LR, respectivamente. Por su parte, los iones fragmento de  $m/z$  163,1117 y 446,2286 (iones que contienen la unidad  $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}$ ) son comunes a diversas MCs, pero no se detectan en los espectros de fragmentación de las MC-dmRR, -YR y -WR. La MC-WR presenta además las señales de  $m/z$  176,1196 y

599, 3552, esta última observada también en las MC-LR y -dmLR. Por último las MCs con dos residuos Arg en su estructura, MC-dmRR y -RR, muestran la especie doblemente cargada,  $[M+2H]^{2+}$ , de  $m/z$  512,7894 y 519,7902, respectivamente.

Mediante el modo de ionización negativo se obtiene un ion producto no específico resultante de la pérdida de agua y un fragmento común a todas las MCs de  $m/z$  128,0353 (ver *Figura 2.16*). Dörr y col. 2011 identifican este ion fragmento como el producto de una reacción de transferencia de carga por pérdida de una unidad de ácido de la cadena cíclica, los ácidos glutámico o  $\beta$ -metilaspartico.

Los dos iones fragmentos más intensos y selectivos en cada modo de ionización de  $m/z$  135,0804 ( $C_9H_{11}O$ ) y 128,0353 ( $C_5H_6O_3N$ ) derivados de la cadena lateral del aminoácido Adda característico de esta familia de péptidos y de los ácidos glutámico y  $\beta$ -metilaspartico de la cadena cíclica, en los modos de ionización positivo y negativo, respectivamente, se utilizan como iones diagnóstico en los métodos de análisis de MCs por MALDI-TOF/TOF y ESI-Orbitrap. En ESI positivo con el espectrómetro de masas QqQ, la transición de cuantificación siempre es la del ion fragmento característico del Adda ( $m/z$  135,1) y la transición de confirmación varía dependiendo de la MC (ver *Tabla 2.10*).

Desafortunadamente, algunas variantes de MC, especialmente  $[Asp^3, Dhb^7]$  y  $[Asp^3, Mdha^7]$  no se pueden diferenciar debido a que se forman iones productos isobaricos. Por lo tanto, en estos casos se han de emplear herramientas de identificación adicionales como la RMN o la derivatización con tioles, para asegurar unas asignaciones correctas (Miles y col., 2012). También la reducción de los dobles enlaces C=C del amino ácido en la posición 7 de la estructura de la MC utilizando las propiedades reductivas del compuesto de la matriz (1,5-DAN), ayuda en la discriminación entre los grupos Ala/Ser y Dhb/Dha en esta posición (Deleuze y col., 2010). Existen otras limitaciones en los protocolos de identificación mediante MS/MS para la determinación de la posición exacta de los amino ácidos en la estructura cíclica. Por ejemplo, las desmetilaciones son difíciles de localizar en la estructura y también requieren métodos de identificación adicionales (Krüger y col., 2009). Además, en los péptidos cíclicos con estructuras lineales se han aplicado múltiples reacciones de apertura del ciclo para facilitar la elucidación estructural y sistematizar las fragmentaciones (tipo a, b, y).

**Tabla 2.11.** Iones fragmento característicos observados para diferentes MCs ([Asp<sup>3</sup>, Dhb<sup>7</sup>]MC-LR, -LF, -RR, -dmRR, -YR, -LW, -YR y -WR) por ESI-MS/MS en modo de ionización positivo (adaptada de Pérez y Aga, 2005).

	[Asp <sup>3</sup> , Dhb <sup>7</sup> ]MC-LR <sup>a</sup>	MC-LF <sup>b</sup>	MC-RR <sup>d</sup>	MC-dmRR <sup>d</sup>	MC-LW <sup>b</sup>	MC-YR <sup>c</sup>	MC-WR <sup>e</sup>
[M + H] <sup>+</sup>	981,5404	986,5233	1038,5731	1024,5574	1025,5342	1045,5353	1068,5513
[M + H-CO] <sup>+</sup>	953,5455	-	-	-	-	-	-
[M-(Tyr-C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O) + H] <sup>+</sup>	-	-	-	-	-	952,5013	-
[Mdha-Ala-Tyr-MAsp-Arg+H] <sup>+</sup>	-	-	-	-	-	602,2813	-
[H+MeAsp/Glu-Arg-Adda] <sup>+</sup>	599,3552	-	-	-	-	-	599,3552
[M + 2H] <sup>2+</sup>	-	-	519,7902	-	-	-	-
	-	-	-	512,7824	-	-	-
[H+ Ala-Leu-MeAsp-Arg] <sup>+</sup>	470,2721	-	-	-	-	-	-
[C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O-Glu-Mdha/Dhb-Ala + H] <sup>+</sup>	446,2286	446,2286	446,2286	-	446,2286	-	-
[Dhb-Ala-Arg-Asp + H] <sup>+</sup>	-	-	-	426,2095	-	-	-
[C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O-Glu-Mdha/Dhb + H] <sup>+</sup>	375,1914	375,1914	375,1914	375,1914	375,1914	-	375,1914
[Ala-MAsp-(Tyr-C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O) + H] <sup>+</sup>	-	-	-	-	-	271,1162	-
[Glu-Mdha/Dhb + H] <sup>+</sup>	213,0870	213,0870	213,0870	213,0870	213,0870	213,0870	213,0870
[C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> O + H] <sup>+</sup>	-	-	-	-	-	-	176,1196
[C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O + H] <sup>+</sup>	163,1117	163,1117	163,1117	-	163,1117	-	163,1117
[Ala-(Tyr-C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O) + H] <sup>+</sup>	-	-	-	-	-	141,0658	-
PhCH <sub>2</sub> CH(OMe) <sup>+</sup>	135,0804	135,0804	135,0804	135,0804	135,0804	135,0804	135,0804
Cadena lateral Arg ([C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N] <sup>+</sup> )	70,0651	-	70,0651	70,0651	-	70,0651	70,0651

En las estructuras de los iones fragmento, “-” indica enlace químico y “-” denota la pérdida de la subestructura de aminoácido.

<sup>a</sup> Zweigenbaum y col., 2000.

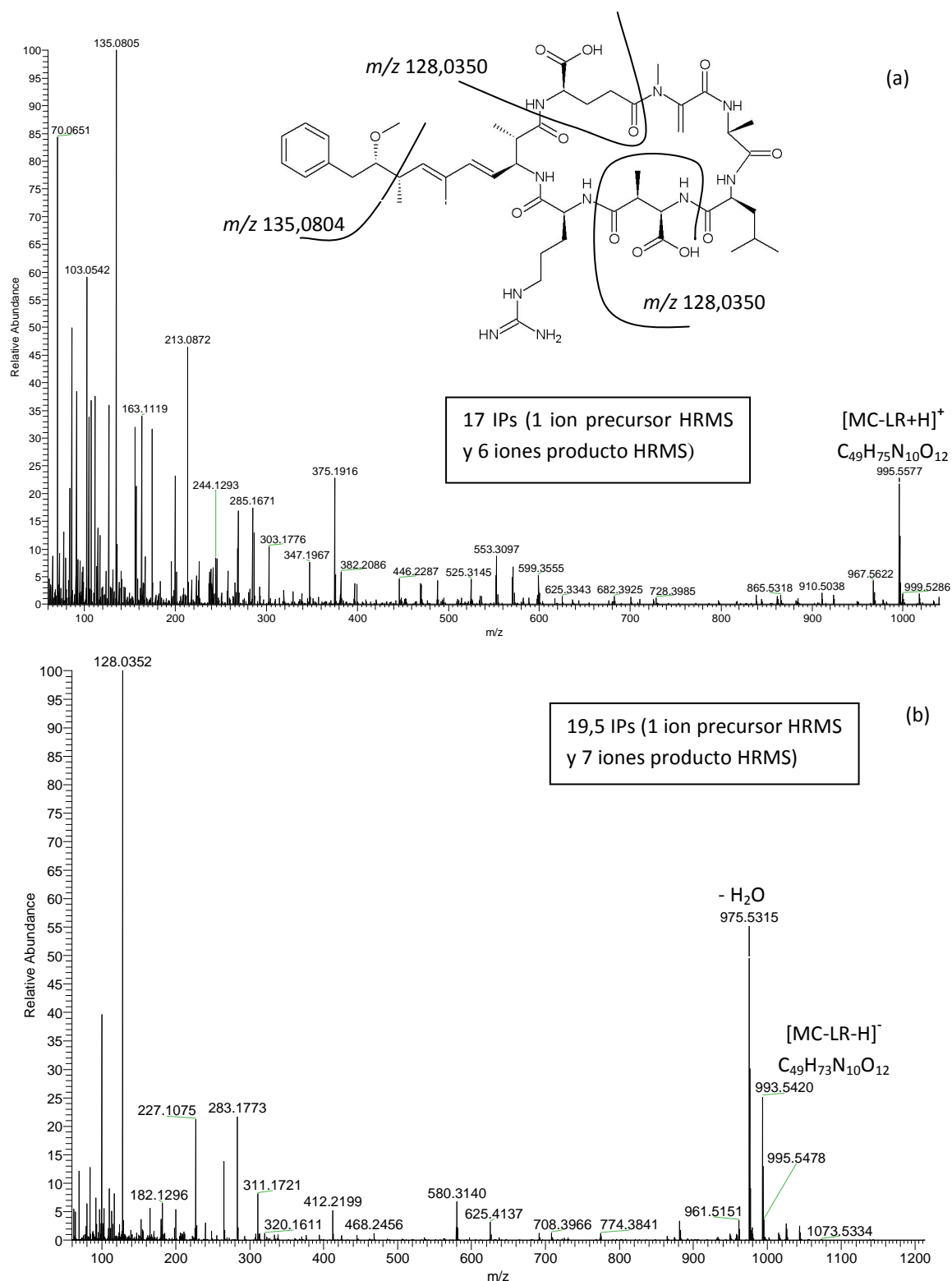
<sup>b</sup> K.P. Bateman, P. Thibault, D.J. Douglas, R.L. White, J. Chromatogr. A 712 (1995) 253.

<sup>c</sup> C. Hummert, M. Reichelt, J. Weiss, H.P. Liebert, B. Luckas, Chemosphere 44 (2001) 1581.

<sup>d</sup> J. Dahlmann, W.R. Budakowski, B. Luckas, J. Chromatogr. A 994 (2003) 45.

<sup>e</sup> Hummert Ch, Dahlmann J, Reinhardt K, Dang HphH, Dang DK, Luckas B. Liquid chromatography-mass spectrometry identification of microcystins in *Microcystis aeruginosa* strain from Lake Thanh Cong, Hanoi, Vietnam. Chromatographia 2001, 54 (9/10), 569-575.





**Figura 2.16.** Espectro de fragmentación de la MC-LR observada en una muestra real, la floración del embalse de Alcántara, mediante ESI-Orbitrap adquirido a una energía HCD de 50 eV: (a)  $[MC-LR+H]^+$  ( $m/z$  995,5577) en modo de ionización positivo; y (b)  $[M-LR-H]^-$  ( $m/z$  993,5415) en modo de ionización negativo.

**Tabla 2.12.** Composición iónica,  $m/z$  teórica exacta y medida y exactitud de masa (error en ppm) de las principales señales obtenidas en el espectro de fragmentación ESI-Orbitrap de la MC-LR mediante los modos de ionización positivo y negativo en la muestra de la floración de Alcántara.

Composición iónica	$m/z$ teórica exacta	$m/z$ medida	Error (ppm)	Composición iónica	$m/z$ teórica exacta	$m/z$ medida	Error (ppm)
[M+H] <sup>+</sup>	995,5560	995,5577	1,7	[M-H] <sup>-</sup>	993,5415	993,5420	0,5
[H+MeAsp-Arg-Adda] <sup>+</sup>	599,3552	599,3555	0,6	[M-H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	975,5309	975,5315	0,6
[H+Mdha-Ala-Arg-MeAsp-Leu] <sup>+</sup>	553,3093	553,3097	0,8	[C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub> -Arg-Adda] <sup>-</sup>	580,3141	580,3140	-0,1
[C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O-Glu-Mdha-Ala + H] <sup>+</sup>	446,2286	446,2287		[C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O-Glu-Mdha-Ala-Leu-NH <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	468,2464	468,2456	-1,7
[C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O-Glu-Mdha+H] <sup>+</sup>	375,1914	375,1916	0,4	[Glu-Mdha-Ala-Leu-NH <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	412,2202	412,2199	-0,6
[H+Glu-Mdha] <sup>+</sup>	213,0870	213,0872	1,0	[CO-Mdha-Ala-Leu-NH <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	311,1725	311,1721	-1,2
[C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O + H] <sup>+</sup>	163,1117	163,1119		[Mdha-Ala-Leu-NH <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	283,1776	283,1773	-0,9
<b>[PhCH<sub>2</sub>CH(OCH<sub>3</sub>)<sup>+</sup></b> <b>([C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>O]<sup>+</sup>)</b>	<b>135,0804</b>	135,0805	0,7	<b>[C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>N]<sup>-</sup></b>	<b>128,0353</b>	128,0352	-0,9
Cadena lateral Arg ([C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N] <sup>+</sup> )	70,0651	70,0651	-0,4				

Los fragmentos utilizados como iones diagnóstico se han marcado en negrita.

## 2.5. Análisis dirigido mediante SPE en línea LC-ESI-MS/MS

Como ya se ha mencionado anteriormente, normalmente, los contaminantes orgánicos están presentes en el agua en un intervalo de concentraciones que oscila entre varios órdenes de magnitud (pg-µg/L en muestras contaminadas). El análisis de bajas concentraciones en muestra acuosa requiere, por lo tanto, una extracción, pre-concentración y *clean-up* de la muestra. Gran variedad de técnicas se han descrito para este fin y de entre ellas, como ya habíamos indicado la SPE es la más comúnmente utilizada (Meriluoto y Codd, 2005). La SPE *off-line* con LC-MS/MS es el método más utilizado para el análisis de PFAAs y de MCs debido a su alta sensibilidad y especificidad y a que proporciona un análisis cuantitativo robusto (Meriluoto y Codd, 2005). De hecho, el método estándar ISO 25101:2009 para la determinación de PFOS y PFOA en muestras no filtradas y el método estándar 537 de la USEPA para la determinación de seleccionados ácidos de alquilo perfluorados utilizan esta metodología. El tratamiento de la muestra utilizando la SPE *off-line* es tedioso, laborioso, consume mucho tiempo y es poco reproducible a niveles traza. Por lo tanto, aproximaciones analíticas rápidas continúan siendo necesarias. La SPE-HPLC en línea

permite un enfoque rápido y fiable para el seguimiento de los contaminantes traza en agua. La SPE en línea ofrece excelentes características de funcionamiento analítico: se necesitan pequeñas cantidades de muestra y el consumo de disolvente es bajo; se produce una reducción de los tiempos de análisis y manipulación de la muestra (sin contaminación o pérdida de la muestra durante las etapas de tratamiento); presenta una excelente precisión, exactitud y robustez; y prácticas ventajas para el análisis de rutina (mejora del rendimiento de las muestras y automatización del método). Por otro lado, la MS/MS proporciona alta sensibilidad, especificidad y selectividad, gran versatilidad de experimentos MS/MS y un análisis cuantitativo robusto. En particular, el modo SRM en instrumentos QqQ ofrece una alta relación señal-ruido y una excelente precisión y reproducibilidad en la cuantificación. En este contexto, nuestro principal objetivo fue el desarrollo de una metodología para el análisis de alto rendimiento de contaminantes orgánicos emergentes (PFAAs y MCs) en agua basándonos en un enfoque de SPE en línea y LC-MS/MS con una columna de cromatografía de retención y pre-concentración que puede ser reutilizada. Además, el método de SPE en línea para el enriquecimiento mediante la técnica de conmutación de la columna es muy simple, de fácil configuración y la columna de enriquecimiento puede ser re-utilizada por más de 1000 muestras, lo que permite una reducción en los costes de análisis.

Para el análisis de de PFAAs y MCs por SPE en línea a LC-ESI-MS/MS se ha utilizado un sistema EQuan (*Environmental Quantitation System*) de Thermo Fisher Scientific (San Jose, CA, USA), que consiste como se muestra en la *Figura SOP1 Anexo A*. en: un inyector automático HTC PAL (CTC Analytics, Zwingen, Suiza), dos bombas de LC (modelos Finnigan Surveyor LC y MS) y dos columnas LC (una para la pre-concentración de la muestra y la otra para la separación analítica), y una unidad de dispositivo de conmutación (válvula de inyección de seis puertos) situada en el frontal del QqQ. Todo el sistema está conectado al espectrómetro de masas QqQ modelo TSQ Quantum Discovery equipado con la fuente ESI y controlado a través del software Xcalibur, versión 2.1.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el único pre-tratamiento necesario para el análisis de las muestras mediante SPE en línea a LC-MS/MS es la filtración, eliminación del cloro residual en el caso de aguas tratadas y la adición de los patrones internos. Por la tipología de las muestras analizadas en el caso de la determinación de PFAAs en aguas superficiales, subterráneas y tratadas después de las diferentes etapas de una ETAP, no ha sido necesaria la filtración previa y se ha trabajado con la muestra entera no filtrada. Como se ha descrito en el *apartado 2.3.1*, en el caso del análisis de MCs, cuando la muestra ha contenido alga se ha filtrado para separar el agua (fracción extracelular o acuosa) del alga (fracción intracelular o sestónica). El agua filtrada y el filtro se analizan independientemente.

Una alícuota de muestra acuosa se fortifica con una mezcla de los patrones internos y luego 1 mL de esta muestra se procesa directamente utilizando el sistema de SPE en línea. 1mL de agua se inyecta directamente en la columna de pre-concentración mediante una fase móvil con un alto contenido acuoso (95-100%) a un

flujo de 1 mL/min (*Figura SOP2a Anexo A*). Después, la válvula de seis puertos del frontal del espectrómetro de masas conmuta gobernada por el software de control del instrumento LCQuanTM 2,5 (Thermo, San Jose, CA) y los analitos son eluidos a contracorriente hacia la columna analítica donde se separan antes de la introducción en el espectrómetro de masas (*Figura SOP2b Anexo A*). La separación cromatográfica se ha realizado mediante elución de gradiente lineal en una columna analítica de fase reversa C<sub>18</sub>. Paralelamente, para evitar la posible contaminación cruzada entre muestras, la columna de extracción se ha limpiado con metanol y agua después de cada inyección. Después de que todos los compuestos en estudio han sido eluidos de la columna analítica, la válvula de seis puertos conmuta de nuevo a la posición de partida, y las columnas de pre-concentración y separación analítica vuelven a las condiciones de inicio con un tiempo de re-equilibración. Después de la separación, la detección se ha llevado a cabo en el espectrómetro de masas QqQ equipado con una fuente ESI en modo de adquisición SRM.

Como requisitos para la identificación se han de cumplir las siguientes condiciones: i) el tiempo de retención del analito en la muestra y en los patrones de la curva de calibración han de estar en concordancia (la relación entre el tiempo de retención cromatográfico del analito respecto al del patrón interno, se debe corresponder con esta misma relación calculada para las soluciones de calibración con una tolerancia de  $\pm 2,5\%$ , de acuerdo con la Decisión 2002/657/CE; ii) se han de observar las dos transiciones monitorizadas para cada analito; iii) la relación entre el área de dos transiciones en la muestra se ha de corresponder con la relación en la curva de calibración [media de la relación en la curva de calibración  $\pm$  la desviación estándar de estas relaciones en las soluciones de la curva de calibración], teniendo en cuenta las tolerancias máximas incluidas en la Decisión 2002/657/CE.

La cuantificación de los analitos se ha realizado por curva de calibración con patrón interno basada en la dilución isotópica utilizando patrones internos marcados en el caso de los PFAAs y la nodularina para el análisis de las MCs. Como para las MCs no existen patrones marcados isotópicamente disponibles comercialmente, la nodularina es utilizada comúnmente como estándar interno. Se ha preparado una serie de soluciones estándar ( $n \geq 5$ ) de una mezcla de los analitos a diferentes concentraciones, añadiendo una cantidad constante del patrón interno a cada solución. Se representa la relación del área de la transición de cuantificación de cada analito con respecto al área del patrón interno versus la concentración de cada analito. La transición de cuantificación se elige como la más específica, selectiva e intensa de las dos transiciones monitorizadas.

Como controles de calidad se utilizan muestras blanco para comprobar la especificidad del método y blancos fortificados. Con cada lote de muestras siempre se extrae un blanco para constatar la buena repetibilidad del método. Para evitar la contaminación cruzada entre inyecciones, entre muestras se inyecta un blanco (agua Milli Q) y dos blancos adicionales después de inyectar la solución estándar de calibración más concentrada. Para controlar las recuperaciones en todas las muestras, hemos calculado la recuperación del patrón interno añadido antes de la extracción.

Para evaluar posibles cambios en la sensibilidad del sistema durante la secuencia de muestras y asegurar una cuantificación adecuada, una muestra fortificada a una concentración intermedia se inyecta y cuantifica como una muestra. Si la concentración calculada usando la curva de calibración no concuerda con la teórica con una tolerancia del 25%, se re-inyecta la curva de calibración. Como garantía de calidad externa se ha evaluado la participación en ejercicios de intercomparación.

### 2.5.1. Ácidos perfluoroalquilados (PFAAs)

Para el análisis en un primer estudio de la presencia de PFOS y PFOA en aguas superficiales de Cataluña (España) y su eliminación en una ETAP, las muestras de agua se concentraron mediante LLE como se ha descrito anteriormente en el *apartado* 2.3.2. La LLE permite ampliar el alcance del análisis, siendo adecuada para analizar diferentes tipos de muestras acuosas (aguas superficiales, subterráneas, residuales, de mar, etc...) y es capaz de extraer simultáneamente diferentes familias de contaminantes orgánicos, por ejemplo tensioactivos aniónicos, catiónicos y no-iónicos (Barco y col., 2003). Además de cómo ya se ha indicado anteriormente, hacer posible el análisis del agua total (PFASs solubles en el agua y asociados al particulado) y minimizar las contribuciones al blanco por la contaminación debido al contacto con las piezas de plástico de algunos sistemas de SPE.

Como consecuencia de la preocupación y vigilancia a nivel internacional sobre el PFOA y el PFOS, su regulación en cuanto a la reducción de sus emisiones y la limitación en su comercialización y uso, estos compuestos se están aplicando en menor medida y están siendo substituidos por otros representantes de la familia, principalmente de cadena más corta (PFBA, PFHxA, PFHpA, PFNA, PFDA, PFBA, PFBS y PFHxS) que son menos tóxicos, bioacumulativos y persistentes. En consecuencia, es importante y necesario su seguimiento en el medio ambiente y los estudios sobre su destino y comportamiento. Por todo ello, en un segundo estadio, además del PFOA y el PFOS se amplió la lista de compuestos en estudio y se actualizó el método de extracción, pasando de una LLE a una SPE en línea. Inicialmente se incorporaron dos PFSAAs (PFBS y PFHxS) y cuatro PFCAs (PFPrA, PFBA, PFHxA y PFHpA). Finalmente la metodología se ha optimizado para un total de once PFAAs, incluyendo PFPeA, PFNA y PFDA.

Los compuestos seleccionados son los detectados con mayor frecuencia en los estudios de la bibliografía (Gellrich y col., 2013; ver *Tabla 3.1* del *Capítulo 3* de los niveles detectados en España hasta el año 2012). El PFPrA solo se ha detectado en aguas de tipo pluvial debido a su alta volatilidad pero inicialmente se había incluido en la lista provisional de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión en el ámbito de la política de aguas (*Provisional Watch List 2012*), aunque

finalmente no ha sido incluido en la lista definitiva (Decisión de Ejecución UE 2015/495).

Los PFAAs en estudio se aislaron mediante SPE en línea con el sistema EQuan descrito anteriormente (ver *Figura SOP1 Anexo A*). Antes de la extracción los patrones internos (<sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFBA, <sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFOA, <sup>13</sup>C<sub>2</sub>-PFDA, <sup>18</sup>O<sub>2</sub>-PFHxS and <sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFOS) se añadieron a la muestra para la cuantificación por calibración interna; 15 mL de agua no filtrada ha sido fortificada con una mezcla de los patrones internos en metanol para obtener una concentración final de 50 ng/L (75 µL de 10 µg/L) y luego 1 mL de esta agua se procesa directamente en el sistema EQuan. Se probaron diferentes sorbentes SPE para la pre-concentración en línea de los PFAAs en estudio:

- C<sub>18</sub> y C<sub>18</sub> modificada (columnas Hypersil GOLD C<sub>18</sub> y aQ, 20 × 2,1 mm y 12 µm de Thermo Fisher Scientific, Franklin, MA);
- Carbono grafitico poroso (columna Hypercarb, 20 × 2,1 mm y 7 µm de Thermo Fisher Scientific, Franklin, MA);
- Polimérico (cartucho Strata-X, 20 × 2,0 mm y 25 µm de Phenomenex, Torrance, CA, USA); y,
- Diferentes combinaciones en serie entre las columnas C<sub>18</sub>, C<sub>18</sub> modificada y polimérica.

Como se indica en la *Tabla 2.13*, las mejores recuperaciones para todos los analitos se lograron con el modo mixto en serie entre el cartucho Strata-X y la columna Hypersil GOLD C<sub>18</sub>. Estas recuperaciones son adecuadas, excepto para el PFPrA. Este analito es muy polar, tiene un tiempo de retención muy bajo (2,7 min) y queda poco retenido en las columnas por lo que parte de este compuesto se pierde cuando la válvula está en posición de carga.

**Tabla 2.13.** Recuperaciones de los diferentes PFAAs analizados con las diferentes columnas de pre-concentración estudiadas.

Columna SPE	% Recuperación (n=3)							
	Carboxilados							
	PFPrA C3-A	PFBA C4-A	PFPeA C5-A	PFHxA C6-A	PFHpA C7-A	PFOA C8-A	PFNA C9A	PFDA C10-A
C <sub>18</sub>	12	6	Na	98	97	100	Na	Na
aQ	8	2	Na	50	98	102	Na	Na
Carbón	31	6	Na	39	70	95	Na	Na
Strata-X	22	8	50	65	94	100	138	167
C <sub>18</sub> +Strata-X	15	69	77	78	96	99	117	138
Strata-X+C18	27	75	80	79	109	100	109	119
Strata-X+aQ	5	17	55	61	102	105	106	108

Na: No analizado.

**Continuación Tabla 2.13.** Recuperaciones de los diferentes PFAAs analizados con las diferentes columnas de pre-concentración estudiadas.

Columna SPE	% Recuperación (n=3)		
	Sulfonados		
	PFBS C4-S	PFHxS C6-S	PFOS C8-S
C <sub>18</sub>	97	98	85
aQ	21	88	73
Carbón	33	88	91
Strata-X	64	87	106
C <sub>18</sub> +Strata-X	85	89	121
Strata-X+C18	89	93	108
Strata-X+aQ	71	89	95

En la *Tabla 2.14* se muestra el gradiente y el modo de operación de la válvula de conmutación para la columna de SPE. El flujo de trabajo es de 1 mL/min. Las fases móviles son las mismas que para la separación analítica en la metodología con LLE, agua (A) y metanol (B). La muestra se carga en las columnas de pre-concentración con una fase móvil 100% acuosa y luego el sistema se limpia primero con agua y después con metanol, para volver a las condiciones iniciales con un tiempo de reequilibración de casi 7 minutos.

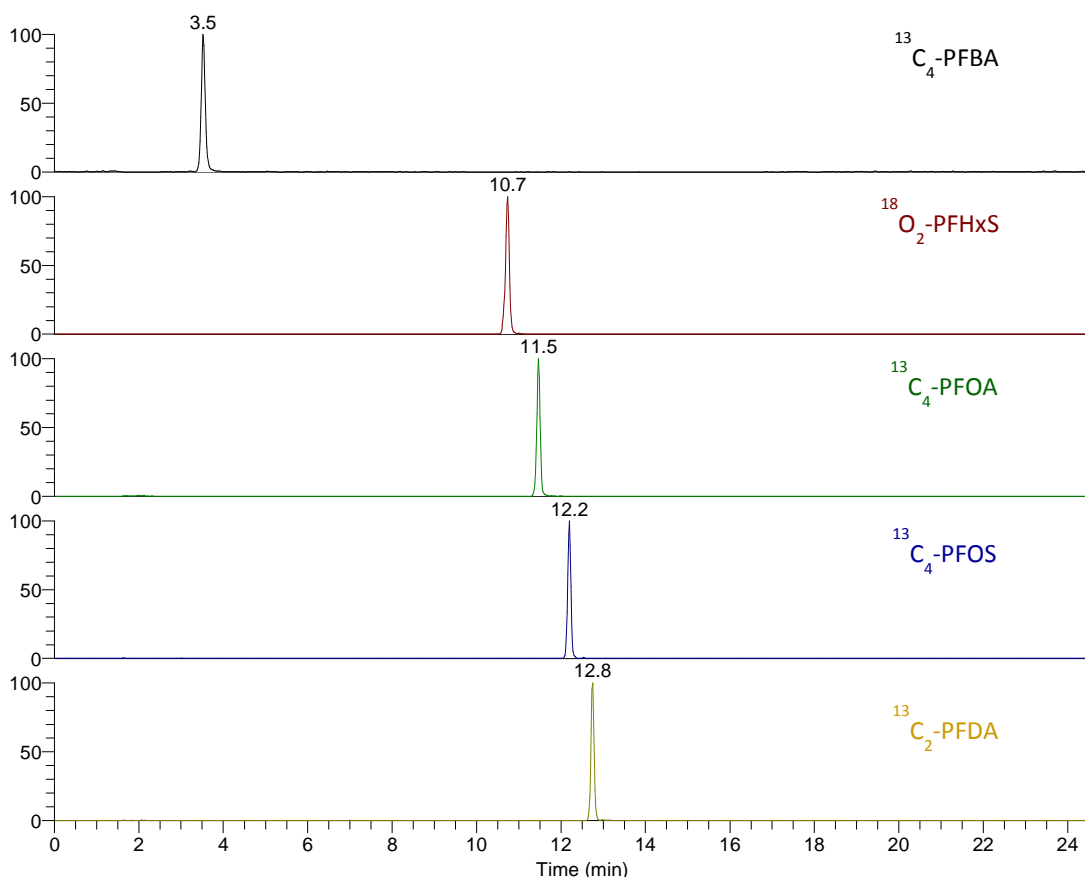
**Tabla 2.14.** Gradiente de fases móviles y modo de operación de la válvula de seis puertos para la combinación de las columnas de SPE Phenomenex Strata X 20 × 2,0 mm, 25 µm y Thermo Hypersil Gold C<sub>18</sub> 20 × 2,1 mm, 12 µm en el análisis de PFAAs mediante SPE en línea a LC-ESI-MS/MS.

Tiempo(min)	Modo Válvula conmutación	Flujo (mL/min)	%A	%B
0	Carga	1	100	0
1,0		1	100	0
4,0		1	100	0
4,2	Elución	1	0	100
7,0		1	0	100
7,2		0	0	100
13,9		0	0	100
14,0		1	0	100
18,0	Carga	1	0	100
18,2		1	100	0
25,0		1	100	0

La separación cromatográfica se ha realizado en las mismas condiciones que para el análisis inicial de PFOA y PFOS por LLE, con un gradiente de elución lineal (ver *Tabla 2.4*) en la misma columna analítica y pre-columnas de fase reversa C<sub>18</sub> (Hypersil Gold y XBridge) y utilizando las mismas fases móviles (agua Milli Q como solvente A y

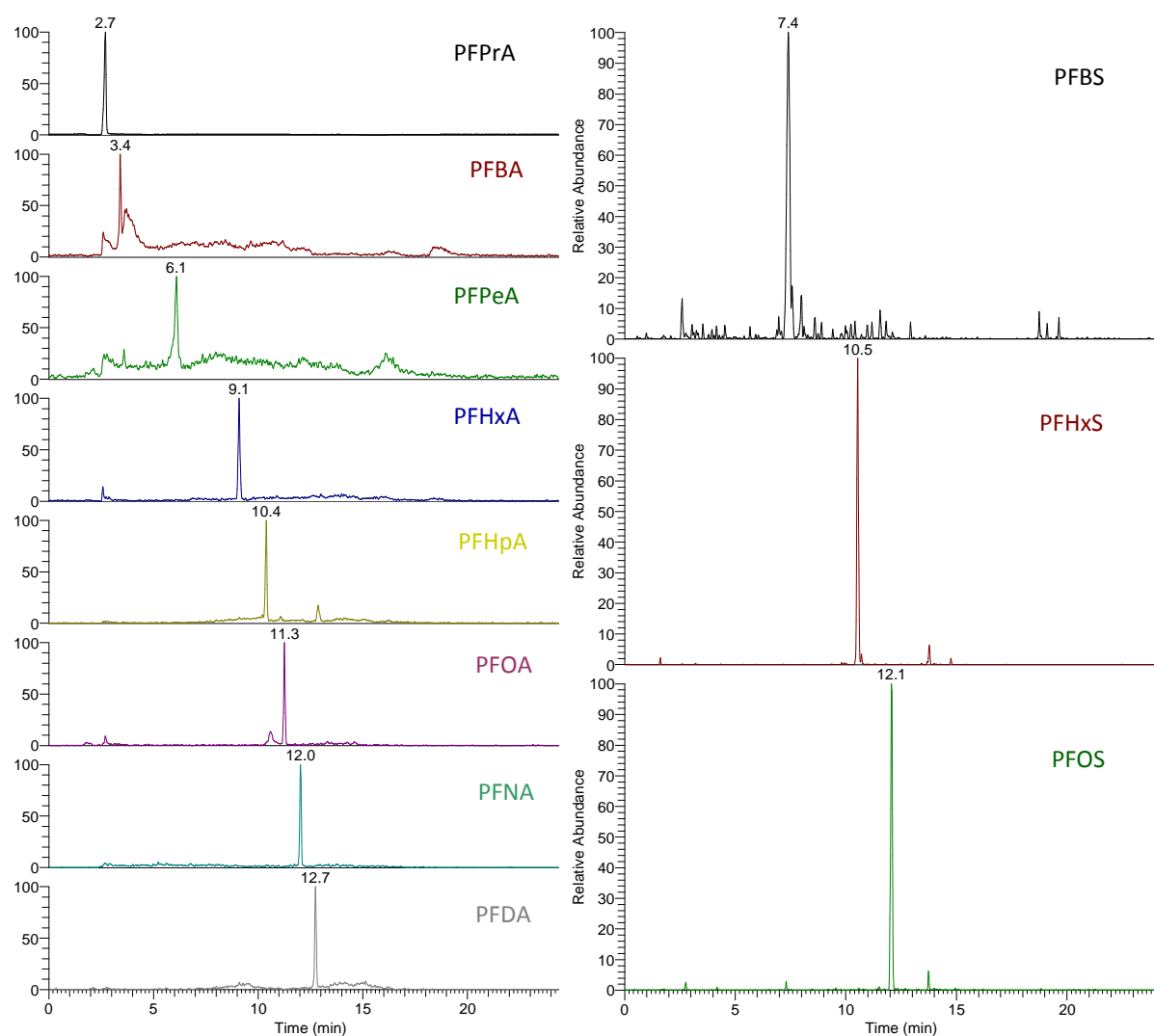
metanol como solvente B a un flujo de 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). En la *Figura 2.17* se muestra el cromatograma de una muestra fortificada con todos los analitos a 10 ng/L y 50 ng/L de los patrones internos. Para evitar la posible contaminación cruzada entre muestras, la columna de extracción se ha limpiado con metanol y agua después de cada inyección. El tiempo del análisis en total es de 25 min por muestra. El método de trabajo ha sido en ESI negativo y modo de adquisición SRM (ver transiciones en la *Tabla 2.9*) en las condiciones analíticas descritas en los *apartados 2.3 y 2.4* y en las *Tablas 2.3 y 2.5*.

Las PFASs se han convertido en omnipresentes en el medio ambiente. Por lo tanto, se ha tenido un especial cuidado para evitar la contaminación en la toma de muestras y por parte del material de laboratorio y algunas piezas instrumentales. Para reducir al mínimo la contaminación de fondo durante todo el procedimiento, todas las fuentes conocidas de contaminación, incluyendo el PTFE accesible y otros materiales de fluoropolímero de los instrumentos y aparatos, se han eliminado. Blancos y blancos fortificados se han utilizado como controles de calidad. Además, se instaló una columna (Hypersil GOLD C<sub>18</sub>, 20  $\times$  2,1 mm y 12  $\mu\text{m}$  de Thermo Fisher Scientific, Franklin, MA) después de la bomba LC y antes de la válvula de inyección para capturar las PFASs que pudieran provenir del sistema y se hizo un *by-pass* del desgasificador en la bomba MS. La columna de captura mejoró el LOQ en un orden de magnitud para el PFHxA y el PFOA.



**Figura 2.17.** Cromatograma LC-ESI-MS/MS de los patrones marcados isotópicamente para la cuantificación por calibración interna en una muestra de agua fortificada con los analitos a 10 ng/L y los patrones internos a 50 ng/L.

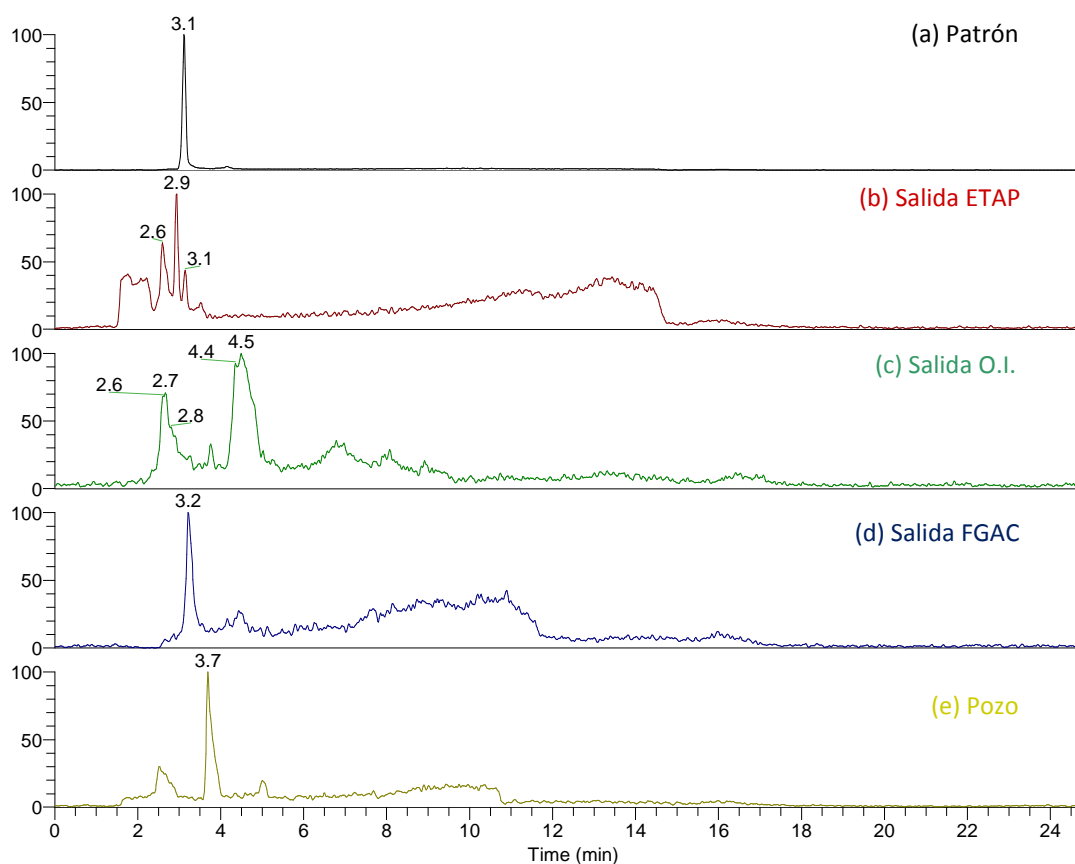




**Continuación Figura 2.17.** Cromatograma LC-ESI-MS/MS de los analitos en una muestra de agua fortificada con los analitos a 10 ng/L y los patrones internos a 50 ng/L.

Los parámetros de calidad del método de SPE en línea a LC-ESI-MS/MS optimizado para el análisis de PFAAs en muestras de agua se recogen en la *Tabla 2.15*. El método es lineal en el intervalo de trabajo (LOQ-500 ng/L) con unos coeficientes de correlación ( $r^2$ ) mayores que 0,9890 y unos residuales inferiores al 24%. Se han obtenido recuperaciones adecuadas, entre el 79 y el 119%. El PFPrA ha presentado unas recuperaciones bajas, inferior al 30% y un LOQ elevado de 10 ng/L debido a su presencia en los blancos de método. Por otra parte, se ha observado un efecto matriz en el análisis de PFBA (ver *Figura 2.18*), que dificulta su identificación y cuantificación, pero que queda compensado con la adición del  $^{13}\text{C}_4$ -PFBA como patrón interno. La reproducibilidad (precisión *intraday*) a dos niveles de concentración (concentración baja-media y alta) también ha sido satisfactoria, con una desviación estándar relativa (RSD) siempre inferior al 15%. El nivel de concentración bajo validado se ha considerado como el LOQ y el LOD se ha estimado en los cromatogramas de las muestras fortificadas al nivel más bajo (LOQ de cada analito) para una relación

señal/ruido (S/N) igual a 3. Los LOQs oscilaron entre 0,5 y 5,0 ng/L y los LODs entre 0,1 y 3,0 ng/L. Se ha indicado el valor medio en la recta de calibrado de la relación entre el área de las dos transiciones monitorizadas por analito. Esta relación oscila entre 1,3 y 42 para el PFHxS y el PFHxA, respectivamente. Un valor alto de esta relación indica una sensibilidad mucho menor en la señal de confirmación respecto a la transición de cuantificación, por lo que el límite de confirmación y la tolerancia permitida en las muestras aumenta (ver *Tabla 2.15*). Los PFASs, tienen relaciones entre las dos transiciones menores (1,3-2,4) que los PFCAs (3,8-42), indicando que para los PFSAs, las dos fragmentaciones, pérdida de SO<sub>3</sub> y FSO<sub>3</sub>, tienen una probabilidad similar.



**Figura 2.18.** Comparación del cromatograma LC-ESI-MS/MS del PFBA fortificado a la misma concentración (10 ng/L) en: (a) un estándar analítico preparado en agua; (b)-(e) muestras reales; tomadas a la salida de: (b) la ETAP; (c) del tratamiento de ósmosis inversa (O. I.); (d) del filtro de carbón activado granulado (FGAC); (e) muestra de agua subterránea de un pozo.

**Tabla 2.15.** Parámetros de calidad de la metodología SPE en línea LC-ESI-MS/MS para el análisis de PFAAs en muestras de agua.

Analito	Linealidad			Recuperación (%) (n=3, SD)	%RSD (n=3)		(ng/L)		Relación transiciones	%Tolerancia relación transiciones
	Intervalo (ng/L)	r <sup>2</sup>	Residuales (%)		5 ng/L	200 ng/L	LOD	LOQ		
PFBA (C4-A)	LOQ-500	0,9890	<24	75 (12)	19	2	3,0	5,0	-	-
PFPeA (C5-A)	LOQ-500	0,9986	<10	80 (7)	13	4	3,0	5,0	-	-
PFHxA (C6-A)	LOQ-500	0,9981	<15	79 (11)	8	2	0,1	0,5	42	50
PFHpA (C7-A)	LOQ-500	0,9987	<6	109 (1)	6	4	0,2	0,5	6,8	30
PFOA (C8-A)	LOQ-500	0,9995	<19	100 (1)	15	2	0,1	1,0	3,8	25
PFNA (C9-A)	LOQ-500	0,9959	<17	109 (3)	6	4	0,3	1,0	4,9	25
PFDA (C10-A)	LOQ-500	0,9991	<10	119 (5)	8	1	0,4	1,0	7,0	30
PFBS (C4-S)	LOQ-500	0,9974	<18	89 (10)	12	8	1,1	5,0	2,4	25
PFHxS (C6-S)	LOQ-500	0,9991	<11	93 (4)	9	3	1,0	5,0	1,3	20
PFOS (C8-S)	LOQ-500	0,9999	<13	108 (9)	5	5	1,0	5,0	1,9	20

n: número de réplicas.

SD: desviación estándar

-: no se puede calcular porque no tiene transición de confirmación. En sus espectros MS/MS aparece un ion fragmento único.

### 2.5.2. Microcistinas

*VER Anexo A. Standard Operation Procedure (SOP) "Analysis of microcystins by on-line solid phase extraction-liquid chromatography tandem mass spectrometry" in CYANOCOST - Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*

*El objetivo de este procedimiento normalizado de trabajo es describir la sistemática general seguida para el análisis de MCs en muestras acuosas por SPE en línea a LC-ESI-MS/MS en el modo de cuantificación SRM. Este SOP se aplica a muestras acuosas - superficiales, tratadas y potables - para el análisis de MCs (especialmente las MC-LR, RR y YR, pero también para las MC-dmRR, -LA, -LF, -LR, -LW, -LY, -RR, -WR ad -YR). El intervalo de trabajo para todos los analitos es de 0,02 a 10 µg/L.*

Las muestras de agua se han recogido en botellas de vidrio de Pyrex borosilicato y se han colocado inmediatamente en la oscuridad a 4°C hasta su análisis (normalmente dentro de las 48 h a la toma de la muestra). Como ya se ha mencionado anteriormente, cuando las muestras han contenido partículas o células de cianobacterias se han filtrado a través de filtros GF/F. El agua filtrada y el filtro (fracción intracelular o sestónica, definida como las partículas retenidas en estos filtros de 0,7 µm) se han analizado por separado. El análisis de la fracción sestónica no es objeto de este apartado.

Para el análisis dirigido en el agua filtrada de las MCs más habituales de las que se dispone de patrón interno, en un primer estadio, la metodología analítica consistió en una SPE en línea a un sistema LC-ESI-MS/MS con una columna de pre-concentración C<sub>18</sub>. Antes del análisis, a una alícuota de 10 mL de la muestra de agua filtrada se le ha añadido la nodularina como patrón interno a una concentración final de 1 µg/L (20 µL 0,5 ng/µL). La SPE en línea del agua se ha realizado con una columna Hypersil Gold de fase reversa C<sub>18</sub> (20 x 2,1 mm, 12 µm, Thermo Fischer Scientific, San Jose, CA, EE.UU.). 1 mL de cada muestra fortificada con nodularina como patrón interno, se ha inyectado directamente en la columna de carga con una fase móvil de alto contenido acuoso (95%) a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Después de 1,3 min, la válvula de seis puertos del frontal del espectrómetro de masas cambia de posición y los analitos pre-concentrados en la cabeza de esta columna son eluidos a contracorriente hacia la columna analítica. La separación cromatográfica se ha realizado con la columna de fase reversa Luna C<sub>18</sub>(2) en las condiciones analíticas descritas en los *apartados 2.3 y 2.4* (ver *Tablas 2.3, 2.6 y 2.10*). Después de que todos los compuestos sean eluidos por la fase móvil, la válvula de seis puertos vuelve a cambiar a la posición inicial, y las dos columnas se limpian con fase móvil 100% orgánica y se re-equilibran a sus condiciones de partida. Los análisis se llevaron a cabo en modo ESI positivo. Los datos fueron adquiridos en el modo *Full Scan* (*m/z* 400-1200, 1,2 seg/barrido) para el *screening* de las diferentes variantes de MCs y en el modo SRM para el análisis dirigido de la MC-LR, -RR, -YR y nodularina (como patrón interno), inicialmente. Más tarde se incluyó la -

dmRR por ser una variante muy frecuente en las muestras analizadas, y finalmente para las diez MC de las que se dispuso de patrón comercial (MC-dmLR, -dmRR, -LA, -LF, -LR, -LW, -LY, -RR -WR and -YR).

Como resultado del análisis de muestras de floraciones de cianobacterias se obtienen perfiles de contenido de MCs muy complejos. Con el fin de elucidar este perfil de toxinas, es recomendable el uso de columnas y gradientes de elución largos. En cambio, muchas muestras, por ejemplo, de experimentos de tratamientos de agua, son cromatográficamente bastante más sencillas y por lo tanto se necesita una resolución menor. En estos casos, cuando sólo unos pocos analitos deben ser separados, también se pueden utilizar métodos de tiempos de ejecución más cortos.

Por lo tanto, en el estudio exhaustivo de las muestras se ha trabajado utilizando un gradiente entre las dos fases móviles descritas anteriormente. El gradiente en la columna de SPE y el modo de operación de la válvula de seis puertos están descritos en las *Tablas SOP4* y *SOP5* del *Anexo A* describe el programa de elución en gradiente lineal para la separación analítica de las diferentes variantes de MCs. El tiempo total de funcionamiento para cada análisis es de 70 minutos. Las *Figuras SOP4* y *SOP5* del *Anexo A* muestran los cromatogramas resultantes para el análisis de MCs mediante SPE en línea LC-ESI-MS/MS utilizando el gradiente para una mezcla de los estándares comerciales disponibles y para una muestra real de una floración, respectivamente.

Para el *screening* de las muestras de agua más sencillas se ha trabajado en modo isocrático 70:30 A:B. En la *Tabla SOP2* del *Anexo A* se indica el gradiente de fases móviles programado para la columna de pre-concentración y el modo de operación de la válvula de conmutación. El tiempo total de funcionamiento para cada análisis es de 22 minutos. La *Figura SOP3* del *Anexo A* muestra el cromatograma resultante del análisis de MCs mediante SPE en línea LC-ESI-MS/MS en el modo isocrático para una mezcla de los estándares comerciales disponibles.

La *Tabla SOP6 (Anexo A)* resume los principales parámetros analíticos validados para las MCs más típicas. Se han preparado soluciones estándar de calibración de las MCs cubriendo un adecuado intervalo de trabajo que incluye el nivel máximo guía de la OMS (1 µg/L) a diferentes niveles de concentración ( $n \geq 5$ ) con la nodularina como patrón interno a una concentración constante de 1 µg/L. La cuantificación de los analitos se ha realizado mediante el método de la calibración interna. Todas las MCs han presentado linealidades satisfactorias con valores del coeficiente de correlación ( $r^2$ ) mayores que 0,98 y residuales menores al 25%. La exactitud y precisión del método han sido evaluados mediante experimentos de recuperación ( $n \geq 3$ ) utilizando tres matrices (agua superficial, potable y mineral envasada) fortificadas a tres niveles de concentración (baja, media y alta). Se han obtenido curvas de calibración equivalentes para las tres matrices. Por lo tanto, se ha concluido que no existe efecto de la matriz en estos casos. Por lo tanto, el estudio de validación se ha realizado en agua envasada. Las recuperaciones calculadas están en el intervalo de 89-121, y la precisión es aceptable con desviaciones estándar relativas (RSDs) menores que el 26%. El nivel de concentración menor validado (0,02 µg/L) ha sido considerado el LOQ y el LOD ha sido estimado en el cromatograma de las muestras fortificadas al nivel menor (LOQ) con

una relación señal/ruido (S/N) igual a 3. El valor medio en la recta de calibrado de la relación entre el área de las dos transiciones monitorizadas por analito ha sido de 1,9; 2,6 y 5,1 para la MC-LR, -RR y -YR, respectivamente. El aumento del valor de esta relación indica una sensibilidad mucho menor en la señal de confirmación respecto a la transición de cuantificación, por lo que el límite de confirmación y la tolerancia permitida en las muestras aumenta.

## 2.6. Desarrollo de metodologías de *screening* basadas en HRMS para la determinación de cianotoxinas

Siguiendo el nivel guía de la OMS (1998), hay que tener en cuenta la concentración total de MC (libre y unida a la célula) en la muestra entera de agua. Por lo que se ha desarrollado una estrategia integrada basada en HRMS para la determinación rápida y precisa de MCs y péptidos relacionados extra- e intracelularmente en afloramientos. Las muestras naturales (agua y algas) se han filtrado para el análisis independiente de las fracciones acuosa y sestónica. Estas fracciones se han analizado mediante MALDI-TOF/TOF-MS y ESI-Orbitrap-HCD-MS. La *Figura 2.19* muestra el esquema del procedimiento analítico seguido para el análisis de las MCs en el agua y la biomasa. La metodología analítica desarrollada en la presente tesis proporciona un método rápido para el análisis dirigido de las MCs más habituales de las que se dispone de patrón comercial por SPE en línea y LC-ESI-MS/MS, que ya hemos descrito en el apartado anterior, y a continuación nos centraremos en la estrategia integrada basada en HRMS para el *screening* de toxinas en las dos fracciones intra- y extracelular.

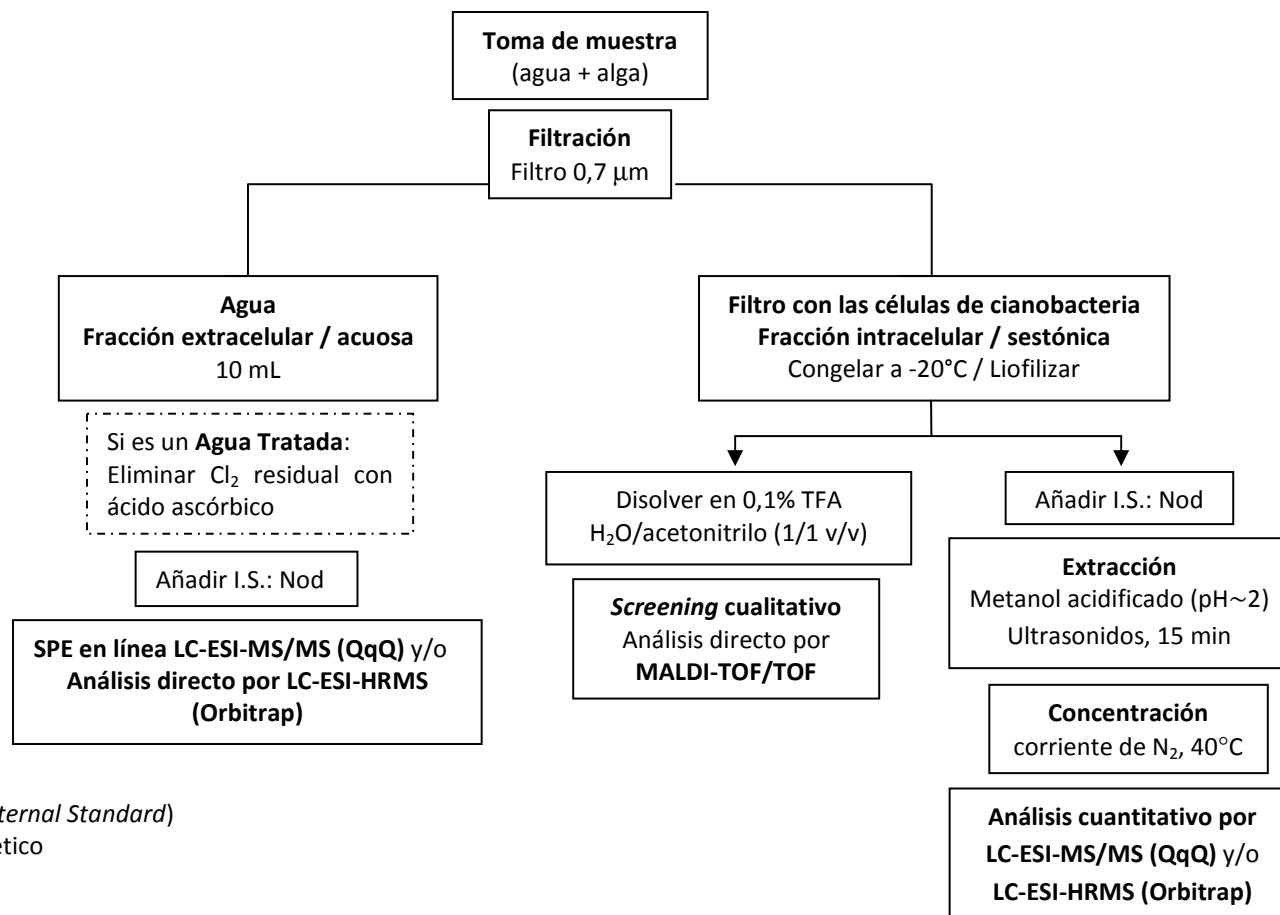
Inicialmente, se ha realizado un análisis cualitativo rápido de las toxinas presentes en la muestra. De forma que las fracciones sestónica liofilizada y acuosa se han analizado directamente, sin extracción previa por MALDI-TOF/TOF-MS y LC-ESI-HRMS (Orbitrap-Exactive HCD), respectivamente. Si este análisis no revela la presencia de ninguna toxina, el proceso/rutina se acaba aquí. Si se han detectado toxinas, el análisis cuantitativo se ha realizado mediante LC-ESI-HRMS por inyección directa de la fracción extracelular (agua) y en el extracto metanólico de la fracción intracelular.

Los estudios por MALDI, ESI y fragmentación han proporcionado información estructural crucial. Con el fin de lograr una determinación inequívoca de la presencia de MCs en las muestras se ha investigado el potencial de combinar los modos de ionización positivo y negativo, de adquisición en *Full Scan* y fragmentación (TOF/TOF y HCD) mediante HRMS y de utilizar HR y masa exacta. Cabe destacar que sólo un tipo de experimento de MS es generalmente insuficiente para la identificación inequívoca y la confirmación estructural de cianotoxinas. Por lo tanto, consideramos que el mejor

enfoque consiste en combinar diferentes experimentos y utilizar toda la información proporcionada. Además, se ha demostrado una cuantificación fiable por HRMS. Aunque el LC-MS con un QqQ operando en modo SRM es un método ampliamente utilizado para el análisis cuantitativo de biotoxinas, nuestra aproximación mediante HRMS proporciona una exactitud, linealidad y sensibilidad por lo menos comparables. Sin embargo, la LR de trabajo en los cuadrupolos (resolución típicamente unitaria), hace que la técnica sea propensa a interferencias de la matriz en muestras complejas, si aparecen iones de masa similar. Mediante HRMS, se obtiene el espectro de masas de *Full Scan* que, a diferencia de las mediciones SRM, puede ser útil para la detección de especies que co-eluyan, aductos inesperados, etc. Esta aproximación reduce la probabilidad de falsos positivos y negativos. Además, para optimizar las transiciones en SRM para cada analito, se necesita un tiempo extra de desarrollo del método significativo. Y debido a la naturaleza específica del modo SRM, se detectan únicamente las toxinas especificadas en el método. Por lo tanto toxinas nuevas o modificadas podrían permanecer sin detectarse indefinidamente, incluso presentándose a concentraciones elevadas.

Por su parte, los análisis directos de la fracción sestónica liofilizada y del agua filtrada mediante MALDI-TOF/TOF y LC-ESI-HRMS, respectivamente, han permitido obtener métodos rápidos de alto rendimiento para determinar toxinas en la muestra de agua entera.

El análisis del liofilizado por el método de MALDI-TOF/TOF-MS se ha realizado para el análisis cualitativo y la identificación preliminar de las biotoxinas de cianobacterias (Welker y col., 2002), como un *screening* rápido y simple de la fracción sestónica. Es una técnica de HR y sensible, que requiere poca manipulación de la muestra, tiene un consumo bajo de muestra y permite una identificación correcta de los diferentes congéneres de toxinas simultáneamente sin una separación previa. La preparación de la muestras fue muy sencilla, como ya se ha descrito en el *apartado 2.3.2*. El equipo utilizado ha sido el espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF modelo 4800 Plus, ya descrito en el *apartado 2.3.3* de la presente tesis. Sin embargo, la baja reproducibilidad de la señal del analito mediante MALDI hacen necesario el uso de un patrón interno para la cuantificación (Howard y col., 2007), pero con muestra sólidas la fortificación de este patrón interno es difícil de realizar. En consecuencia, para el análisis cuantitativo, los extractos metanólicos de la fracción sestónica se han analizado por LC-ESI-HRMS.



I.S.: Patrón interno (*Internal Standard*)

TFA: ácido trifluoroacético

Figura 2.19. Esquema del procedimiento analítico para el análisis de MCs en muestras de agua mediante espectrometría de masas.



Por la otra parte, mediante la inyección directa y análisis LC-ESI-HRMS de la fracción acuosa, el pre-tratamiento de la muestra se ha limitado a la filtración y la adición del patrón interno, minimizando la manipulación de la muestra y evitando la contaminación en los pasos de pre-tratamiento. Aunque diferentes aproximaciones utilizando grandes volúmenes de muestra se han propuesto en los últimos años, para nuestro método, 10  $\mu\text{L}$  de muestra han sido suficientes para la inyección directa y análisis de muestras de agua de nivel de concentración medio-alto. Sin embargo, las muestras de bajo nivel de concentración han requerido un volumen de inyección de 100  $\mu\text{L}$  en algunos casos específicos. La técnica de inyección de grandes volúmenes es sencilla de configurar, sólo se necesitan pequeñas modificaciones en el hardware del inyector automático utilizado. Este análisis se ha llevado a cabo en el espectrómetro de masas modelo Orbitrap-Exactive HCD ya descrito anteriormente y en las condiciones óptimas resumidas en el *apartado 2.3* de la presente tesis. Las condiciones para la separación cromatográfica se han descrito en el *apartado 2.3.3*, utilizando el gradiente de elución lineal para muestras complejas, debido a que las muestras de floraciones de cianobacterias conducen a perfiles con una variedad significativa de diferentes MCs. Los parámetros de calidad para el análisis de las MCs comercialmente disponibles en ese momento (-dmLR, -dmRR, -LA, -LF, -LR, -LW, -LY, -RR -WR and -YR) en agua filtrada por LC-ESI-HRMS se muestran en la *Tabla 2.16*. Se han estudiado el efecto matriz, la linealidad, el LOD y LOQ, la veracidad y la precisión en los modos de ionización positivo y negativo.

Se han preparado diariamente soluciones estándar de las diez MCs comercialmente disponibles a diferentes niveles de concentración ( $n = 5$ ) entre 0,06 y 110  $\mu\text{g/L}$  para el análisis directo del agua (extracelular), con una concentración final de 1,0  $\mu\text{g/L}$  de nodularina (patrón interno). Cada curva de calibración se ha ensayado en diferentes matrices: agua tratada, superficial y envasada. Las curvas obtenidas han sido equivalentes. Por lo tanto, el estudio de validación se ha realizado en agua envasada. Todas las MCs han demostrado valores del coeficiente de correlación ( $r^2$ ) mayores que 0,98 y residuales menores al 32%. El LOD se ha estimado para la relación señal/ruido (S/N) igual a 3 en el cromatograma de las muestras fortificadas al menor nivel de concentración validado. Los LODs varían entre 0,01 (MC-dmRR, -LA, -LR and -RR) y 0,05  $\mu\text{g/L}$  (MC-dmLR, -LF and -LW) y desde 0,01 (MC-dmLR, -LA, -LF, -LR, -LY and -YR) a 0,07  $\mu\text{L/L}$  (MC-RR) para los modos de ionización positivo y negativo, respectivamente. El nivel más bajo del intervalo de linealidad (0,06-0,20  $\mu\text{g/L}$ ) según la MC y el modo de ionización, se ha considerado el LOD para cada MC analizada. El modo de ionización negativo ofrece LODs menores, excepto para las MCs que contienen dos residuos Arg (MC-dmRR and -RR). Pero la más baja concentración (0,06  $\mu\text{g/L}$ ) no mantiene la linealidad, excepto para las MCs que no contienen residuos Arg (MC-LA, -LF and -LY) y los LOQs son más altos por ESI(-), 0,2  $\mu\text{g/L}$  para las MC-LR, -LW, -RR, -WR y -YR. Al contrario, el modo de ionización negativo es lineal hasta concentraciones mayores 110  $\mu\text{g/L}$  para la MC-LY y 70  $\mu\text{g/L}$  para las MC-LR, -LW, -WR y -YR respecto a los 6  $\mu\text{g/L}$  mediante ESI(+). La veracidad y la precisión han sido ensayadas mediante experimentos de fortificación a tres niveles de concentración usando agua embotellada (0,2, 0,6 y 6  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente). Estas muestras se extrajeron siguiendo el mismo procedimiento utilizado para las muestras reales. La

veracidad se ha expresado como la recuperación en estas muestras de agua fortificada (n = 5). La recuperación se calculó como la cantidad de toxina detectada frente a la cantidad fortificada. Para comprobar la veracidad en todas las muestras se ha calculado la recuperación de la nodularina, añadida antes de la extracción. Las recuperaciones de todas las MCs se han determinado entre 67-133%, que han resultado para la MC-LF y -WR en los niveles más bajos y más altos validados, respectivamente. La repetibilidad y reproducibilidad se han expresado como la desviación estándar relativa (RSD) de cinco medidas consecutivas de una muestra fortificada a 0,6 veces el límite legislado inyectadas el mismo día y en diferentes días, respectivamente. La repetibilidad y reproducibilidad de las MCs más comunes (-LR, -RR and -YR) a 0,6 veces el límite legislado han sido satisfactorias con RSDs menores al 12 y 27%, respectivamente.

**Tabla 2.16.** Parámetros de calidad del método de inyección directa de agua y LC-ESI-HRMS para el análisis de MC-dmLR, -dmRR, -LA, -LF, -LR, -LW, -LY, -RR -WR y -YR.

Analito	Linealidad		LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	%Recuperación		
	µg/L	Residuales (%)			0,2 µg/L	0,6 µg/L	6 µg/L
ESI positivo							
MC-dmLR	LOQ-110	<30	0,05	0,20	109	72	85
MC-dmRR	LOQ-70	<26	0,01	0,20	108	74	95
MC-LA	LOQ-70	<24	0,01	0,06	78	88	101
MC-LF	LOQ-6	<30	0,05	0,06	67	101	120
MC-LR	LOQ-6	<29	0,01	0,06	76	85	129
MC-LW	LOQ-6	<22	0,05	0,06	78	93	121
MC-LY	LOQ-6	<28	0,03	0,06	72	101	118
MC-RR	LOQ-70	<26	0,01	0,06	107	74	103
MC-WR	LOQ-6	<30	0,04	0,06	85	75	133
MC-YR	LOQ-6	<30	0,04	0,06	73	87	130
ESI negativo							
MC-dmLR	LOQ-110	<17	0,01	0,20	105	82	99
MC-dmRR	LOQ-70	<32	0,05	0,20	109	72	86
MC-LA	LOQ-70	<25	0,01	0,06	80	100	110
MC-LF	LOQ-6	<25	0,01	0,06	75	103	121
MC-LR	LOQ-70	<17	0,01	0,20	117	83	99
MC-LW	LOQ-70	<19	0,04	0,20	105	82	94
MC-LY	LOQ-110	<29	0,01	0,06	71	93	110
MC-RR	LOQ-70	<24	0,07	0,20	93	77	91
MC-WR	LOQ-70	<30	0,04	0,20	110	66	101
MC-YR	LOQ-70	<25	0,01	0,20	107	77	91

Se han usado muestras blanco fortificadas como controles de calidad. Una muestra blanco (agua envasada) se ha extraído con cada lote de muestras, demostrando una buena repetibilidad del método. Entre muestras se han inyectado blancos instrumentales (agua y metanol para el análisis extra- e intracelular), y tres blancos adicionales repetibilidadse han inyectado después del punto más concentrado de la recta de calibración, para evitar contaminación cruzada entre inyecciones. Como

garantía de calidad externa, se ha participado en ejercicios de intercomparación (Red Ibérica de Cianotoxinas, Grupo de trabajo español de análisis de MCs por LC-MS).

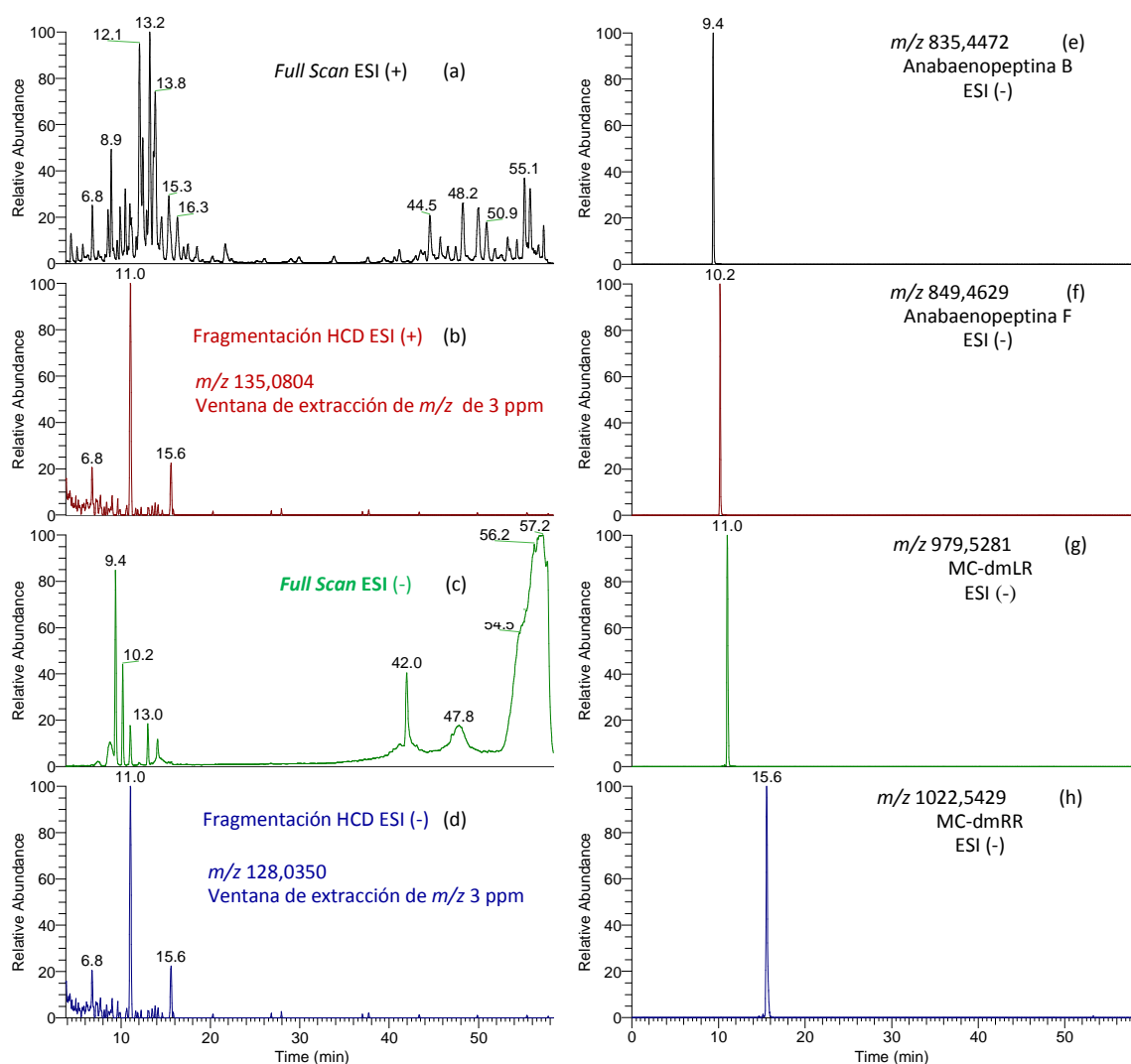
Las técnicas de HRMS utilizadas en los métodos desarrollados en la presente tesis, MALDI-TOF/TOF-MS y LC-ESI-HRMS (Orbitrap), proporcionan un conjunto exhaustivo de herramientas para la identificación:

- Conocer la masa exacta (exactitud <3 ppm) de las iones moleculares y de los fragmentos en ambos modos de adquisición, positivo y negativo;
- Proponer la fórmula elemental de estos iones teniendo en cuenta una serie de criterios restrictivos descritos anteriormente en el *apartado 2.3.3*;
- Detectar los iones fragmento diagnósticos de las MCs de  $m/z$  135,0804 y 128,0353 en modo de ionización positivo y negativo, respectivamente.

La gran especificidad de la HRMS permite deducir fórmulas elementales para la asignación de estructuras provisionales de analitos y la identificación de nuevas sustancias o análogos de compuestos. La masa exacta y la propuesta de posibles fórmulas empíricas sólo puede utilizarse cuando se mide con una HR y exactitud suficientes, señales con una  $m/z$  cercana o especies isobáricas superpuestas pueden sesgar la medida de masa. Si se trabaja a LR, el error en la asignación de masa aumenta debido a la co-elución de los analitos con interferencias de masa similar. Y a menor exactitud de masa el número de fórmulas elementales candidatas aumenta exponencialmente. Además para la confirmación es importante aplicar una aproximación heurística teniendo en cuenta una serie de criterios restrictivos descritos en el *apartado 2.3.3*, entre los que hay que destacar la importancia de comparar el perfil isotópico experimental obtenido con el teórico según la fórmula empírica propuesta.

El espectro de masas de fragmentación de los analitos se ha registrado para obtener: el patrón de fragmentación característico; información estructural detallada; y otros iones fragmento característicos de los compuestos en estudio. De este modo se aumenta el número de puntos de identificación (IPs) según Decisión 2002/657/CE y la selectividad de las metodologías propuestas. Todas las MCs tienen en su espectro de masas de fragmentación algunos fragmentos comunes, ya descritos en el *apartado 2.4.2*. Los iones fragmento más selectivos e intensos son las señales de  $m/z$  135,0804 ( $C_9H_{11}O$ ) y 128,0353 ( $C_5H_6O_3N$ ) derivadas de la cadena lateral característica Adda y de los ácidos cíclicos glutámico y L-metilaspártico en los modos de ionización positivo y negativo, respectivamente. Como se ha mencionado anteriormente, ambos iones fragmento se han usado como iones diagnóstico en sus señales iónicas reconstruidas en los métodos MALDI-TOF/TOF y ESI-Orbitrap. El cromatograma de los iones fragmento diagnósticos extraídos de la fracción extracelular de una muestra real de un *bloom* analizada con el método de LC-ESI-HRMS en ambos modos de ionización se muestra en la *Figura 2.20*. Como resultado de trabajar con estos cromatogramas extraídos, las señales observadas en el *Total Ion Current* (TIC) se simplifican y el cromatograma es más específico y selectivo, pudiendo identificar fácilmente las MCs

potenciales que pueda presentar la muestra. Como es conocido, el análisis retrospectivo de los datos en HRMS y en el modo de adquisición *Full Scan* se realiza mediante la extracción de la traza ( $m/z$ ) exacta del analito. En los cromatogramas reextraídos de los iones fragmento diagnósticos, solo se observan los picos de las sustancias que tienen los fragmentos característicos de la MCs en sus espectros. Hay que destacar que la ventana de extracción utilizada ha sido de  $\pm 3$  ppm. El ajuste adecuado de esta ventana de extracción aumenta la selectividad y la especificidad del método.



**Fig. 2.20.** Cromatograma del análisis LC-ESI-HRMS de la fracción extracelular de una muestra de un *bloom* (embalse Vilasouto, 2011) en ionización positiva y negativa en (a y c) *Full Scan*; (b y d) fragmentación HCD extrayendo las  $m/z$  de los iones fragmento diagnósticos. Cromatograma extraído de los analitos identificados en modo de ionización negativa: (e) anabaenopeptina B ( $m/z$  835,4472); (f) anabaenopeptina F ( $m/z$  849,4629); (g) MC-dmLR ( $m/z$  979,5281); (h) MC-dmRR ( $m/z$  1022,5429).

Adicionalmente, la LC/ESI-HRMS también cumple los siguientes criterios:

- Debido a que se lleva a cabo la separación cromatográfica, el tiempo de retención específico de cada toxina se ha utilizado como herramienta primaria de identificación siguiendo el criterio descrito anteriormente en el *apartado 2.3.3 y 2.5*.
- Detectar las especies doblemente cargadas, como la señal  $[M+2H]^{2+}$ , características del ESI y de las MCs con algún residuo Arg en su estructura. Un compuesto con una señal doblemente cargada en su espectro de masas en ESI puede ser potencialmente identificada como una MC con uno o dos residuos Arg en función de si la señal  $[M+2H]^{2+}$  es débil o intensa, respectivamente. Como es bien conocido, una señal doblemente carga muestra un perfil isotópico característico con un pico M+1 a una distancia de media unidad de masa (ver *Figura 2.9*).

En conclusión, la metodología LC-ESI-HRMS desarrollada proporciona más herramientas de identificación y en consecuencia una determinación con un mayor grado de seguridad.

Se ha aplicado el concepto de IPs descrito en la Decision 2002/657/EC al análisis de las MCs, para garantizar una identificación y cuantificación de estas toxinas efectivas y fiables y comparar los diferentes métodos aplicados (ver *Tabla 2.17*). Esta guía europea asigna el número de IPs que cada una de las técnicas básicas MS puede proporcionar. La principal ventaja de usar este criterio de IPs, es que la verificación de la identidad se puede hacer de una manera descrita y aceptada internacionalmente.

La directriz CE considera que un ion molecular o fragmento medido con HRMS ofrece un IP más que si se obtiene con una técnica de LRMS y define HRMS como mayor de 10000 al 10% del valle. La dificultad reside cuando se intentan clasificar los analizadores de masa como espectrómetros de masas de LR o HR. Con los instrumentos TOF y Orbitrap, la resolución se mide por regla general al 50% de la altura (FWHM), y como se describe en la bibliografía, estas resoluciones han de dividirse por dos o tres veces para calcular su equivalencia en resolución al 10% del valle. De acuerdo con ello, hemos considerado que los iones fragmento obtenidos con el TOF/TOF son iones productos medidos a LR. Hay que destacar que el uso de la masa exacta como un criterio de confirmación no está explícitamente especificado en esta legislación (Decision 2002/657/EC), donde los IPs se asigna en base a definición clásica de resolución de los espectrómetros de masas de HR clásicos (sector magnético, FT-ICR). De acuerdo con otros autores (Hernández y col., 2004), además de la resolución, se ha tenido en cuenta el uso de la exactitud de masa proporcionada por el TOF y el Orbitrap (<3 ppm) para el computo del número de IPs.

Las técnicas de masa exacta propuestas en nuestra estrategia integrada de HRMS han mostrado una mayor selectividad frente a la aproximación de MS/MS alternativa, como pone de manifiesto el número de IPs logrados y especificados en la *Tabla 2.17*. La Decision europea propone 1,0; 2,0; 1,5; y 2,5 IPs para cada ion precursor

y para cada ion producto obtenidos con LRMS y HRMS, respectivamente. Para disminuir la probabilidad de falsos positivos y negativos, se han considerado siempre un mínimo de cuatro masas exactas. Ello incluye los iones moleculares  $[M+H]^+$  y  $[M-H]^-$  y los iones fragmento diagnósticos de  $m/z$  135,0804 y 128,0353 en modo de ionización positivo y negativo, respectivamente. Teniendo en cuenta estos iones moleculares y fragmentos, los métodos de MALDI-TOF/TOF-MS y LC-ESI-HRMS han proporcionado siete y nueve IPs para la confirmación de la identificación de las MCs, respectivamente (ver *Tabla 2.17*), en comparación con los cinco IPs que ofrece el método mediante LC-ESI-QqQ. Además, también se han considerado las señales doblemente cargadas tipo  $[M+2H]^{2+}$  y otros iones fragmentos obtenidos mediante ESI, TOF/TOF y AIF. Como resultada la selectividad ha mejorado y el número de IPs ha aumentado. Es decir, que para las MCs que contienen Arg en su estructura, la señal doblemente cargada contribuye añadiendo uno o dos IPs en los métodos LC-ESI-QqQ y LC-ESI-HRMS hasta un total de seis y once IPs, respectivamente. Finalmente, cada ion fragmento suplementario del espectro de fragmentación incorpora 1,5 y 2,5 IPs al total de IPs de las técnicas MALDI-TOF/TOF-MS y LC/ESI-HRMS IPs, respectivamente, compensando el hecho de que no se calculan relaciones iónicas. Los espectros de fragmentación de las *Figuras 2.12, 2.15 y 2.16* incluyen el número de IPs obtenidos. Por lo tanto, los resultados obtenidos tienen un elevado grado de confirmación de la presencia de MCs en las muestras. En contra, por ejemplo, si trabajáramos solo en un modo de ionización, el método MALDI(+)-TOF/TOF-MS solo podría proporcionar 3,5 IPs (1,5 IPs por el ion producto medido en LR + 2 IPs por el ion precursor en HRMS) y no se podría calcular una relación iónica. La Decisión 2002/657/CE establece la necesidad de obtener un mínimo de tres (grupo B: compuestos con un nivel máximo de residuo establecido) o cuatro (grupo A: compuestos prohibidos) IPs con el fin de confirmar los residuos orgánicos y contaminantes en los animales vivos y productos animales. Esto pone de manifiesto la ventaja de trabajar en ambos modos de ionización (positivo y negativo) y de adquisición (*Full Scan* y fragmentación). El estudio de la información complementaria obtenida mediante MS y MS/MS en ambos modos de ionización ha sido muy útil para fines de confirmación, lo que ha aumentado significativamente la selectividad y el número de IPs. Como el número de IPs incrementa, utilizar la metodología integrada propuesta minimiza la probabilidad de falsos positivos y negativos.

## 2.7. Comparación de técnicas MS

En la *Tabla 2.17* se comparan las técnicas de MS utilizadas en la presente tesis para el análisis de contaminantes orgánicos emergentes. Como se muestra en esta tabla, los modos de adquisición con que se ha trabajado en el QqQ son SRM y MS/MS, experimentos *pre-target* para el análisis cuantitativo y cualitativo, respectivamente. En contraste, los analizadores TOF y Orbitrap son alternativas *non-target* (Gross, 2004;

Rosen, 2007) debido a que se opera en modo *Full Scan*. El análisis *non-target* permite analizar todas los análogos simultáneamente sin pre-seleccionar una lista de analitos limitada, por ejemplo, hace posible la determinación de todas las variantes de MCs a la vez. Asimismo, se puede detectar cualquier compuesto presente en la muestra (analitos no esperados, productos de transformación y/o impurezas, o incluso compuestos tóxicos imprevistos) y poner a punto un método multi-análisis para diferentes tipos de contaminantes. Además, los datos adquiridos pueden someterse a un análisis retrospectivo "*post-targeted*" para determinar otras sustancias no seleccionadas *a priori* como contaminantes nuevos o emergentes o análogos aún no conocidos. Por lo tanto, en el análisis de MCs con los analizadores TOF/TOF y Orbitrap, se realizó un *screening* retrospectivo de otras potenciales toxinas y péptidos relacionados como las anabaenopeptinas.

Por otra parte, aunque los instrumentos QqQ de LR en modo de adquisición SRM están considerados como altamente selectivos, en el análisis de muestras complejas, es posible que se produzcan falsos positivos y negativos. La estrategia integrada de HRMS propuesta en la presente tesis combinan las cualidades de la HR y la AMM, con la información proporcionada por los estudios de fragmentación. En consecuencia, esta aproximación ofrece una alta selectividad y un número importante de puntos de identificación, como se detalla en la *Tabla 2.17* y se ha descrito en el apartado anterior. Los instrumentos TOF/TOF y Orbitrap nos proporcionan los espectros de masa en modo *Full Scan* MS y de fragmentación con HRMS, y de esta forma, podemos conocer la masa exacta también de los iones fragmento. Esta combinación es muy útil para evitar la posibilidad de errar en la confirmación cuando se trabaja con analizadores de baja resolución (LRMS) (Gallart-Ayala y col, 2014; Miles y colo., 2012). Hay que destacar que en el experimento de MS establecido en el equipo Orbitrap se opera alternadamente en los modos de adquisición HRMS *Full Scan* y AIF (ver *Figura 2.20*). Con este experimento, se obtienen mediante HRMS en una sola inyección alternadamente, el espectro de masas *Full Scan* y de fragmentación, y la AMM (<3 ppm con calibración externa) para todos los iones moleculares y fragmentos. A modo de ejemplo, en la *Tabla 2.12* se especifica la exactitud de masa de las principales señales obtenidas por fragmentación de la MC-LR con el espectrómetro de masas Orbitrap-Exactive HCD en los dos modos de ionización, positivo y negativo. En este caso, la exactitud experimental osciló entre los valores absolutos de 0,1 y 1,7 ppm ( $m/z$  60-1200).

Tabla 2.17. Comparación técnicas de MS.

Analizador	QqQ	TOF/TOF	Orbitrap
Ionización	ESI (+/-)	MALDI (+/-)	ESI (+/-)
LC	Separación cromatográfica	Análisis directo (sin extracción ni separación cromatográfica previa)	Separación cromatográfica
Análisis	Cuantitativo/cualitativo <i>Target</i>	Cualitativo <i>Non target</i>	Cuantitativo/cualitativo <i>Non target</i>
	SRM	<i>Full Scan</i> HRMS	<i>Full Scan</i> Ultra-HRMS
Modo de adquisición	MS/MS (información estructural)	MS/MS (información estructural)	<i>All Ion Fragmentation</i> (AIF) (información estructural)
Resolución	Unitaria $\Delta m: 0.7$	20000	100000 ( $m/z$ 200; 1 Hz) <sup>a</sup> 50000 ( $m/z$ 200; 2 Hz) <sup>b</sup>
Exactitud (especificaciones instrumentales)	-	<3ppm Calibración interna	<1ppm Calibración interna
IPs mínimos <sup>c</sup>	5 o 6 (si la señal $[M+2H]^{2+}$ es característica)	7	9 o 11 (si la señal $[M+2H]^{2+}$ es característica)

<sup>a</sup> Resolución máxima de las especificaciones del Exactive.

<sup>b</sup> Resolución especificada en los métodos MS aplicados.

<sup>c</sup> Teniendo en cuenta solo los iones diagnóstico, no todos los iones fragmentos observados en el espectro.

IPs: Puntos de Identificación.



## 2. 8. Conclusiones

- ◆ Se han propuesto métodos rápidos de alto rendimiento para el análisis dirigido de las dos familias de compuestos orgánicos emergentes en estudio en esta tesis, PFAAs y MCs, utilizando SPE en línea con LC-ESI-MS/MS.
- ◆ Se ha propuesto una estrategia integrada de *screening* para la determinación precisa de cianotoxinas y péptidos relacionados en muestras enteras mediante el análisis directo de la biomasa liofilizada y la inyección directa del agua filtrada por MALDI-TOF/TOF y LC-ESI-HRMS, respectivamente.
- ◆ Con los métodos de SPE en línea, HRMS mediante inyección directa y MALDI, se ha mejorado la eficiencia económica del análisis, se ha reducido el tiempo de ejecución, la cantidad de muestra requerida y de disolvente utilizado, dando lugar a una metodología con poca manipulación de la muestra (evitando posibles fuentes externas de contaminación), de fácil uso y automatización (no operador dependiente) y con una sensibilidad adecuada para detectar trazas de cianotoxinas.
- ◆ La caracterización de los compuestos orgánicos en estudio por espectrometría de masas mediante ESI +/-, MALDI +/- y diferentes mecanismos de fragmentación CID (QqQ, TOF/TOF y HCD-Orbitrap) ha permitido la identificación de una serie de especies moleculares e iones fragmentos característicos, proponiéndose como iones diagnóstico de cada familia de compuestos para su identificación y confirmación en muestras.
- ◆ El análisis por MALDI-TOF e ionización simultánea de las MCs, sin separación cromatográfica previa, ha permitido obtener de forma rápida, sencilla y directa la “huella dactilar” de cada muestra y el perfil de las variantes de MC observadas, así como de otros péptidos como las anabaenopeptinas.
- ◆ Se ha optimizado el método de análisis de PFAAs y MCs por SPE en línea al sistema LC-ESI-MS/MS en muestras acuosas. La espectrometría de masas en tándem ha permitido proponer un método altamente sensible (LOQ de 20 ng/L para las MCs y de 0,5-5 ng/L para los PFAAs), de gran selectividad, a la vez que altamente fiable en el análisis cuantitativo, mostrando un amplio intervalo de linealidad entre el LOQ y 500 o 10000 ng/L para los PFAAs y las MCs, respectivamente, y una gran exactitud y precisión, con recuperaciones que han oscilado ente el 79 y el 121% y RSD <26% para todos los analitos.
- ◆ Se ha optimizado el análisis de MCs en el agua y la biomasa filtrada por análisis directo en el sistema LC-ESI-HRMS (Orbitrap-Exactive HCD) y en el MALDI-TOF/TOF, repectivamente. La espectrometría de masas de alta resolución ha permitido proponer un método alternativo para el análisis directo del agua altamente sensible (LOQ de 0,06 o 0,20 µg/L, dependiendo de la variante), de elevada selectividad (número de IPs ≥9), minimizando la probabilidad de falsos positivos y negativos, y

que ha permitido una cuantificación fiable con un amplio intervalo de linealidad (LOQ-110 µg/L) y una repetibilidad y reproducibilidad con RSDs inferiores al 12 y al 27%, respectivamente. La integración de la información proporcionada por las fuentes de ESI y MALDI, los modos de ionización positivo y negativo y la HRMS, AMM y estudios de fragmentación han dado lugar a un enfoque basado en HRMS que ha demostrado ser muy útil para la detección y la confirmación de MCs y péptidos relacionados utilizando un protocolo exhaustivo de confirmación.

- ◆ Se ha puesto de manifiesto la utilidad de trabajar con una resolución y exactitud de masa adecuadas (>20000 y <3 ppm, para  $m/z$  1000) y un enfoque heurístico, estableciendo una serie de criterios restrictivos de confirmación para asegurar la fiabilidad en el establecimiento de las fórmulas empíricas para la identificación y cuantificación mediante HRMS.



**CAPÍTULO 3**

---

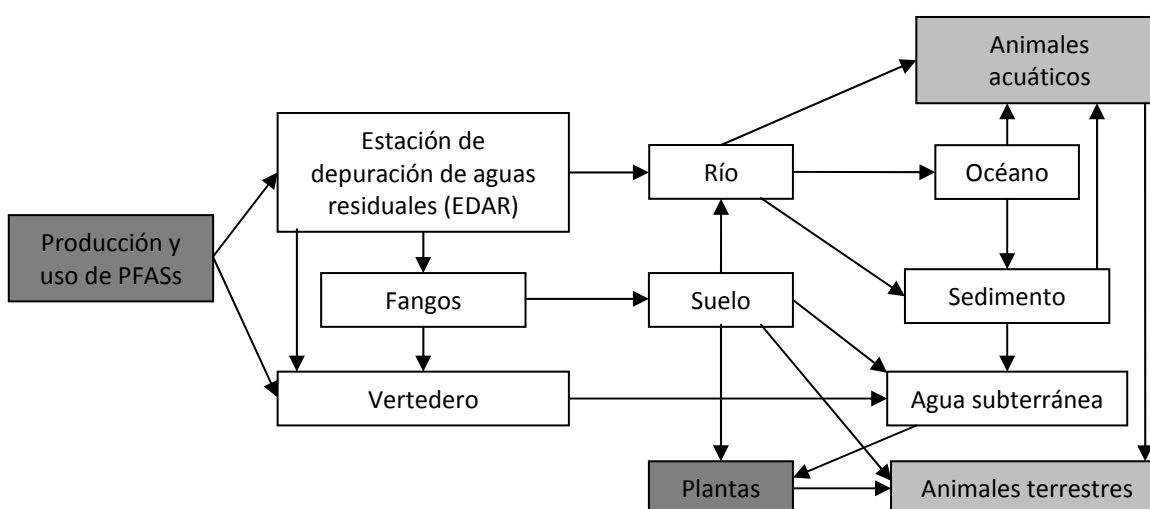
**ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE PFAAs EN AGUAS SUPERFICIALES Y SUBTERRÁNEAS Y SU COMPORTAMIENTO EN DIFERENTES TRATAMIENTOS DE POTABILIZACIÓN**



### 3.1. Introducción

Como se ha mencionado anteriormente en la presente tesis, existen diferentes fuentes de formación y distribución de PFAAs en el medioambiente. Los PFAAs provienen de la producción de productos químicos perfluorados, de la industria de procesamiento de polímeros fluorados, de la utilización o eliminación de productos de consumo como los textiles tratados con PFAAs (vestimentas deportivas y alfombras, por ejemplo), de la utilización de espumas contra incendios, de productos químicos para el hogar y de los productos de degradación o eliminación de los lodos de depuradora (Lindstrom y col., 2011; Post y col., 2012).

El destino global y el mecanismo de transporte de las PFASs han sido ampliamente estudiados, pero hasta la fecha no han sido caracterizados de una forma concluyente. Existen dos principales hipótesis para el transporte global de los compuestos perfluorados. De una parte, los compuestos precursores neutros y volátiles pueden someterse a un transporte atmosférico de largo alcance y ser degradados en regiones remotas (Ellis y col., 2003; Martin y col., 2006; Schenker y col., 2008). Y por otra parte, las PFASs iónicas, pueden ser transportadas directamente principalmente por los ríos hacia el mar y allí por las corrientes oceánicas o por medio del aerosol marino creado por la espuma del mar (Armitage y col., 2009; McMurdo y col., 2008). Estudios modelo identifican a las corrientes oceánicas como mecanismo predominante de transporte a zonas remotas (Armitage y col., 2009; Prevedouros y col., 2006), sin embargo las determinaciones de PFASs en el medio ambiente acuoso son limitadas y es necesario una investigación más rigurosa. El esquema de la *Figura 3.1.* muestra las diferentes posibles vías de transporte de las PFASs en el medio ambiente acuoso y la biota desde su producción y usos (Ahrens, 2011). La vía atmosférica no se ha incluido ya que los compuestos perfluorados volátiles neutros no han sido objeto de estudio de este trabajo.



**Figura 3.1.** Destino ambiental de los PFC en el medio acuoso (adaptada de Ahrens 2011).

Nota: la vía atmosférica no se ha incluido en la figura por no ser objeto de estudio de la presente tesis.

El destino medioambiental de las PFASs está influenciado por sus propiedades físico-químicas que varían en función de su longitud de cadena y su grupo funcional. Debido a la baja presión de vapor y polaridad de los iones, se encuentran principalmente en agua, unidos al particulado, en sedimentos y suelos, o bioacumulados en la cadena trófica. Las PFASs iónicas, como los PFCAs y los PFSAs, son muy persistentes, con una solubilidad en agua elevada y bajos valores de pKa, por lo que se presentan disociados a los pHs típicos del medio ambiente. Por ejemplo, para el PFOS se ha estimado que puede tener 41 años de vida media en agua (USEPA, 2012). Por su parte, las PFASs neutras son menos persistentes que los PFSAs y los PFCAs, y pueden ser transformadas por hidrólisis, fotólisis y biodegradación. Además, tienen una presión de vapor alta y una baja solubilidad en agua comparada con los PFAAs, lo que hace posible un transporte atmosférico de largo alcance para los compuestos perfluorados volátiles neutros. Además el estudio del coeficiente de partición sólido/agua es muy importante para entender el comportamiento de absorción de las PFASs. Por ejemplo, el logaritmo del coeficiente octanol-agua ( $\log K_{oc}$ ) para el PFOS es de  $3,8 \pm 0,1 \text{ cm}^3/\text{g}$  y de  $1,9 \pm 0,1 \text{ cm}^3/\text{g}$  para el PFOA. Así, los PFCAs de cadena corta ( $C < 7$ ) se encuentran exclusivamente en la fase disuelta, mientras que los PFCAs de cadena larga ( $C \geq 7$ ), los PFSAs y la PFOSA aparecen preferiblemente asociados al particulado (Ahrens y col., 2009 y 2010b). Ha de tenerse en cuenta que condiciones como el pH y el contenido de materia orgánica y de metales en los suelos y sedimentos pueden variar la partición sólido/agua, por ejemplo al aumentar el contenido de materia orgánica se observa un aumento de la absorción de los compuestos perfluorados en el suelo. En consecuencia, los PFCAs de cadena corta tienen un alto potencial para el transporte de largo alcance por agua y los PFSAs, EtFOSAA y PFOSA se distribuyen en la biota o en matrices como los suelos y sedimentos. De forma resumida, las PFASs volátiles pueden degradarse y tener un transporte atmosférico, mientras que las PFASs iónicas pueden entrar al medio ambiente acuático directamente.

La composición de los diferentes congéneres detectados en las muestras medioambientales puede proporcionar información sobre las fuentes y los mecanismos de transporte (Ahrens y col., 2011). Por ejemplo, cuando el perfil de PFCA de número de carbonos par es mayor que el de número de carbonos impar, esto suele indicar degradación de sus precursores por transporte atmosférico. La presencia de isómeros ramificados indica que su proceso de producción ha sido mediante cualquiera de los dos procesos, ECF o telomerización (Buck y col., 2011). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los perfiles pueden haber sido alterados debido a las diferentes características existentes entre los isómeros lineales y ramificados (por ejemplo, diferente partición o tasas de consumo/eliminación en biota). Yu y col., (2015) en un trabajo reciente documentan la distribución de siete PFOS isómeros en agua potable en la provincia de Jiangsu, China. Los PFOS lineales fueron los isómeros predominantes en todas las muestras de agua potable, lo que representó el 55,4-68,2% de los PFOS totales. En comparación con la proporción del 30% de isómeros ramificados en los PFOS técnicos, los niveles de PFOS ramificados en el agua potable se incrementaron a 31,8%-44,6% del total de PFOS. Por lo que hubo un enriquecimiento de isómeros ramificados en el agua potable. Los cocientes de riesgo en la evaluación de riesgos de la perturbación hormonal de la tiroides para los PFOS isómeros

individuales, indicaron que los PFOS lineales son los que más contribuyeron al riesgo entre todos los isómeros PFOS en estudio (83,0%-90,2% del total PFOS RQ), y que el riesgo del 6m-PFOS (5,2%-11,9% del RQ del total de PFOS) fue mayor que la de otros isómeros ramificados del PFOS. Se encontró que los riesgos asociados con el PFOS en el agua potable se sobreestiman entre un 10,0% y un 91,7% si no se consideran las contribuciones de los isómeros PFOS individuales. Los resultados revelaron que el perfil de los PFOS isómeros y la toxicidad de los isómeros de PFOS individuales son factores importantes en la evaluación del riesgo para la salud de los PFOS y deben ser considerados en el futuro en las evaluaciones de riesgos.

En concreto los PFAAs, compuestos en estudio, como se ha mencionado, son ambientalmente persistentes (Kissa, 2001) debido a los fuertes enlaces C-F que hacen que sean resistentes a la degradación física y metabólica. Pero contrariamente a otros POPs típicos, su naturaleza iónica, alta solubilidad y presión de vapor insignificante cuando se disuelven en agua los hacen altamente móviles en sistemas acuosos, y por lo tanto estos compuestos pueden ser transferidos por descargas domésticas, comerciales o industriales a las aguas naturales (Sinclair y Kannan, 2006). Hasta el momento, se han detectado en el agua de lluvia y desagües pluviales (Eschauzier y col., 2010;. Kwok y col., 2010; Xiao y col., 2012b), en zonas costeras y en el agua de mar (Ahrens y col., 2010.; Alzaga y Bayona, 2004; Moller y col., 2010; Sánchez-Avila y col., 2010; Yamashita y col., 2004, 2005), en aguas residuales (Alzaga y Bayona, 2004; Xiao y col., 2012a.; Yu y col., 2009a), en aguas superficiales (Eschauzier y col., 2010; Hansen y col., 2002; Loos y col., 2008, 2009; McLachlan y col., 2007; Moller y col., 2010; Pistocchi y Loos, 2009), en aguas subterráneas (Moody y col., 2003;. Plumlee y col., 2008; Schultz y col., 2004) y en el agua del grifo (Ericson y col., 2008, 2009; Eschauzier y col., 2012a; Haug y col., 2010; Lien y col., 2006; Mak y col., 2009; Post y col., 2009; Shivakoti y col., 2010; Skutlarek y col., 2006; Takagi y col., 2008, 2011.; Ullah y col., 2011;. Wilhelm y col., 2010) de todo el mundo. Recientemente se han publicado excelentes trabajos de revisión de la presencia de compuestos químicos polifluorados en el medio acuático (Eschauzier y col., 2012b; Rumsby y col., 2009).

En España, la presencia de PFAAs en el medioambiente acuático fue descrita por primera vez en el año 2004 (Alzaga y Bayona, 2004). La *Tabla 3.1* resume los intervalos de concentración o los niveles medios de concentración de los PFAAs encontrados en la bibliografía para el período 2004-2015 en España. Las concentraciones de compuestos perfluorados en las aguas costeras españolas -hasta 2,25 ng/L para el PFOA y 8,38 ng/L para el PFOS (excluyendo el puerto de Barcelona)-son sustancialmente inferiores a los medidos en algunas otras partes del mundo, como en varias costas asiáticas (So y col., 2004; Yamashita y col., 2005) con valores máximos de 68,6 ng/L para el PFOA en Corea Occidental (Naile y col., 2010) que mostraron un perfil de PFAAs similar (concentración de PFOS > concentración de PFOA). En cambio, los niveles en España fueron más altos que los valores medios (alrededor de 1-2 ng/L para el PFOA y <1 ng/L para el PFOS) encontrados en el Sudeste de Brasil (Quinete y col., 2009) y en el mar del Norte (0,07 ng/L) (Ahrens y col., 2010). En cuanto a aguas residuales, en España la determinación de PFAAs se ha restringido solo a algunos efluentes, todos ellos localizados en el Nordeste del país (Alzaga y Bayona, 2004; Sánchez-Avila y col., 2010; Gómez y col., 2011). Excluyendo los altos valores (100-300 ng/L) medidos en uno de los efluentes (Alzaga y Bayona, 2004), el resto de efluentes



de aguas residuales españolas oscilan entre 0,16 a 61,9 ng/L para el PFOA y desde <0,06 a 72,1 ng/L para el PFOS. Ambos compuestos se han encontrado en el mismo orden o incluso en menor orden que en otros países industrializados como Dinamarca (<2,0-24 ng/L para el PFOA y <1,5-18 ng/L para el PFOS) (Bossi y col., 2008); USA (2,5-97 ng/L para el PFOA y 1,1-130 ng/L para el PFOS) (Schultz y col., 2006); Japón (10-68 ng/L para el PFOA y 42-635 ng/L para el PFOS) (Murakami y col., 2009) o Corea para aguas residuales mixtas de diferentes EDARs (1.100±1.500 ng/L para el PFOA y 110±220 ng/L para el PFOS) (Kim y col., 2012). Llorca y col., (2011) investigaron la presencia de PFAAs en lodos de depuradora de cinco EDARs a lo largo del río Llobregat, encontrando niveles de entre 53,0-121,1 ng/g para el PFOS y de 7,0 a 30,3 ng/g para el PFOA. Por otra parte, la presencia de PFAAs en las aguas superficiales españolas ha sido estudiada predominantemente en los ríos del Nordeste. Estos ríos del Mediterráneo (Llobregat y Besós) son corrientes pequeñas con flujos muy variables que presentaron concentraciones tan altas como 43 ng/L para el PFOA y 275 ng/L de PFOS (Loos y col., 2009). Campo y col., 2015 en un estudio reciente han encontrado intervalos de concentración de PFCAs que varían entre 0,03 ng/L (PFTrDA) y 146 ng/L (PFOA) y de PFSAAs entre 0,01-271x10<sup>3</sup> ng/L (PFOS). La elevada concentración de 271x10<sup>3</sup> ng/L se detectó en el río Anoia y puede ser atribuida a descargas residuales industriales del sector de curtidos y textil. No se detectaron PFHpS, PFNS y PFDS en ninguna de las 14 muestras de agua analizadas. También se analizaron sedimentos y biota. En general, la concentración media de PFAAs medida en sedimentos fue de 0,01-3,67 ng/g y en biota de 0,79-431 µg/kg. Las concentraciones halladas en otros ríos españoles son del orden de las determinadas en ríos del resto del mundo (Loos y col., 2009; Martin y col., 2010; McLachlan y col., 2007; Moller y col., 2010; Quinete y col., 2009; So y col., 2007). En cambio, en aguas superficiales nórdicas se han observado niveles bajos de PFAAs (<0,36 ng/L en Suecia) en comparación con el resto de Europa (ríos Po, Rin, y Sena) (Eschauzier y col., 2012b; McLachlan y col., 2007). Los niveles de concentración medidos en L'Albufera (Picó y col., 2012) para PFOA (hasta 10,90 ng/L) y PFOS (hasta 4,80 ng/L) son sustancialmente bajos, menores por ejemplo a los que se encuentran en los lagos Erie y Ontario (Boulanger y col., 2004). Se han llevado a cabo estudios en agua potable tratada de aguas municipales españolas en diferentes áreas metropolitanas del país (Ericson y col., 2008, 2009; Llorca y col., 2012a, 2012b). No sólo se han medido valores máximos de 57,43 ng/L (PFOA) (Ericson y col., 2009) y 258 ng/L (PFOS) (Llorca y col., 2012a), sino también concentraciones significativas de otros compuestos relevantes, tales el PFBS (hasta 69,43 ng/L) o el PFNA (hasta 58,21 ng/L) (véase la *Tabla 3.1*). Estas concentraciones son bastante más altas que todas las que se recogen en la bibliografía (Boiteux y col., 2012; Eschauzier y col., 2012b; Gellrich y col., 2013; Haug y col., 2010; Loos y col., 2007; Mak y col., 2009; Martin y col., 2010; Puesto y col., 2009; Rumsby y col., 2009; Thompson y col., 2011).

Tabla 3.1. PFCAs en muestras de agua de España (2004-2015). Media o intervalo de concentración expresados en ng/L.

	PFBA	PFPeA	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA	PFUnDA	PFTTrDA	PFHxDA	References
<i>Aguas costeras</i>											
Puerto de Barcelona					<100-340		<20-650				Alzaga y Bayona, 2004
Costa catalana					<0,08-1,86	<0,06-1,35					Sánchez-Avila y col., 2010
Puertos de Cataluña					0,38-2,25	<0,06-1,35					Sánchez-Avila y col., 2010
Puertos del Cantábrico					0,05-0,31	0,04-0,20					Gomez y col., 2011
<i>Aguas residuales (efluentes)</i>											
EDAR (N.E. España)					100-4300		50-8170				Alzaga y Bayona, 2004
EDAR (N.E. España)					<100		<100				Alzaga y Bayona, 2004
EDAR (N.E. España)					3,47-61,90	<0,06-0,84					Sánchez-Avila y col., 2010
EDAR (N. España)					0,16-3,53	0,04-1,40					Gómez y col., 2011
<i>Aguas superficiales (ríos y lagos)</i>											
Río Guadalquivir			6,20	1,58	4,60	1,02					McLachlan y col., 2007
Río Francolí			<0,87	3,38	24,90	0,64	<0,82	<0,43			Ericson y col., 2008
Río Ebro			<0,87; n.d.	0,72; 1	1,90; 2	<0,44; n.d.	<0,82; 1	<0,43; 1			Ericson y col., 2008; Loos y col., 2009
Río Llobregat			17	n.d.	43	15	1	1			Loos y col., 2009
Cuenca río Llobregat	0,07-111	0,08-2,50	0,63-25,2	0,63-30,9	0,07-146	0,77-52,4	0,07-4,25	0,09	0,03-9,75	4,25	Campo y col., 2015
Río Besós			11	8	41	13	6	1			Loos y col., 2009
Río Sar			n.d.	n.d.	6	n.d.	1	n.d.			Loos y col., 2009
Ríos catalanes					0,79-9,63	<0,06-1,62					Sánchez-Avila y col., 2010
<i>Agua potable</i>											
Área de Tarragona			<0,87	<0,61-3,02	0,32-6,28	<0,42-0,52	<0,82	<0,43			Ericson y col., 2008
Cataluña			<0,17-8,55	<0,47-18,40	<0,85-57,43	<0,15-58,21	<0,12-10,00	<0,07-4,23			Ericson y col., 2009
Área de Barcelona			<0,07-10	<0,05-16	<0,1-35	<0,01-22	<0,04-4,7	<0,28-3,8			Llorca y col., 2012a,b
Cuenca río Ebro			<0,07-2,9	<0,05-<0,2	<0,1-0,49	<0,01-0,48	<0,04-3,0	<0,28-2,7			Llorca y col., 2012a,b
Área de Valencia			<0,07-1,7	<0,05-0,55	<0,1-7,6	<0,01-0,70	<0,04-0,72	<0,28-0,72			Llorca y col., 2012a,b
Cuenca río Guadalquivir			<0,2	<0,2	<0,1-2,1	<0,03-1,2	<0,13	<0,9			Llorca y col., 2012a,b

n.d. = no detectado. Acrónimos: PFBA: Perfluorobutanoato; PFPeA: Perfluoropentanoato; PFHxA: Perfluorohexanoato; PFHpA: Perfluoroheptanoato; PFOA: Perfluorooctanoato; PFNA: Perfluorononanoato; PFDA: Perfluorodecanoato; PFUnDA: Perfluoroundecanoato; PFTTrDA: Perfluorotridecanoato; PFHxDA: Perfluorohexadecanoato.

Continuación Tabla 3.1. PFSAs en muestras de agua de España (2004-2015). Media o intervalo de concentración expresados en ng/L.

	PFBS	PFHxS	PFHpS	PFOS	PFNS	PFDS	References
<i>Aguas costeras</i>							
Puerto de Barcelona							Alzaga y Bayona, 2004
Costa catalana	<0,07-0,24	<0,03-0,47		<0,03-3,93			Sánchez-Avila y col., 2010
Puertos de Cataluña	<0,07-0,23	<0,03-2,09		<0,03-8,38			Sánchez-Avila y col., 2010
Puertos del Cantábrico	n.d.-1,25	n.d.-0,19		0,01-6,57			Gomez y col., 2011
<i>Aguas residuales (efluentes)</i>							
EDAR (N.E. España)							Alzaga y Bayona, 2004
EDAR (N.E. España)							Alzaga y Bayona, 2004
EDAR (N.E. España)	<0,07-2,03	<0,03-25,80		<0,03-72,10			Sánchez-Avila y col., 2010
EDAR (N. España)	n.d.-5,08	0,05-0,31		0,09-5,11			Gómez y col., 2011
<i>Aguas superficiales (rios y lagos)</i>							
Río Guadalquivir			6,20				McLachlan y col., 2007
Río Francolí	<0,27	0,78	<0,87	5,88			Ericson y col., 2008
Río Ebro	<0,27	<0,43	<0,87; n.d.	1,59			Ericson y col., 2008; Loos y col., 2009
Río Llobregat			17	254			Loos y col., 2009
Cuenca río Llobregat	0,41-4,10	14,2-33,2	n.d.	0,01-271x10 <sup>3</sup>	n.d.	n.d.	Campo y col., 2015
Río Besós			11	275			Loos y col., 2009
Río Sar			n.d.	6			Loos y col., 2009
Rios catalanes	<0,07-0,88	<0,03-0,64		1,09-9,56			Sánchez-Avila y col., 2010
<i>Agua potable</i>							
Área de Tarragona	<0,27	<0,18-0,28	<0,87	0,39-0,87	<0,42-0,52		Ericson y col., 2008
Cataluña	<0,07-69,43	<0,02-5,30	<0,17-8,55	<0,12-58,12	<0,15-58,21		Ericson y col., 2009
Área de Barcelona	<0,02-36	<0,02-4,4	<0,07-10	<0,005-258	<0,01-22		Llorca y col., 2012a,b
Cuenca río Ebro	<0,02-0,43	<0,02-0,56	<0,07-2,9	<0,005-1,3	<0,01-0,48		Llorca y col., 2012a,b
Área de Valencia	<0,02-2,1	<0,02-28	<0,07-1,7	<0,017-27	<0,01-0,70		Llorca y col., 2012a,b
Cuenca río Guadalquivir	<0,02-<0,1	<0,1	<0,2	<0,017-1,5	<0,03-1,2		Llorca y col., 2012a,b

n.d. = no detectado. Acrónimos: PFBS: Perfluorobutano sulfonato; PFHxS: Perfluorohexano sulfonato; PFHpS: Perfluoroheptano sulfonato; PFOS: Perfluorooctano sulfonato; PFNS: Perfluorononano sulfonato; PFDS: Perfluorodecano sulfonato.

La presencia de PFAAs en aguas superficiales y de grifo indica su incompleta eliminación en plantas de tratamiento de aguas residuales, descargas industriales (por ejemplo de las instalaciones de fabricación o utilización de PFAAs) y procesos de potabilización. De hecho, existen resultados contradictorios sobre la capacidad de los procesos de tratamiento de agua de consumo para eliminar las PFAAs (Rumsby y col., 2009). La presencia y eliminación de estos compuestos en EDARs ha sido ampliamente estudiada, pero solo algunos trabajos se han desarrollado sobre su detección en aguas potables y su comportamiento durante el tratamiento en las ETAPs.

Un reciente trabajo de revisión (Arvaniti y col., 2015) informa de la presencia de 22 PFASs ( $C_4$ - $C_{14}$ ,  $C_{16}$ ,  $C_{18}$  carboxilados;  $C_4$ - $C_8$  y  $C_{10}$  sulfonados; 3 sulfonamidas) en aguas residuales municipales y/o industriales, procedentes de 24 estudios de monitoreo, principalmente de USA, el norte de Europa y Asia. También se han indicado los niveles de PFASs en lodos de depuradora utilizando los datos de 12 estudios. La mayor parte de los datos de seguimiento se han originado en los EE.UU., Europa y Asia del Norte donde ha existido una mayor vigilancia y preocupación sobre el PFOS y el PFOA, mientras que la información disponible en el área mediterránea, Canadá y Australia es limitada. Se han descrito concentraciones de PFASs que llegan hasta algunos cientos de ng/L y algunos miles de ng/g peso seco en el agua residual cruda y en los lodos, respectivamente. Durante los tratamientos convencionales en una EDAR no se ha observado eliminación o una eliminación parcial de las PFASs. Las PFASs no han sido significativamente eliminadas durante el tratamiento biológico secundario, mientras que sus concentraciones en las aguas residuales tratadas han sido a menudo más altas en comparación con las aguas residuales sin tratar. Su biodegradación durante el tratamiento de aguas residuales no parece posible; mientras que algunos estudios recientes han señalado la transformación potencial de compuestos precursores a PFASs durante el tratamiento biológico de aguas residuales. Guerra y col., (2014) investigaron los parámetros que afectan a la formación de PFAAs. Los procesos de tratamiento primario mostraron una formación menor de PFAAs en comparación con los procesos de tratamiento biológico, posiblemente debido a la actividad biológica mínima y a un corto tiempo de retención hidráulico. Una temperatura y HRT superiores ya aumentaron la formación de PFAAs. Por lo que la formación de PFASs debido a la biotransformación de precursores debería seguir siendo estudiada. La adsorción de estos compuestos en el lodo se ha estudiado en profundidad y parece ser un mecanismo importante que regula su eliminación en EDARs. Las PFASs con un elevado número de carbonos tienden a acumularse en el lodo. En cuanto a las tecnologías de tratamiento terciario, se ha observado una significativa eliminación de PFASs usando carbón activado, nanofiltración (NF), ósmosis inversa (RO) o la aplicación avanzada de procesos de oxidación y reducción. La mayoría de estos estudios se han realizado utilizando agua pura, mientras que en muchos casos los experimentos han sido realizados en condiciones de laboratorio extremas (altas concentraciones, fuente de alta radiación, temperatura o presión). Meesters y Schroder (2004) describieron una completa eliminación de PFOS y PFOA a partir de muestras de aguas residuales bajo condiciones anaeróbicas en un biorreactor de circuito cerrado a escala de laboratorio. Sin embargo, la biodegradación no se observó bajo condiciones aeróbicas y el tratamiento biológico en plantas de tratamiento de agua potable operó casi exclusivamente en condiciones aerobias por lo tanto se concluyó que no se crearon las

condiciones favorables para la desfluoración reductora. Además, se ha observado la metabolización microbiana de FTOHs y de productos a base de FTOH, FASAs, FASEs, así como de otros compuestos precursores de PFAAs durante el tratamiento de aguas residuales (en condiciones aeróbicas) y en el medio ambiente (Wang y col., 2005a, b; Rhoads y col., 2008; Martin y col., 2010) que con el tiempo puede conducir a la formación de PFAAs (por ejemplo, PFOS y PFOA). Rahman y col., 2014

Rahman y col., 2014 en un exhaustivo trabajo de revisión describen el comportamiento y destino de las PFASs en los tratamientos de potabilización de agua. En este estudio se resumen los diferentes trabajos encontrados en la literatura que proporcionaron algunos detalles sobre el tratamiento y/o los esquemas de tratamientos que emplean, incluyendo una lista de las PFAAs seleccionadas (PFOA, PFOS, PFHxA, PFHxS, PFBA y PFBS), el tipo de agua de origen, el tratamiento utilizado, los niveles de concentración en el agua cruda y en al agua tratada y el % de eliminación. Otros trabajos de revisión anteriores (Rayne y Forest, 2009; Vecitis y col., 2009; Lutze y col., 2011; Eschauzier y col., 2011) sobre la eliminación de PFASs en agua potable o aguas residuales se centraron principalmente en estudios a escala de laboratorio. Sin embargo, existe un creciente número de publicaciones en la bibliografía actual sobre la eliminación de PFAS en las plantas de tratamiento de agua a escala real (Appleman y col., 2014).

Se espera que la eficiencia del tratamiento para la eliminación de compuestos perfluorados varíe ampliamente entre sus diferentes familias debido a las diferencias en sus propiedades físico-químicas. El flúor es el elemento más electronegativo y como tal se resiste a la oxidación para retener sus electrones. Por lo tanto, la presencia del fuerte enlace C-F junto con la de grupos funcionales como -COOH y -SO<sub>3</sub>H en las estructuras de PFCAs y PFSAs, respectivamente, indica que estos compuestos son resistentes a la oxidación, incluso por el ozono molecular y radicales hidroxilo. Por otra parte, al igual que pasa en el tratamiento de agua residual, el PFOS y el PFOA pueden formarse a partir de la degradación de compuestos precursores como FASAs, FASEs y FTOHs. Estos precursores son compuestos polifluorados que contienen enlaces C-H que si pueden ser oxidados. Por lo tanto, si el ozono u otros procesos de oxidación avanzada (AOPs) fueran capaces de oxidar a estos precursores polifluorados presentes en el agua cruda, la concentración de compuestos como el PFOS o PFOA podría aumentar realmente en el agua tratada. Se necesitan más estudios para resolver esto. De hecho, en algunos trabajos se han detectado concentraciones de PFOA y PFOS en aguas tratadas a niveles más elevados que en las respectivas aguas crudas (Eschauzier y col., 2012; Xiao y col., 2012a). Aunque en parte los errores analíticos a tan bajas concentraciones han podido ser la causa, otras hipótesis que se contemplan como potenciales fuentes de las altas concentraciones en aguas tratadas son, como se ha mencionado anteriormente: la descomposición de compuestos precursores del PFOS y PFOA durante los tratamientos, (Takagi y col., 2008; Shivakoti y col., 2010); pero también, el lixiviado del revestido de teflón de algunos componentes de las instalaciones de las plantas de tratamiento (Tabe et al., 2010), y la desorción de estos contaminantes de los filtros de carbón activado granulado (FGAC) que habían estado en servicio por mucho tiempo sin reactivación (Takagi y col., 2011). En particular, Eschauzier y col., (2012) justifican las concentraciones de PFASs de cadena corta más altas después del tratamiento como resultado de la desorción del filtro de GAC debido

a la competencia para los sitios de sorción activos con PFAAs de cadena más larga o con la NOM del agua. Las evidencias disponibles sugieren que la transformación o la biodegradación de moléculas precursoras se produce por ambas rutas de biodegradación abiótica y biótica (Dinglasan y col., 2004; Ellis y col., 2001; Lange, 2002; Wang y col., 2005a, b).

Las concentraciones en el agua final tratada oscilan entre 0,16 y 263 ng/L (Appleman y col., 2014) son, en la mayoría de las plantas de tratamiento en estudio, similares a los niveles de concentración observados en las respectivas aguas crudas y en aguas superficiales, indicando que la eliminación de PFAAs es mínima después del tratamiento. Por lo que los diferentes estudios centrados en la eliminación de PFAAs durante el tratamiento de agua potable a gran escala indican que debido a sus bajas concentraciones, su alta hidrofiliicidad y su persistencia, los tratamientos convencionales (pre- y post-cloración, coagulación, floculación, sedimentación, irradiación UV, filtración y biodegradación) son incapaces de producir su eliminación de forma sustancial. De hecho, excepto la FGAC, la NF y la RO, las diferentes tecnologías utilizadas en las plantas de tratamiento, incluido la ozonización y los tratamientos de oxidación avanzados, parecen no ser apropiadas para obtener la eliminación significativa de las PFAAs. El cloro libre y residual comúnmente empleados para la desinfección o mantenimiento residual en el sistema de distribución son inefectivos para la eliminación de PFAAs. La irradiación con luz UV a las dosis de desinfección comúnmente utilizados y a las dosis más altas usadas para la eliminación de contaminantes es también ineficaz para la eliminación de PFAAs.

En la bibliografía se han descrito para los filtros de GAC % de eliminación de PFAAs muy variables en función de su estado de saturación. El carbón activado en polvo (PAC) también ha sido estudiado para la eliminación de PFAAs (Qu y col., 2009; Yu y col., 2009a; Hansen y col., 2010; Dudley, 2012), pero sólo a escala de laboratorio. Rahman y col., 2014 Los filtros de GAC necesitan ser reemplazados o regenerados frecuentemente, lo que encarece su utilización y limita en el tiempo su eficiente aplicación. El GAC se regenera a altas temperaturas por encima de 600°C, a estas temperaturas se espera que PFOS y PFOA sean completamente transformados en CO<sub>2</sub> y HF (Fujii y col., 2007). Al observar el comportamiento isómero específico de PFOA y PFOS durante el tratamiento mediante GAC se encontró que los isómeros ramificados son menos absorbibles en el GAC en comparación con los isómeros lineales (Eschauzier y col., 2012). El carbono orgánico disuelto (DOC) tiene una adsorción competitiva y precarga o ensuciamiento (fouling) sobre el GAC (Appleman y col., 2013). Además, los filtros GAC parecen no ser efectivos para los PFAAs hidrofílicos de cadena corta, PFBA y PFBS (Eschauzier y col., 2012b; Wilhelm y col., 2010).

Por su parte las membranas de NF (Appleman y col., 2013; Comerton y col., 2009; Hang y col., 2015; Lipp y col., 2010; Steinle-Darling y col., 2008 and 2010; Tang y col., 2007) y de RO (Lipp y col., 2010; Tang y col., 2006 and 2007) alcanzan un alto rechazo de la mayoría de PFAAs. Sin embargo, PFAAs de menor peso molecular (tales como, PFBA y PFPeA), y el FOSA que es un compuesto neutro puede tener un menor rechazo en algunas membranas de NF. No existen datos disponibles sobre el rechazo de las membranas tras trabajar durante un largo plazo de tiempo y en presencia de

NOM. Además un tema que habrá que abordar es la eliminación del concentrado que contendrá concentraciones elevadas de PFASs.

Por otro lado, las resinas de intercambio iónico o resinas de intercambio no iónico, si bien no comúnmente utilizadas en instalaciones de tratamiento de agua potable, pueden ser útiles para eliminar PFAS (Rahman y col., 2014; Appleman y col., 2014). En concreto, como los PFAAs son aniónicos a los pHs típicos del agua en el medio ambiente es presumible que sean susceptibles a la eliminación por intercambio aniónico. Se necesitan datos adicionales para entender el efecto del tipo de resina y de la matriz agua (competencia con aniones, como  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{NO}_3^-$ , y NOM) en la eliminación de este tipo de compuestos. Además, hay que tener en cuenta que en su aplicación es necesario la regeneración de la resina y la eliminación de la salmuera.

Por último, comentar que existen otros métodos de tratamiento prometedores para la eliminación de PFASs aunque menos comúnmente empleados, como la fotólisis, sonólisis y termólisis (Rayne y Forest, 2009; Vecitis y col., 2009; Lutze y col., 2011; Eschauzier y col., 2011). Recientemente, Schaefer y col., (2015), han demostrado el gran potencial del tratamiento electroquímico en los PFAAs, particularmente en el PFOA y el PFOS, en aguas subterráneas afectadas por espumas anti-incendios en una antigua zona de formación de bomberos y en aguas subterráneas sintéticas fortificadas con PFAAs. Usando una celda electroquímica dividida y un ánodo de  $\text{Ti/RuO}_2$ , se observó la desfluoración tanto del PFOA como del PFOS en una serie de experimentos a escala de laboratorio. Otros PFAAs también fueron tratados electroquímicamente, y los PFAAs de longitud de cadena más corta, en general, fueron más recalcitrantes.

Debido a que las PFAAs son contaminantes ya detectados en nuestro país en diferentes compartimentos acuáticos, el objetivo de este trabajo fue estudiar la presencia de estos compuestos en el río Llobregat (Cataluña, España), que abastece de agua superficial a la ETAP de Barcelona, y su eliminación a lo largo de los diferentes tratamientos durante el proceso de potabilización de esta planta a escala real. El estudio de esta planta, que combina tratamientos convencionales (pre-oxidación, filtración con arena, ozonización, filtración con carbono) y avanzados recientemente actualizados (ultrafiltración, RO), proporciona una mejor comprensión de los procesos de tratamiento de agua y el conocimiento de las técnicas que pueden eliminar los PFAAs de manera más eficiente.

### **3.2. Análisis de aguas superficiales, subterráneas y tratadas**

Las PFASs son contaminantes emergentes que se han detectado en los diferentes compartimentos ambientales. Aunque su presencia y eliminación en tratamientos de aguas residuales ha sido ampliamente estudiada, solo algunos estudios se han dedicado a su detección en el tratamiento y destino del agua potable en ETAPs a escala real. En esta memoria se presentan los resultados del análisis de

PFCAs y PFSAs en agua superficial del río Llobregat, en las diferentes etapas de tratamiento a lo largo de una ETAP (ver su esquema en la *Figura 3.2*) y en las aguas subterráneas implicadas en el proceso de tratamiento de esta ETAP.

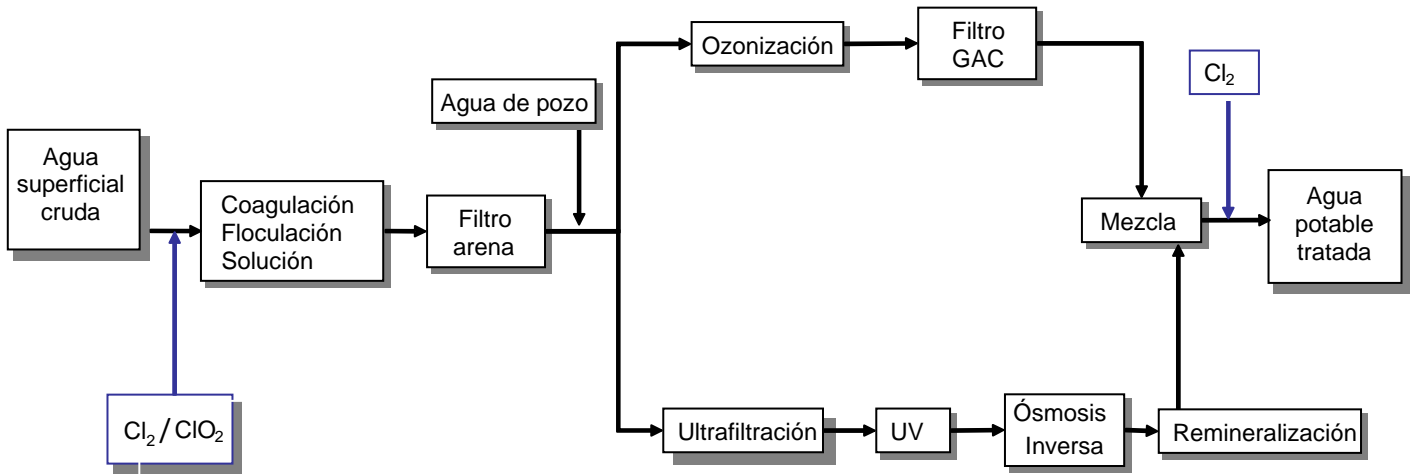


Figura 3.2. Esquema de la ETAP en estudio.

La ETAP en estudio trata alrededor de 4 m<sup>3</sup>/s de agua superficial del río Llobregat que es una de las principales fuentes de suministro de agua del área metropolitana de Barcelona y abastece a más de un millón de habitantes. Este río mediterráneo recibe una importante carga industrial, está expuesto a vertidos y suele presentar caudales de agua muy variables. Por lo tanto, la calidad de sus aguas varía notablemente. En las últimas décadas, el proceso de potabilización de la ETAP investigada ha sido modificado en diversas ocasiones con el objetivo de mejorar la calidad del agua tratada final. Inicialmente (años 2008 y 2009) la ETAP en estudio incluía un proceso global de potabilización convencional (ver *Figura 3.2*) que incluía pre-cloración/dioxiclорación, coagulación, floculación, solución, filtración con filtros de arena, dilución con agua de pozo, ozonización, filtración con GAC y un paso final de post-cloración. El tipo de coagulante utilizado y la dosis de coagulación es PAX-18 a 4 mg/L de aluminio. El caudal de la filtración con arena fue de 3,5 L/(m<sup>2</sup>s) y cada filtro tenía un área de 100 m<sup>2</sup>. La dosis de ozono utilizada fue habitualmente de 3 mg/L (hasta un máximo de 5 mg/L) con un tiempo de contacto medio de 30 minutos. Se utilizaron 1250 toneladas de GAC, distribuidas en 24 filtros. El tipo de GAC utilizado fue: 12 filtros de Chemviron F-400 (densidad 440 kg/m<sup>3</sup>), 2 filtros de Norit ROW 0.8 (densidad 381 kg/m<sup>3</sup>) y 6 filtros Norit 1240 EN (densidad 485 kg/m<sup>3</sup>). Los filtros restantes se utilizan para el carbón que se regenera o simplemente para el mantenimiento de la obra civil. El GAC se regenera antes de que alcance un coeficiente de adsorción de yodo de 450 mg/L. Posteriormente, en el año 2010, se completó el tratamiento con una nueva línea de tratamiento avanzado, que incluía ultrafiltración (UF) seguida de desinfección con UV, RO y remineralización. Esta línea se instaló paralelamente a la línea de tratamiento convencional después del filtro de arena y la dilución con agua de pozo y antes de la ozonización. Aproximadamente el 50% del agua pasa por cada línea en los tratamientos en paralelo. Las frecuencias de



retrolavado empleadas fueron de 50.000 m<sup>3</sup>, aproximadamente una vez cada 2,5 días para el GAC, y 15-20 lavados/día para la UF. Los concentrados de la RO fueron descargados directamente al mar. Finalmente el agua que pasa por estas líneas se mezcla después del filtro GAC y de la RO y la remineralización, respectivamente, y se somete a una post-cloración antes de salir de la planta para asegurar su desinfección en la red de distribución. Esta configuración permite estudiar simultáneamente el comportamiento de los analitos en dos tipos de procesos de tratamiento diferentes: el convencional y el avanzado. El tipo de proceso de tratamiento avanzado a utilizar se seleccionó de entre las configuraciones más efectivas para la eliminación de algunas familias de contaminantes orgánicos emergentes en diferentes escenarios estudiados a escala de planta piloto durante el año 2005.

En una primera fase, el estudio se ha centrado en los dos compuestos más representativos de estas familias de contaminantes orgánicos emergentes, el PFOA y el PFOS, debido a que estos dos compuestos han recibido una mayor atención y hasta el momento son los más comúnmente utilizados, detectados en el medio ambiente e incluidos en las regulaciones internacionales. Como consecuencia de la preocupación y vigilancia a nivel internacional sobre el PFOA y el PFOS, su regulación en cuanto a la reducción de sus emisiones y la limitación en su comercialización y uso, estos compuestos se están aplicando en menor medida y están siendo substituidos por otros representantes de la familia, principalmente de cadena más corta (PFBA, PFHxA, PFHpA, PFNA, PFDA, PFBA, PFBS y PFHxS) que son menos tóxicos y persistentes (Wang y col., 2015). Por ejemplo el PFBS, tiene una vida media mucho más corta (un mes en los seres humanos) y es menos tóxico. En concreto, la sal de potasio de PFBS es más soluble que el PFOS y así permanece en la columna de agua, es menos tóxico para los organismos acuáticos, pero es persistente, aunque no bioacumulable (NICNAS 2005). Así, mientras que las alternativas pueden ser menos bioacumulativas y tóxicas, aún pueden ser persistentes y con una movilidad en el medio ambiente mayor que los homólogos de cadena larga debido a su alta solubilidad en agua y menor absorción en sólidos, implicando un gran potencial de contaminación a nivel global y una creciente exposición a estos compuestos. En consecuencia, son importantes y necesarios los estudios sobre los compuestos alternativos y su destino y comportamiento, junto con su monitorización en el medio ambiente. Por lo que en una segunda etapa se abordó también el estudio de estos PFCAs y PFSAs de cadena corta. Otros compuestos actualmente en uso como substitutivos son los compuestos orgánicos fluorados que contienen fósforo. Estos compuestos no han sido objeto de la presente tesis.

La recogida de las muestras de agua para el análisis de PFASs es crítico porque el método utilizado en la toma de muestra (por ejemplo, las botellas de muestreo, el sistema de entrada al barco, el tipo roseta), el período de muestreo (por ejemplo, muestra al azar o muestra compuesta), el material del recipiente de muestreo (vidrio, polipropileno, acero inoxidable,...) y la profundidad en que se realiza la toma de muestra pueden tener una gran influencia en los resultados. Además, el material polifluorado (por ejemplo, PTFE) y la manipulación incorrecta de la muestra pueden contaminar fácilmente la muestra. La contaminación se puede producir por ejemplo por el material de las botellas para el muestreo, el material del laboratorio, los filtros y los equipos utilizados en el análisis. Es importante asegurar la utilización de materiales que no contengan PFASs. Las muestras se recogieron en botellas de vidrio ámbar pyrex

borosilicato y se almacenan a 4 °C hasta su extracción. Con el objetivo de minimizar la posibilidad de contaminación con PFOA y PFOS de las muestras, se evitaron los materiales de fluoropolímeros.

La metodología analítica utilizada para el análisis de los PFAAs en estudio en las muestras de agua se describe en el *Capítulo 2* de la presente tesis y está resumida en la *Tabla 2.3* (métodos 1 y 2). Se trata de dos metodologías de *target* análisis (SRM) mediante LC-ESI-MS/MS (QqQ). El método 1 se utilizó en el primer estadio para el análisis de PFOA y PFOS por LLE, y el método 2 para el análisis mediante SPE en línea de los 11 PFAAs en estudio (C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> PFCAs y C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub> y C<sub>8</sub> PFASs).

### **3.2.1. Presencia de PFOS y PFOA en aguas superficiales y estudio su comportamiento en una ETAP**

En una primera etapa de este trabajo (años 2002-2005), se realizó un estudio sobre la presencia de PFOA y PFOS a lo largo del curso del río Llobregat para determinar los niveles de estos compuestos en este río. Debido a que se detectó su presencia en algunas de estas aguas superficiales se decidió controlar su nivel en el agua superficial del río Llobregat que entra a la ETAP, es decir en el punto de captación de agua de la ETAP (años 2005-2007). La concentración de PFOS siempre fue sensiblemente superior a la de PFOA de acuerdo con otros trabajos realizados en Francia y USA (Lopez y col., 2015; Schaidler y col., 2014) mientras que otros autores como Loos y col., 2010 encuentran que el PFOA es la PFASs más abundante en 23 países europeos.

En paralelo, se realizaron una serie de experimentos en plantas piloto para introducir tratamientos avanzados en la ETAP con el fin de mejorar la calidad del agua potable tratada final. Se trabajó con cuatro escenarios diferentes centrados principalmente en combinaciones de tratamientos avanzados tales como UF, RO y electrodiálisis reversible (RED) y se controló el comportamiento del PFOA y el PFOS en estas plantas piloto.

A continuación, se estudió la eliminación de PFOA y PFOS en cada etapa individual de la ETAP. Durante el período de 2008 a 2009, la ETAP operaba mediante un tratamiento convencional y desde el año 2010 se incorporó en la planta el nuevo proceso de potabilización, mediante la adición de una línea suplementaria con tratamiento avanzado (UF, desinfección UV, RO y remineralización).

Se han analizado un total de 131 muestras entre los años 2002 y 2012: 32 muestras de agua superficial del río Llobregat; 27 muestras de agua de las diferentes etapas de los estudios de tratamientos avanzados en los cuatro escenarios ensayados a escala de planta piloto (2005-2007); 46 muestras de agua recogidas en las diferentes etapas de los procesos de tratamiento de la ETAP en estudio (2008-2012); y finalmente, 26 muestras de aguas subterráneas involucradas en el proceso de

potabilización (2009-2012). Las muestras de la planta se recogieron teniendo en cuenta el tiempo de retención hidráulico de cada proceso para poder evaluar la eficiencia individual de cada uno. En general la toma de muestra se hizo considerando el carácter de tensioactivo de los analitos.

### **PFOA y PFOS en el Río Llobregat**

Durante los años 2002-2005 se recibieron muestras de agua superficial de diferentes puntos a lo largo del río Llobregat (n=32) para investigar los niveles de los compuestos en estudio en este río que es una de las principales fuentes de abastecimiento de agua del área metropolitana de Barcelona. Los niveles de concentración detectados oscilaron entre <4,2 y 130 ng/L para el PFOA y <1,1 y 11.120 ng/L para el PFOS, respectivamente, pero solo el 10% y 30% de las muestras analizadas presentaron niveles por encima del LOQ. Se observaron siempre elevadas concentraciones de PFOS (860-11.120 ng/L) en la confluencia del río Llobregat con su afluente Anoia y en Abrera. Estos niveles se pueden atribuir a dos puntos con una elevada actividad industrial. Campo y col., (2015) en su trabajo sobre la contaminación por PFSAs en el ecosistema del río Llobregat también detectaron una máxima concentración de PFOS en el río Anoia (271.000 ng/L). Esta contaminación, que no se extendía por el río Llobregat, se justificó principalmente por los vertidos puntuales (industrias de curtidos y textiles) y, aunque el tratamiento en plantas de aguas residuales, también contamina la cuenca, las bajas cargas calculadas sugirieron que la liberación de PFAS de estas instalaciones en los ríos era moderada. El resto de las muestras mostraron niveles de PFOS (<1,1-430 ng/L, con una media de 54 ng/L) en el mismo orden que los medidos en grandes ríos europeos (Eschauzier y col., 2012b; Loos y col., 2009; McLachlan y col., 2007; Moller y col., 2010), lo que confirma la presencia de estos compuestos ubicuos.

A partir del año 2005 se decidió controlar con una cierta periodicidad el punto de captación de agua superficial del río Llobregat que abastece de agua cruda a la ETAP. Las determinaciones realizadas en el período 2005-2007 (n=10), mostraron intervalos de concentración de <4,2 a 1470 ng/L para el PFOA y de <1,1 a 10980 ng/L para el PFOS, atribuibles a una importante actividad industrial en esta área del río Llobregat. Seis de las diez muestras presentaron concentraciones de PFOS mayores de 610 ng/L y solo una muestra tuvo una concentración menor que el LOQ. Sin embargo, la máxima concentración observada para el PFOS de 10980 ng/L fue aún tres veces menor que la concentración máxima permisible (36000 ng/L) establecida recientemente por la Comisión Europea (Directiva 2013/39/UE) para el PFOS y sus derivados en aguas superficiales continentales. Por otra parte, el 50% de las muestras mostraron niveles de PFOA por debajo del LOQ y solo en una muestra se observó una alta concentración (1470 ng/L).

En los siguientes años las concentraciones de PFOS y PFOA en el agua superficial del río Llobregat a la entrada de la ETAP fueron gradualmente disminuyendo (ver *Tabla 3.2*), probablemente como resultado de las reducciones de sus emisiones y su producción debido a las regulaciones implementadas en 2006 (European Commission, 2006) que limitaron la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos (PFOS). Como se muestra en más detalle en la *Tabla 3.2*, las concentraciones variaron de 4,9 a 44 ng/L para PFOA (media  $15\pm 13$  ng/L) y de 20 a 348 ng/L para el PFOS (media  $104\pm 94$  ng/L) durante el último período (2008-2012, n=10).

### ***Comportamiento de PFOA y PFOS en el tratamiento de potabilización***

#### *Tratamientos avanzados (Plantas piloto)*

Como ya se ha mencionado anteriormente en la presente tesis, en el año 2005, se estudió el comportamiento del PFOA y del PFOS, además de otras familias de contaminantes orgánicos emergentes, en diferentes plantas pilotos con diferentes configuraciones de tratamientos avanzados (UF, RO y RED), después de haberse demostrado su presencia en el agua de entrada a la ETAP investigada. Se estudiaron cuatro escenarios diferentes: UF + RED + O<sub>3</sub> + GAC + Cl<sub>2</sub>; SF + RED + O<sub>3</sub> + GAC + Cl<sub>2</sub>; UF + 50%[RO] + 50%[O<sub>3</sub> + GAC + Cl<sub>2</sub>]; and UF + 50%[RED] + 50%[O<sub>3</sub> + GAC + Cl<sub>2</sub>]. Estas plantas piloto incluían siempre alternativamente RO o RED como tratamientos avanzados. En todas las configuraciones la RO resultó más efectiva que la RED para la eliminación de PFOA, PFOS y otros compuestos emergentes en estudio. En los diferentes escenarios la RED alcanzó unos % de eliminación en el intervalo de 57-100 y 26-100 % para el PFOA y el PFOS, respectivamente, dependiendo de la configuración utilizada. Mientras que la eliminación de la RO fue siempre superior al 99% en todos los escenarios ensayados. Por lo tanto, se demostró la alta eficiencia de la RO para la eliminación de estos dos analitos a concentraciones bajas (a nivel de ppt) en procesos de tratamiento de agua potable. Estos resultados concuerdan con la ya demostrada capacidad de las membranas de RO para el tratamiento de efluentes de aguas residuales que contengan PFOS a niveles de concentración de ppm en la bibliografía (Lipp y col., 2010; Tang y col., 2006 and 2007), con eliminaciones del 99-100%.

### *Tratamiento convencional (ETAP)*

La *Figura 3.3* muestra las concentraciones de PFOA y PFOS después de las etapas de tratamiento relevantes en las diferentes campañas muestreadas los años 2008 y 2009, cuatro muestreos en el año 2008 y dos en el 2009, cuando la planta funcionaba únicamente con tratamiento convencional. Los niveles de los analitos fueron siempre más elevados en otoño-invierno que en primavera-verano, con diferencias significativas de las concentraciones a la entrada de la planta (agua cruda). Este comportamiento que se observa para los dos compuestos en estudio es más relevante en el caso del PFOS, para él que los niveles pasan de unos 100 ng/L en otoño-invierno a alrededor de 25 ng/L en primavera-verano.

La *Tabla 3.2* resume los intervalos de concentración de PFOA y PFOS determinados y los % de eliminación resultantes después de las diferentes etapas de la ETAP en estudio. En los años 2008-2012 (n=10) se han obtenido resultados de la planta operando con un tratamiento convencional. De acuerdo con otros trabajos (Eschauzier y col., 2010, 2012a, 2012b; Rumsby y col., 2009; Shivakoti y col., 2010; Takagi y col., 2011), las concentraciones de PFOA y PFOS no variaron en el agua cruda, pre-clorada/dioxiclorada y filtrada con arena (ver eliminaciones en la *Tabla 3.2*).

El siguiente paso consiste en mezclar el agua filtrada con arena con diferentes porcentajes de agua de pozo (~ 0-30 %) para mejorar a-priori la calidad del agua. En el año 2009 se realizó un estudio de las concentraciones de los analitos en las diferentes aguas subterráneas (n=12) utilizadas en este proceso de dilución, encontrando intervalos de concentración de 31-32 ng/L de PFOA y 49-72 ng/L de PFOS, respectivamente. Este nivel de PFOA y PFOS es atribuible a prácticas de infiltración de agua tratada para la recarga de los acuíferos y pone de manifiesto que la dilución con esta agua es una contribución adicional de contaminación de estos analitos en la ETAP.

El tratamiento con ozono es la siguiente etapa en el proceso de potabilización. Como se muestra en la *Tabla 3.2* (ver eliminaciones) no afecta a los compuestos en estudio. En estudios anteriores de experimentos por lotes (Schröder y Meesters, 2005) y en otras plantas de purificación de agua (Shivakoti y col., 2010; Thompson y col., 2011) también se observó la ineficacia del ozono para degradar PFAAs, explicada por los fuertes enlaces C-F de sus estructuras. Además, la ozonización de los precursores de PFOS/PFOA puede provocar un aumento de las concentraciones de PFOS y PFOA, como se ha observado en el tratamiento de aguas residuales, durante el cual las bacterias pueden convertir los precursores a PFOS/PFOA (Xiao y col., 2012a). Teniendo en cuenta que la dosis de ozono utilizada en la ETAP investigada fue de alrededor de 5 mg/L y el tiempo de contacto de 20 minutos, el no aumento de las concentraciones de PFOA y PFOS después de la aplicación de ozono parece indicar ausencia o bajas concentraciones de sus precursores.

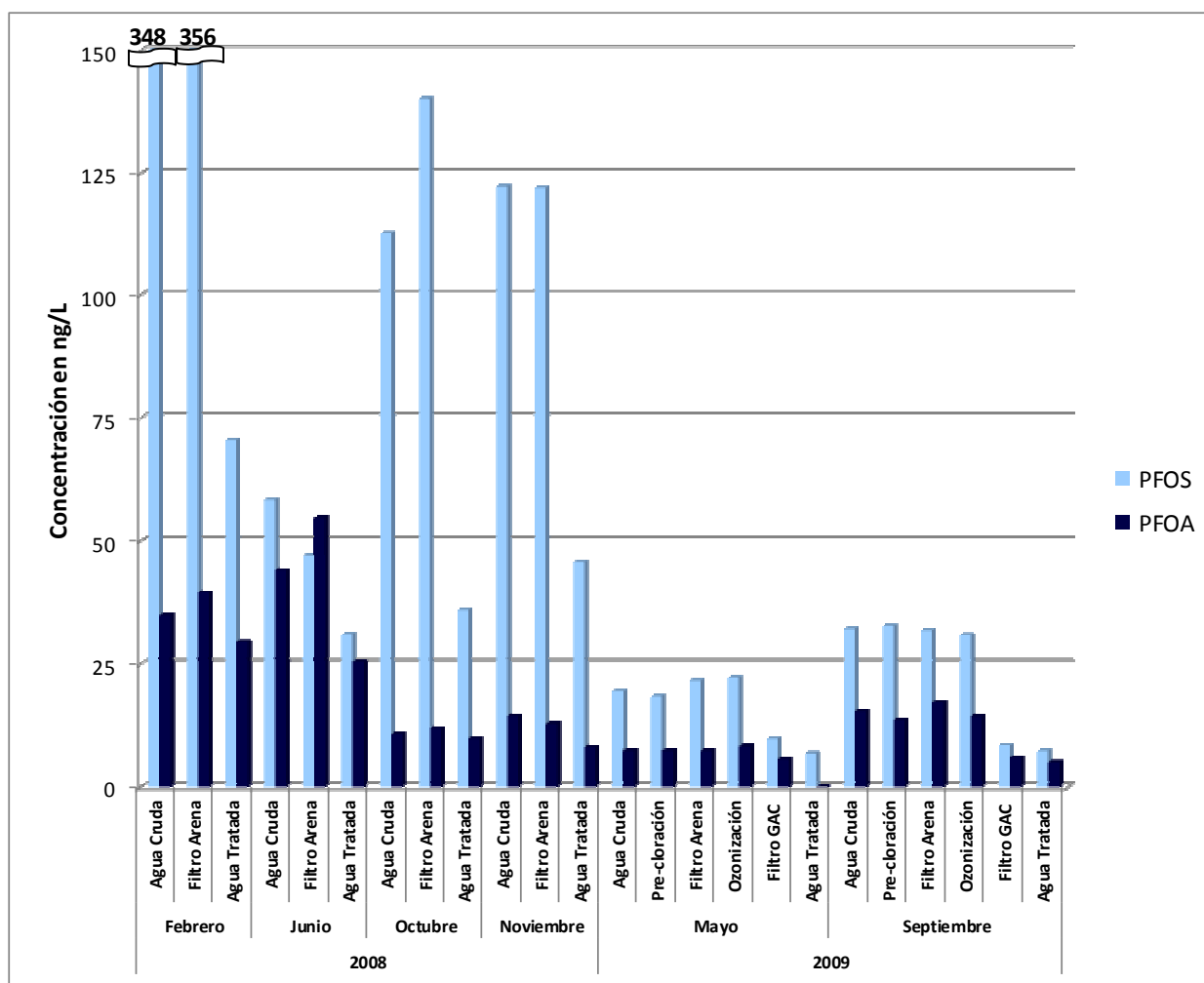


Figura 3.3. Niveles de concentración de PFOS y PFOA (ng/L) en el período 2008-2009 con tratamiento convencional en el proceso de potabilización de la ETAP.

Una vez ozonizada, el agua es filtrada con GAC. Los filtros GAC eliminaron alrededor del  $45 \pm 19\%$  de PFOA y  $64 \pm 11\%$  de PFOS en todas las muestras analizadas (Tabla 3.2). En la bibliografía se describen eliminaciones muy variables de los compuestos perfluorados como resultado de la filtración con GAC. La saturación de los filtros con el tiempo y el coste son los inconvenientes de esta tecnología. Eschauzier y col., (2012a) encuentran eliminaciones del 50% para el PFOA y una completa eliminación para el PFOS después de la filtración con GAC y también observaron el enriquecimiento de los isómeros ramificados de PFOA y PFOS relativos a los isómeros no ramificados durante la filtración GAC. El carbón activado no siempre es un método muy eficiente debido al corto tiempo de vida de adsorción del carbón activado que tiene que ser cambiado con frecuencia, y por lo tanto la eficiencia de la eliminación disminuye con el tiempo, lo que aumenta significativamente los costes de tratamiento. Algunos de los factores más críticos para una eliminación eficaz de contaminantes a través de filtros de GAC son la matriz de agua, el tipo de carbón, la tasa de uso y la carga del GAC. Este último factor ha sido descrito como clave para una eliminación eficaz de ambos compuestos en un estudio realizado en diferentes ETAPs de Japón, en el que recomiendan un uso inferior a un año de los filtros para una mejor eliminación (Takagi y col., 2011).

**Tabla 3.2.** Intervalos de concentración en ng/L y % de eliminación de PFOA y PFOS medidos después de cada etapa del proceso de potabilización de la ETAP en estudio.

Referencia	Tratamiento convencional							Tratamiento convencional y avanzado						
	n	PFOA			PFOS			n	PFOA			PFOS		
		Intervalo de concentración	Media ±SD	% Eliminación	Intervalo de concentración	Media ±SD	% Eliminación		Intervalo de concentración	Media ±SD	% Eliminación	Intervalo de concentración	Media ±SD	% Eliminación
Agua cruda	6	7,4-44	21±15	-	20-348	116±121	-	4	4,9-10	6,9±2,4	-	31-119	86±39	-
Pre-cloración/ Dioxiclорación	2	7,3-14	10±4,5	11±15	19-33	26±10	3±4	1	8,4	-	nc	105	-	nc
Filtro arena	6	7,3-55	24±19	2±4	22-356	120±126	3±8	3	5,1-8,1	6,2±1,7	6±8	97-106	96±9,9	5±4
Agua pozo <sup>a</sup>	2	31-32	32±0,7	-	49-72	61±16	-	2	15-26	21±7,8	-	61-86	74±18	-
Ozonización	2	8,3-14	11±4,3	9±12	22-31	27±6,1	2±2	1	13	-	nc	82	-	nc
Filtro GAC	2	5,7-6,0	5,9±0,2	45±19	8,5-9,9	9,2±0,9	64±11	4	<4,2-7,4	4,7±2,2	41 <sup>c</sup>	8,6-35	22±13	63 <sup>c</sup>
Ultrafiltración	-	-	-	-	-	-	-	1	7,6	-	nc	23	-	nc
Ósmosis inversa	-	-	-	-	-	-	-	4	<4,2	2,1±0	100±0	<1,1-1,3	0,7±0,4	99±1
Agua tratada <sup>b</sup>	6	<4,2-30	13±11	<b>52±31<sup>d</sup></b>	6,9-71	33±24	<b>69±12<sup>d</sup></b>	4	<4,2-5,5	3,0±1,7	<b>89±22<sup>d</sup></b>	3,0-21	13±9,4	<b>86±7<sup>d</sup></b>

Tratamiento convencional (años 2008-2009); tratamiento avanzado (años 2010-2012).

<LOQ se ha considerado como LOQ/2 (2,1 ng/L para el PFOA y 0,5 ng/L para el PFOS) para calcular la media y la desviación estándar.

n: número de muestras; SD: desviación estándar; -: no aplicable; nc: no calculado (n=1).

<sup>a</sup> El agua de pozo (~0-30%) se mezcla con el agua filtrada con arena y se reparte hacia las dos líneas paralelas de tratamiento convencional y avanzado.

<sup>b</sup> El agua tratada es la mezcla del agua que viene de la línea de tratamiento convencional (~50%) con el del agua de la línea de tratamiento avanzado (~50%).

<sup>c</sup> Solo se ha podido calcular un dato de eliminación.

<sup>d</sup> En negrita: % de eliminación global.

En 2011, se purificó un máximo de 65 hm<sup>3</sup> de agua en la ETAP en estudio. Esto corresponde a una carga total máxima de 52 m<sup>3</sup> de H<sub>2</sub>O/kg de GAC para evitar sobrepasar el volumen de ruptura y que los analitos se desorban. En nuestro caso, las concentraciones medidas después de la filtración con GAC son el resultado promedio de los 24 filtros de GAC instalados en la ETAP, que se regeneran aproximadamente secuencialmente una vez al año, debido a la mala calidad de las aguas superficiales de entrada. En este contexto, una justificación que podría explicar la variabilidad en la eliminación de los analitos por este tratamiento sería el diferente grado de regeneración (número de filtros regenerados en uso) cuando se tomaron las muestras. Nuestros resultados concuerdan en general con resultados anteriores, como los obtenidos sobre los mecanismos de eliminación de PFOS y PFOA por coagulación y coagulación mejorada durante el tratamiento de agua potable (Xiao y col., 2013). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el mecanismo primario de eliminación de PFOA y PFOS es la adsorción en el coagulante.

Los valores medios de PFOA y PFOS para el agua potable final en el tratamiento convencional (2008-2009) fueron 13±11 ng/L y 33±24 ng/L, respectivamente. Lo que representa una eficiencia global de eliminación del proceso de potabilización convencional del 52±31 % para el PFOA y del 69±12 % para el PFOS (*Tabla 3.2*). Estos niveles se encuentran entre las concentraciones más altas descritas en diversos países (Mak y col., 2009), muy lejos de los niveles de 1,45 ng/L y 0,20 ng/L de PFOA y PFOS medidos en Noruega (Haug y col., 2010), pero muy cerca de los niveles observados en el agua de grifo de Cataluña (NE España) (Ericson y col., 2009) (ver *Tabla 3.1*).

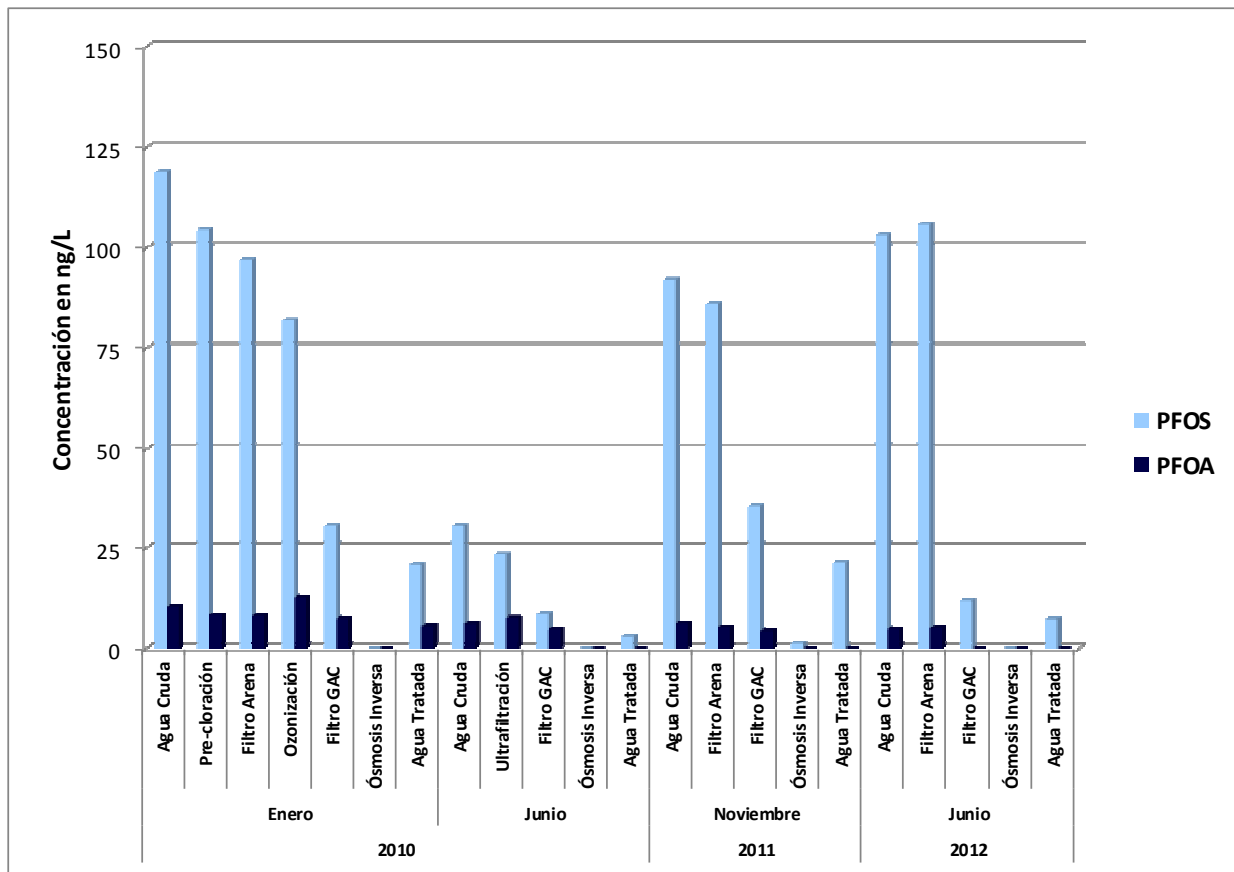
#### *Tratamiento avanzado (ETAP)*

Como ya se ha mencionado anteriormente, como nuevo tratamiento avanzado a partir del año 2010 se incorporó una línea de tratamiento paralela al tratamiento convencional después de la filtración con arena y dilución con agua de pozo y antes de la post-cloración y distribución, incluyendo UF y RO. Esta configuración ofrece la interesante oportunidad de comparar un tratamiento convencional con filtros de GAC como proceso de eliminación efectivo con el tratamiento avanzado en una ETAP a escala real.

Durante el período en estudio en que el tratamiento avanzado estuvo operativo (años 2010-2012), la línea de tratamiento convencional mostró el mismo comportamiento descrito anteriormente con una variación insignificante después de la pre-cloración/dioxicoloración, el filtro de arena y la ozonización (ver eliminaciones en la *Tabla 3.2*). La *Figura 3.4* muestra a modo de diagrama de barras los niveles de concentración y el comportamiento de los analitos en las diferentes etapas del tratamiento convencional y avanzado en las cuatro campañas de muestras analizadas en el período de años 2010-2012 (enero 2010, junio 2010, noviembre 2011 y junio 2012). Las aguas de pozo añadidas y mezcladas con el agua después de los filtros de



arena presentaron niveles de PFOA y PFOS del mismo orden que los años anteriores. En estas aguas subterráneas (n=5) se determinaron niveles de entre 15-26 y 61-86 ng/L para el PFOA y el PFOS, respectivamente. Su detección representa una fuente de PFAAs en las aguas pre-tratadas. En este período el porcentaje de eliminación de los contaminantes en estudio respecto al agua cruda debido a la filtración con GAC fue del 41% y del 63% para el PFOA y el PFOS, respectivamente (ver *Figura 3.4* y *Tabla 3.2*). Los intervalos de concentración determinados del agua pre-tratada después de los filtros de carbón fueron de <4,2–7,4 ng/L (media de  $4,7 \pm 2,2$  ng/L) para el PFOA y 8,6–35 ng/L (media de  $22 \pm 13$  ng/L) para el PFOS. En paralelo, en la línea de tratamiento avanzado, la eliminación de los dos PFAAs fue irrelevante después de la UF y completa ( $\geq 99\%$ ) después de pasar por la membrana de RO, como se muestra en la *Tabla 3.2* A la salida del tratamiento con RO las concentraciones de PFOA fueron inferiores al LOQ (<4,2 ng/L) y las de PFOS oscilaron entre <1,1–1,3 ng/L. De acuerdo con este comportamiento, la eficiencia de la RO para la completa eliminación de PFOA, PFOS y otros PFAAs fue anteriormente demostrada en plantas de regeneración de agua de Australia (Thompson y col., 2011).



**Figura 3.4.** Niveles de concentración de PFOS y PFOA (ng/L) en el período 2010-2012 con tratamiento convencional y avanzado en el proceso de potabilización de la ETAP. Agua tratada: Mezcla del agua tratada de las líneas paralelas (~50% del agua de tratamiento convencional y ~50% del agua del tratamiento avanzado).

El agua tratada final se obtiene por post-cloración del agua combinada entre la filtrada con GAC resultante del tratamiento convencional y la remineralizada del tratamiento avanzado. Por lo tanto, aunque el agua que pasa por la RO no contiene PFOA ni PFOS o niveles muy bajos de PFOS (hasta 1,3 ng/L), al mezclarse con la línea de tratamiento convencional produce un agua final tratada que no está libre de los contaminantes en estudio, especialmente para el PFOS, debido a la contribución de los niveles detectados en el agua filtrada con GAC. Los intervalos de concentración en el agua tratada final de consumo fueron de <4,2-5,5 ng/L de PFOA y de 3,0-21 ng/L de PFOS. Estos niveles fueron sustancialmente inferiores a los medidos con el anterior proceso de potabilización que solo incluía tratamientos convencionales (años 2008-2010) y representan un porcentaje global de eliminación de  $89 \pm 22$  y  $86 \pm 7$  para el PFOA y el PFOS, respectivamente, como se muestra en la *Tabla 3.2*.

El agua de bebida ha sido identificada como una de las rutas de exposición más frecuente en humanos (Skutlarek y col., 2006). Post y col., (2012) han llevado a cabo un excelente artículo de revisión crítico sobre la bibliografía reciente del PFOA como un contaminante emergente en el agua de bebida. Este trabajo ha demostrado que pequeñas concentraciones relativamente de PFOA en el agua de bebida pueden incrementar sustancialmente la exposición en humanos total. Por ejemplo, la exposición continua a 40 ng/L conduciría a una niveles séricos de 4 ng/mL de media, por encima de la población general. Por lo tanto, existe una relación de 100:1 en promedio, entre el aumento de nivel en suero y la concentración en el agua de bebida. En consecuencia, a nivel internacional varios organismos autorizados han publicado valores guías en el agua potable para el PFOA y el PFOS (ver *Tabla 1.* ), basados en efectos sobre la salud humana con valores de acción cautelar diferentes que oscilan desde 40 hasta 9000 ng/L (DWI, 2007; NJDEP, 2007, 2009; Renner y col., 2007; Rumsby y col., 2009; USEPA, 2009b; Wilhelm y col., 2008). España no tiene niveles recomendados de PFAAs en agua potable. Aunque el agua final tratada de consumo presentó niveles de PFOA y PFOS, estos fueron siempre significativamente inferiores a los valores guía internacionales más restrictivos individualmente, 40 ng/L para el PFOA (preliminary health-based guideline value, New Jersey) y 200 ng/L para el PFOS (Provisional Health Advisory, USEPA), respectivamente.

Además, teniendo en cuenta los niveles medios de PFOA que se encontraron en el agua potable tratada de la ETAP en estudio después del tratamiento global convencional (años 2008 y 2009) y avanzado (años 2010-2012) de 13 ng/L y 3 ng/L, respectivamente, la ingesta diaria crónica calculada (CDI) para un adulto de 70 kg de peso corporal suponiendo una ingesta de 2 litros de agua al día todos los días sería de 0,37 ng/kg/día y 0,09 ng/kg/día, respectivamente. A partir de las concentraciones medias de PFOS para las aguas potables tratadas de 33 ng/L (tratamiento convencional) y 13 ng/L (tratamiento avanzado), el CDI para este contaminante sería de 0,94 ng/kg/día y 0,37 ng/kg/día. La dosis oral de referencia provisional (RfD) de PFOA y PFOS se ha establecido en 333 ng/kg/día y 25 ng/kg/día (Gulkowska y col., 2006) y las TDI recomendadas recientemente por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2008) para el PFOA y PFOS son de 1.500 ng/kg/día y 150 ng/kg/día. Por lo tanto, ambos CDIs calculados para el PFOA y el PFOS (con tratamientos únicamente convencionales y convencionales combinados con avanzados) son considerablemente inferiores al RfD y TDI recomendados. Estos datos son comparables

a los presentados en la bibliografía internacional (Ericson y col., 2008; Fromme y col., 2009; Kim y col., 2011). Por ejemplo, Gellrich y col., (2013) encontraron recientemente que la ingesta de PFOA y PFOS a través del consumo de agua podría ser considerada negligible, con un potencial máximo de consumo de 0,21 y 0,17 ng/kg/día, para el PFOA y el PFOS, respectivamente.

### 3.2.2. Análisis de PFAAs de cadena corta en aguas superficiales y subterráneas y estudio de su comportamiento en una ETAP

Debido a la vigilancia a nivel internacional sobre el PFOA y el PFOS y la regulación de ciertas sustancias y preparados peligrosos (sulfonatos de perfluorooctano-PFOS) por la que se han impuesto limitaciones a su comercialización y uso (orden PRE/374/2008 y Directive 2006/122/EC), se están utilizando otros compuestos perfluorados como substitutos de ellos, principalmente de cadena más corta (PFBA, PFHxA, PFHpA, PFNA, PFDA, PFBA, PFBS y PFHxS) que son menos tóxicos y persistentes. Sha et al. (2015) describen en su trabajo diferentes estrategias para sintetizar compuestos alternativos al PFOA y al PFOS no bio-acumulables. Una de ellas consiste en la reducción de la longitud de la cadena perfluorocarbonada. Por ello, en un segundo estudio, se amplió la lista de compuestos en estudio y se actualizó el método de extracción, pasando de una LLE a una SPE en línea. Inicialmente se incorporaron dos PFSAs (PFBS y PFHxS) y cuatro PFCAs (PFPrA, PFBA, PFHxA y PFHpA). Finalmente la metodología se ha optimizado para un total de once PFAAs, incluyendo PFPeA, PFNA y PFDA. Los compuestos seleccionados son los más frecuentemente detectados en otros estudios de la bibliografía (Gellrich et al., 2013; y ver *Tabla 3.1* de los niveles detectados en España hasta el año 2012) y el PFPrA por estar inicialmente incluido en la lista provisional de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión en el ámbito de la política de aguas (Provisional Watch List 2012). Pero finalmente este compuesto ha sido excluido de la lista publicada de forma definitiva (Decisión de Ejecución UE 2015/495). Por otra parte, el PFPrA se ha detectado como una de las PFASs mayoritarias en agua de lluvia (Kowk et al., 2010; Taniyasu et al., 2008) a niveles de alrededor de 10 ng/L y en botellas de HDPE (Rand et al., 2011). Es importante tener en cuenta que las emisiones de los compuestos perfluorados alternativos de cadena corta no se producen únicamente durante el ciclo de vida de estas sustancias, sino que también pueden originarse por transformación de precursores como la cadena lateral de polímeros fluorados, hidrofluorocarbonos y hidrofluoroéteres (Prevedouros et al., 2006; Wang et al., 2015).

Se han analizado un total de 38 muestras entre los años 2013-2015: 20 muestras de agua de las diferentes etapas de los procesos de tratamiento de la ETAP en estudio recogidas en cuatro campañas de muestreo (junio 2013, enero y junio 2014 y enero 2015); y 18 muestras de aguas subterráneas involucradas en el proceso de potabilización (15 de estas muestras se han recogido en dos campañas de muestreo diferentes, noviembre 2013 y junio 2014; y las otras tres se han recogido cada una en

uno de los últimos tres muestreos de la ETAP). Las muestras de la planta se recogieron teniendo en cuenta el tiempo de retención hidráulico de cada proceso para poder evaluar la eficiencia individual de cada uno. En general la toma de muestra se hizo considerando el carácter de tensioactivo de los analitos.

Las *Tablas 3.3* y *3.4* muestran las concentraciones determinadas para todos los analitos en el período 2013-2015 después de cada etapa del proceso de potabilización de la ETAP en estudio con tratamiento convencional y avanzado y en las diferentes aguas subterráneas analizadas, respectivamente. Cabe destacar que prácticamente todas las muestras analizadas (agua cruda, tratada, tratada final y de pozo) presentaron al menos uno de los compuestos en estudio en concentraciones cuantificables. Los resultados marcados en azul son resultados no confirmados. Aunque se observa la señal en el cromatograma, no cumplen los criterios de identificación de acuerdo con la Decisión 2002/657/CE (relación de transiciones y tiempo de retención). En las tablas se ha incluido la relación media entre las dos señales monitorizadas para cada compuesto (transiciones) en los patrones de la recta y la tolerancia permitida entre estas dos señales de acuerdo con la regulación indicada. La relación entre las dos señales osciló entre 1,3 para el PFHxS y 42 para el PFHxA (*Tablas 3.3* y *3.4*). Al aumentar el valor de esta relación se permite una mayor tolerancia, desde un 20% hasta un máximo del 50%. En general para todos los analitos, el nivel de concentración de estas señales en que la relación no ha cumplido la tolerancia permitida es bajo y está comprendido entre 0,6 y 4,7 ng/L, excepto para el PFOS con un intervalo de concentración de 13 a 168 ng/L (ver *Tablas 3.3*, *3.4* y *3.5*). Para este compuesto una de las señales está interferida, posiblemente por la presencia en las muestras de sustancias que como se ha descrito en la bibliografía para los ácidos cólicos (taurodeoxicolato TDCA, TCDCA, TUDCA) en peces, presentan la misma señal 499>80 que el PFOS. En las *Tablas 3.3* y *3.4* también se ha indicado el LOQ del método para cada compuesto, comprendido entre 0,5 y 10 ng/L, según el analito. El nivel de concentración para el PFPrA, compuesto más polar que eluye próximo al frente de elución, se ha estimado debido a su baja recuperación (27%) y al nivel elevado del blanco de método (10 ng/L).

**Tabla 3.3.** Concentraciones en ng/L de los PFAAs en estudio medidas en el período 2013-2015 después de cada etapa del proceso de potabilización de la ETAP en estudio con tratamiento convencional y avanzado. Se incluyen los LOQs, relación entre las dos señales (transiciones) monitorizadas y la tolerancia permitida por la regulación para esta relación.

		CARBOXILADOS								SULFONADOS		
		PFPrA C3-A <sup>a</sup>	PFBA C4-A	PFPeA C5-A	PFHxA C6-A	PFHpA C7-A	PFOA C8-A	PFNA C9-A	PFDA C10-A	PFBS C4-S	PFHxS C6-S	PFOS C8-S
Junio 2013	Agua Cruda	n.a.	n.a.	n.a.	<LOQ	0,7	4,8	n.a.	n.a.	14	<LOQ	46
	Filtro Arena	n.a.	n.a.	n.a.	<LOQ	1,2	5,5	n.a.	n.a.	16	<LOQ	44
	Filtro GAC	n.a.	n.a.	n.a.	<LOQ	0,6	<LOQ	n.a.	n.a.	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	Ósmosis Inversa	n.a.	n.a.	n.a.	<LOQ	<LOQ	<LOQ	n.a.	n.a.	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	Agua Tratada	n.a.	n.a.	n.a.	<LOQ	0,7	<LOQ	n.a.	n.a.	7,0	<LOQ	<LOQ
Enero 2014	Agua Cruda	n.a.	n.a.	<LOQ	<LOQ	4,0	6,0	1,3	1,8	84	<LOQ	96
	Filtro Arena	n.a.	n.a.	<LOQ	1,4	1,2	4,9	2,2	2,4	76	<LOQ	113
	Filtro GAC	n.a.	n.a.	<LOQ	1,3	1,2	3,4	1,8	1,4	48	<LOQ	24
	Ósmosis Inversa	n.a.	n.a.	<LOQ	0,4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	Agua Tratada	n.a.	n.a.	<LOQ	1,4	0,5	1,7	<LOQ	1,0	27	<LOQ	15
	Agua Pozo	n.a.	n.a.	8,2	4,0	4,7	14	8,1	2,6	44	<LOQ	52
Junio 2014	Agua Cruda	48	4,2	<LOQ	3,1	1,5	3,8	<LOQ	5,0	40	1,3	168
	Filtro Arena	24	3,1	<LOQ	0,8	1,3	4,4	<LOQ	5,0	39	<LOQ	106
	Filtro GAC	30	3,3	<LOQ	3,4	1,1	2,0	<LOQ	<LOQ	27	<LOQ	19
	Agua Tratada	28	3,4	<LOQ	1,6	0,7	<LOQ	<LOQ	<LOQ	14	<LOQ	13
	Agua Pozo	52	17	11	9,5	6,8	24	5,7	5,0	43	4,1	65
Enero 2015	Agua Cruda	34	<LOQ	<LOQ	4,5	2,0	6,6	<LOQ	2,9	35	1,1	53
	Filtro Arena	34	7,9	<LOQ	3,9	1,8	3,4	2,1	<LOQ	27	1,4	55
	O <sub>3</sub>	33	7,7	<LOQ	4,3	2,6	7,3	2,2	<LOQ	28	1,0	64
	Filtro GAC	34	6,5	<LOQ	2,8	1,6	1,4	<LOQ	<LOQ	14	<LOQ	17
	Ósmosis Inversa	12	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,7	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOQ
	Agua Tratada	39	<LOQ	<LOQ	2,1	1,2	2,2	<LOQ	<LOQ	12	<LOQ	12
	Agua Pozo	46	11	21	7,8	6,0	19	6,7	3,6	31	2,3	41
LOQ		10	5,0	5,0	1,0	0,5	0,5	0,5	1,0	5,0	1,0	5,0
Relación transiciones		-	-	-	42	6,8	3,8	4,9	7,0	2,4	1,3	1,9
%Tolerancia relación transiciones		-	-	-	50	30	25	25	30	25	20	20

n.a.: no analizado.

LOQ: límite de cuantificación.

<sup>a</sup> PFPrA: Estimación de los niveles de concentración (27% de recuperación, nivel de blanco de 10 ng/L).

Los resultados marcados en azul son resultados no confirmados. Aunque se observa la señal en el cromatograma, no cumplen los criterios de identificación de acuerdo con la Decisión 2002/657/CE (relación de transiciones, tiempos de retención). En la tabla se incluye la tolerancia permitida en la relación entre las dos señales (transiciones) monitorizadas de acuerdo con la regulación indicada.

**Tabla 3.4.** Concentración en ng/L de los PFAAs en estudio en las aguas subterráneas recogidas en el período 2013-2015. Se incluyen el LOQ, la relación entre las dos señales (transiciones) monitorizadas y la tolerancia permitida por la regulación para esta relación. Se han incluido los valores del agua cruda de entrada a la ETAP en cada campaña de muestreo para comparar entre esta agua superficial del río Llobregat y las diferentes aguas subterráneas.

		CARBOXILADOS								SULFONADOS			
		PFPrA C3-A <sup>a</sup>	PFBA C4-A	PFPeA C5-A	PFHxA C6-A	PFHpA C7-A	PFOA C8-A	PFNA C9-A	PFDA C10-A	PFBS C4-S	PFHxS C6-S	PFOS C8-S	
Noviembre 2013	Pozo 1 Entrada	n.a.	n.a.	5,0	2,2	1,2	11	3,3	1,1	37	<LOQ	41	
	Pozo 1 Tratada	n.a.	n.a.	5,9	2,8	1,2	14	4,4	1,0	32	<LOQ	51	
	Pozo 2 Entrada	n.a.	n.a.	11	4,5	2,5	13	4,4	1,4	39	<LOQ	82	
	Pozo 2 Tratada	n.a.	n.a.	9,2	5,1	2,3	16	4,2	2,6	40	<LOQ	77	
	Pozo 5 Tratada	n.a.	n.a.	5,0	3,7	1,8	13	4,6	2,0	36	<LOQ	61	
	Pozo 6 Entrada	n.a.	n.a.	6,1	4,7	1	11	4,5	1,6	45	<LOQ	41	
	Pozo 6 Tratada	n.a.	n.a.	5,0	3,6	0,7	12	5,2	1,5	51	<LOQ	56	
Junio 2014	Pozo 1 Entrada	37	10	7,2	2,3	1,8	10	3,5	5,0	25	1,7	67	
	Pozo 1 Tratada	31	11	5,3	1,1	1,5	13	3,0	5,0	46	1,6	78	
	Pozo 2 Entrada	19	5,7	<LOQ	3,7	3,5	7,4	2,0	5,0	30	1,2	85	
	Pozo 2 Tratada	18	6,2	<LOQ	4,2	3,6	8,2	2,4	5,0	35	1,0	88	
	Pozo 5 Entrada	18	6,1	<LOQ	1,8	2,5	7,8	3,0	5,0	29	1,1	76	
	Pozo 6 Entrada	13	7,1	<LOQ	1,8	2,1	9,2	3,2	5,0	29	2,0	79	
Agua Pozo ETAP	Pozo 6 Tratada	18	11	<LOQ	2,6	2,8	9,0	3,1	5,0	25	1,5	74	
	Enero 2014	15	12	<LOQ	2,7	2,7	10	3,2	5,0	27	1,3	70	
	Junio 2014	44	<LOQ	52	17	11	9,5	6,8	24	5,7	5,0	43	4,1
Agua Cruda	Enero 2015	46	11	21	7,8	6,0	19	6,7	3,6	31	2,3	41	
	Junio 2013	n.a.	n.a.	n.a.	<LOQ	0,7	4,8	n.a.	n.a.	14	<LOQ	46	
	Enero 2014	n.a.	n.a.	<LOQ	<LOQ	4,0	6,0	1,3	1,8	84	<LOQ	96	
	Junio 2014	48	4,2	<LOQ	3,1	1,5	3,8	<LOQ	5,0	40	1,3	168	
	Enero 2015	34	<LOQ	<LOQ	4,5	2,0	6,6	<LOD	2,9	35	1,1	53	
	LOQ	10	5,0	5,0	1,0	0,5	0,5	0,5	1,0	5,0	1,0	5,0	
	Relación transiciones	-	-	-	42	6,8	3,8	4,9	7,0	2,4	1,3	1,9	
	%Tolerancia relación transiciones	-	-	-	50	30	25	25	30	25	20	20	

n.a.: no analizado.

LOQ: límite de cuantificación.

<sup>a</sup> PFPrA: Estimación de los niveles de concentración (27% de recuperación, nivel de blanco de 10 ng/L).

Los resultados marcados en azul son resultados no confirmados. Aunque se observa la señal en el cromatograma, no cumplen los criterios de identificación de acuerdo con la Decisión 2002/657/CE (relación de transiciones, tiempos de retención). Entre paréntesis se indica la tolerancia obtenida en la relación entre las dos señales (transiciones) monitorizadas por compuesto y en la tabla se incluye la tolerancia permitida de acuerdo con la regulación indicada.

### **Comportamiento en el tratamiento convencional y avanzado de potabilización**

La *Tabla 3.5* resume los intervalos de concentración de los PFAAs determinados. Al contabilizar el número de muestras (n) se ha de tener en cuenta los analitos con niveles inferiores a su LOQ para las muestras de la serie de los diferentes tratamientos en la ETAP: el PFHxA en la campaña de muestreo de junio de 2013; y el PFHxS en las muestras de junio de 2013 y enero de 2014. Por último, el PFNA en las muestras de junio de 2014 y el PFPeA de forma general en todas las campañas de muestreo, solo se ha observado en las muestras de pozo, no se ha encontrado en las muestras de la serie de la ETAP. En el agua superficial de entrada a la ETAP los intervalos de concentración oscilaron entre 46-168, 14-84, 34-48, 3,8-6,6 ng/L para el PFOS, PFBS, PFPrA y PFOA, respectivamente (ver *Tablas 3.3 y 3.5*). Para los otros PFAAs investigados las concentraciones fueron para todas las muestras inferiores a 5,0 ng/L. Estos niveles están en el mismo orden de concentración que los medidos en grandes ríos europeos (Eschauzier y col., 2012b; Loos y col., 2009; McLachlan y col., 2007; Moller y col., 2010; Munoz y col., 2015), pero son más elevados que los descritos en la bibliografía para aguas superficiales de ríos y lagos orientales (Liu B. y col., 2015; Liu W-X y col., 2015). El nivel de PFOS es hasta tres órdenes superior al medido en el lago Chaohu. Las concentraciones para el PFOS y el PFOA en el agua cruda se han mantenido en el mismo orden que el período anterior (años 2010-2012, *Tabla 3.2*). En general, de acuerdo con otros autores (Liu W-X. y col., 2015) el PFOA y el PFBA con concentraciones que oscilan entre <0,5-24 ng/L y <5,0-17 ng/L son los PFCAs mayoritarios junto al PFPrA (12-52 ng/L). El PFPeA solo se ha detectado en el agua de pozo a concentraciones de 8,2-21 ng/L, su LOQ es de 5,0 ng/L. Por lo tanto no se ha podido evaluar su comportamiento en los diferentes tratamientos de la ETAP en estudio. En general para todas las muestras, los PFAAs predominantes son el PFOS y el PFBS con niveles que oscilan entre <5,0 y 168 ng/L y <5,0-84 ng/L, respectivamente. El resto de analitos presentaron siempre concentraciones inferiores a 10 ng/L.

**Tabla 3.5.** Intervalos de concentración en ng/L y de % de eliminación de los PFCAs en estudio durante el período 2013-2015 calculados después de cada etapa del proceso de potabilización de la ETAP en estudio con tratamiento convencional y avanzado.

Analito	Referencia	Tratamiento convencional y avanzado (2013-2015)						
		Agua Cruda	Filtro Arena	Agua Pozo <sup>a</sup>	Ozonización	Filtro GAC	Ósmosis Inversa	Agua Tratada <sup>b</sup>
PFPrA	n	2	2	2	1	2	1	2
	Concentración	48; 34	24; 34	52; 46	33	30; 34	12	28; 39
	%Eliminación	-	50; 0	-	0	0; 0	65	42; 0
PFBA	n	2	2	2	1	2	1	2
	Concentración	4,2; <5,0	3,1; 7,9	17; 11	7,7	3,3; 6,5	<5,0	3,4; <5,0
	%Eliminación	-	26; 0	-	0	0;18	100	19;100
PFPeA <sup>c</sup>	n	3	3	3	1	3	2	3
	Concentración	<5,0	<5,0	8,2-21	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0
	%Eliminación	-	-	-	-	-	-	-
PFHxA	n	4	4	3	1	4	3	4
	Concentración	<1,0-4,5	<1,0-3,9	4,0-9,5	4,3	<1,0-3,4	<1,0-0,4	<1,0-2,1
	%Eliminación	-	0-74	-	0	0-38	69; 100	8-53
PFHpA	n	4	4	3	1	4	3	4
	Concentración	0,7-4,0	1,2-1,8	4,7-6,8	2,6	0,6-1,6	<0,5-0,7	0,5-1,2
	%Eliminación	-	0-70	-	0	0-50	73-100	0-88
PFOA	n	4	4	3	1	4	3	4
	Concentración	3,8-6,6	3,4-5,5	14-24	7,3	<0,5-3,4	<0,5	<0,5-2,2
	%Eliminación	-	0-48	-	0	31-100	73-100	67-100
PFNA	n	3	3	3	1	3	2	3
	Concentración	<0,5-1,3	<0,5-2,22	5,7-8,1	2,2	<0,5-1,8	<0,5	<0,5
	%Eliminación	-	0	-	0	18; 100	100	100
PFDA	n	3	3	3	1	3	2	3
	Concentración	1,8-5,0	2,4-5,0	2,6-5,0	<1,0	<1,0-1,4	<1,0	<1,0
	%Eliminación	-	0-100	-	0	42; 100	100	100

n= número de muestras; -: no aplica el cálculo de eliminación. En el tratamiento anterior se eliminó el 100% del compuesto.

% Eliminación calculados cada etapa respecto a la anterior, excepto en el caso de la tratada final (salida planta) en que se calcula respecto al agua de entrada.

<sup>a</sup> Agua de pozo: (~0-30%) se mezcla con el agua filtrada con arena que luego pasa a la división entre las dos líneas paralelas de tratamiento convencional y avanzado.

<sup>b</sup> Agua Tratada: es el agua a la salida de la ETAP, mezcla del agua que proviene del tratamiento convencional (~50%) con el avanzado (~50%).

<sup>c</sup> PFPeA: Los niveles de concentración han sido siempre inferiores al LOQ (5,0 ng/L), excepto en el agua de pozo (8,2-21 ng/L).



**Continuación Tabla 3.5.** Intervalos de concentración en ng/L y de % de eliminación de los PFSAs en estudio durante el período 2013-2015 calculados después de cada etapa del proceso de potabilización de la ETAP en estudio con tratamiento convencional y avanzado.

Tratamiento convencional y avanzado (2013-2015)								
Analito	Referencia	Agua Cruda	Filtro Arena	Agua Pozo <sup>a</sup>	Ozonización	Filtro GAC	Ósmosis Inversa	Agua Tratada <sup>b</sup>
	n	4	4	3	1	4	3	4
PFBS	Concentración	14-84	16-76	31-44	28	<5,0-48	<5,0	7,0-27
	%Eliminación	-	0-23	-	0	32-100	100	50-68
	n	4	4	3	1	4	3	4
PFHxS	Concentración	<1,0-1,3	<1,0-1,4	<1,0-4,1	1,0	<1,0	<1,0	<1,0
	%Eliminación	-	100; 0	-	0	0; 100	100	38; 100
	n	4	4	3	1	4	3	4
PFOS	Concentración	46-168	44-113	41-65	64	<5,0-24	<5,0	<5,0-15
	%Eliminación	-	0-37	-	0	73-100	100	77-100

n= número de muestras.

-: no aplica el cálculo de eliminación. En el tratamiento anterior se eliminó el 100% del compuesto.

<sup>a</sup> Agua de pozo: (~0-30%) se mezcla con el agua filtrada con arena que luego pasa a la división entre las dos líneas paralelas de tratamiento convencional y avanzado.

<sup>b</sup> Agua Tratada: es el agua a la salida de la ETAP, mezcla del agua que proviene del tratamiento convencional (~50%) con el avanzado ( ~50%).

<sup>c</sup> PFPeA: Los niveles de concentración han sido siempre inferiores al LOQ (5,0 ng/L), excepto en el agua de pozo (8,2-21 ng/L).

Se han representado los resultados de las muestras de la planta de tratamiento en las diferentes campañas muestreadas (junio 2013, enero y junio 2014 y enero 2015) en dos diagramas de barras (Figura 3.5, 3.6) donde se observan los perfiles de eliminación en los diferentes tratamientos de la potabilizadora y se ponen de manifiesto los contaminantes mayoritarios: PFOS, PFBS, PFPrA y PFOA, en general, y también PFBA y PFPeA para las aguas subterráneas. En la Figura 3.6 se han obviado los resultados de los analitos mayoritarios (PFOS <5,0-168 ng/L, PFBS <5,0-84 ng/L y PFPrA 12-52 ng/L) por presentar un nivel de concentración mucho mayor. De esta forma, en el segundo diagrama se normalizan las concentraciones para los otros analitos inferiores a 24 ng/L en todas las muestras y se puede apreciar de forma más clara su eliminación en las diferentes etapas de la ETAP. Aunque, como ya he mencionado, los niveles de PFOA y PFOS en las muestras del agua superficial a la entrada de la ETAP (agua cruda) durante este período de tiempo (2013-2015) se mantuvieron en el mismo nivel que el período anterior de los años 2010-2012 (ver Tabla 3.2), en este caso los niveles de PFOA y PFOS, y de todos los analitos en general, no han presentado un comportamiento estacional tan marcado como en el trabajo anterior. No se observaron diferencias significativas entre los niveles de concentración observados para el agua superficial a la entrada de la planta (agua cruda) en otoño-invierno y en primavera-verano (ver Figuras 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6). En cambio, se observaron niveles para el PFOS y el PFBS significativamente más altos durante el año 2014 (enero y junio), 13-168 y <5,0-84 ng/L respectivamente, que en junio del 2013 y enero del 2015, 12-64 y <5,0-35 ng/L (ver Tablas 3.3 y 3.4).

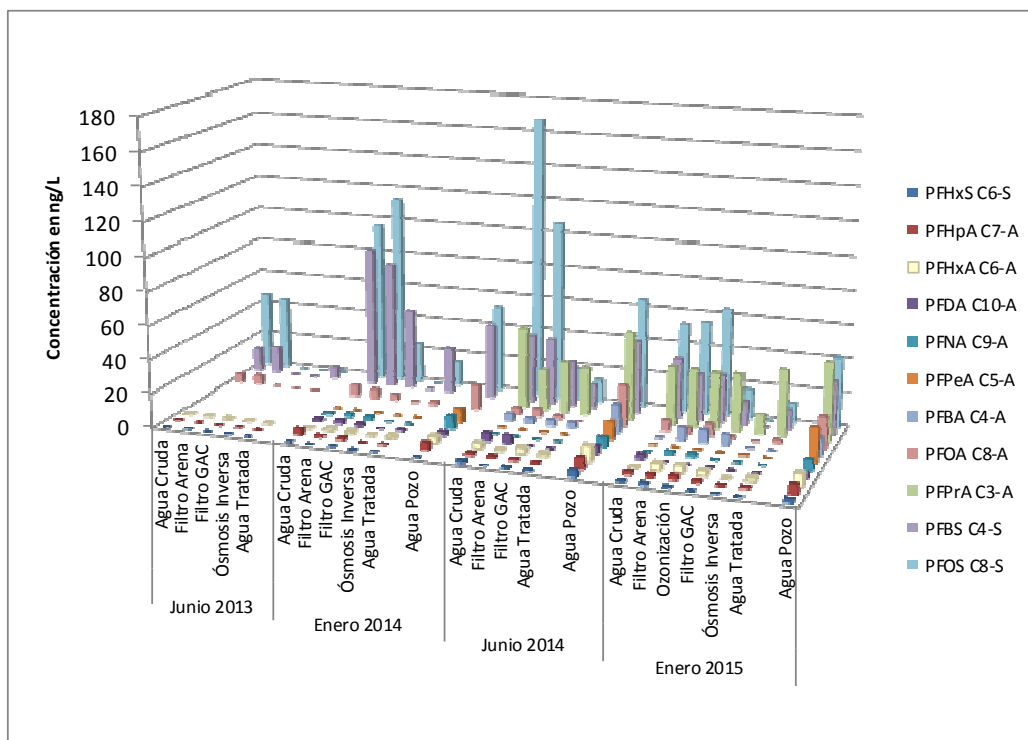
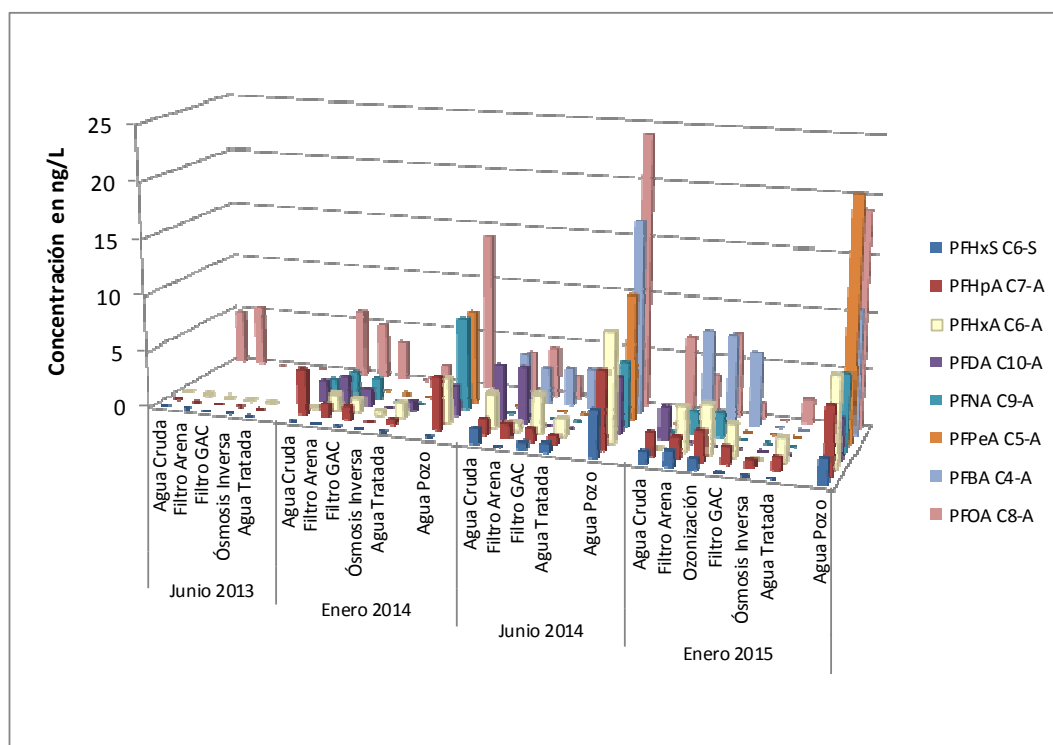


Figura 3.5. Niveles de concentración de los PFAAs en estudio (ng/L) en el período 2013-2015 con tratamiento convencional y avanzado en el proceso de potabilización de la ETAP.



**Figura 3.6.** Niveles de concentración de los PFAAs en estudio (ng/L), exceptuando los compuestos mayoritarios (PFOS, PFBS y PFPrA), en el período 2013-2015 con tratamiento convencional y avanzado en el proceso de potabilización de la ETAP. De esta forma se normalizan los niveles de los otros analitos y se puede apreciar mejor su evolución.

Finalmente se han calculado las eliminaciones obtenidas en cada etapa de tratamiento respecto a la etapa anterior, excepto en el caso de la tratada final (salida planta) en que el cálculo se ha realizado respecto al agua de entrada (*Tablas 3.5 y 3.6*). Si en alguna etapa la eliminación es mayor que en el total es porque en el proceso de tratamiento anterior de la planta ha habido una aportación de estos compuestos por contaminación o por degradación de otros precursores.

Como se muestra en las *Tablas 3.5. y 3.6* y se pone de manifiesto en las *Figuras 3.5 y 3.6*, la pre-cloración/dioxiclорación junto con el filtro de arena de nuevo han provocado una baja eliminación del PFOA y del PFOS (0-48%) y en general han tenido un comportamiento irregular, con eliminaciones muy bajas (<37%) o incluso nulas en la mayoría de las campañas para todos los analitos, excepto algunas eliminaciones puntuales en alguna campaña en concreto del 100% para el PFDA y el PFHxS y próximas al 70% para el PFHxA y el PFHpA.

De igual forma al estudio anterior, la concentración del PFOA y del PFOS se mantiene inalterada frente a la ozonización (ver *Tabla 3.5 y 3.6*). Este comportamiento también se repite para todos los otros análogos en estudio que no se han visto afectados por el ozono. Como ya se ha mencionado anteriormente, el fuerte enlace C-F hace que estos compuestos sean estables frente a los procesos de oxidación.

**Tabla 3.6.** % de eliminaciones para los PFAAs en estudio en el período 2013-2015 calculados después de cada etapa del proceso de potabilización de la ETAP en estudio con tratamiento convencional y avanzado.

Tratamiento	% ELIMINACIÓN, ETAP										
	PFPrA C3-A	PFBA C4-A	PFHxA C6-A	PFHpA C7-A	PFOA C8-A	PFNA C9-A	PFDA C10-A	PFBS C4-S	PFHxS C6-S	PFOS C8-S	
	n	2	2	3	4	4	2	3	4	2	4
<b>Filtro Arena</b>	4	50; 0	26; 0	0; 74; 0	0; 70; 13; 0	0; 18; 0; 48	0; 0	0; 0; 100	0; 10; 2; 23	100; 0	0; 0; 37; 0
<b>Ozonización</b>	1	0	0	0	0	0	0		0	0	0
<b>Filtro GAC</b>	4	0; 0	0; 18	7; 0; 38	50; 0; 15; 38	100; 31; 55; 81	18; 100	42; 100; -	100; 37; 32; 50	0; 100	100; 79; 82; 73
<b>Ósmosis Inversa</b>	3	65	100	69; 100	100; 100; 73	100; 100; 73	100; 100	100; -	100; 100; 100	100	100; 100; 100
<b>Global</b>	4	42; 0	19; 100	8; 48; 53	0; 88; 53; 40	100; 72; 100; 67	100; 100	100; 100; 100	50; 68; 65; 66	38; 100	100; 84; 92; 77

n= número de muestras.

-: no aplica el cálculo de eliminación. En el tratamiento anterior se eliminó el 100% del compuesto.

% Eliminación calculados cada etapa respecto a la anterior, excepto en el caso de la tratada final (salida planta) en que se calcula respecto al agua de entrada.

PFPeA: No incluido en la tabla porque los niveles de concentración han sido siempre inferiores al LOQ (5,0 ng/L), excepto en el agua de pozo (8,2-21 ng/L).

En el primer muestreo (junio 2013) no se analizó: PFPrA, PFBA, PFPeA, PFNA y PFDA.

PFPrA y PFBA solo se cuantificaron en las muestras de junio 2014 y enero 2015 (n=2).

Junio 2013: PFHxA y PFHxS <LOQ.

Enero 2014: PFHxS <LOQ o no detectado.

Junio 2014: PFNA solo en Pozos.

En el muestreo de junio 2014 no recibimos muestra después del tratamiento de ósmosis inversa (n=3).

Solo se recibió muestra tratada con ozono en el muestreo de 2015 (n=1).

Finalmente, los tratamientos que han demostrado una alta eficacia de eliminación para el PFOA y el PFOS son la filtración con GAC (31-100% y 73-100%, respectivamente) y la RO (73-100% y 100% de eliminación en todos los casos, respectivamente). En cambio, el filtro GAC ha presentado bajas eliminaciones <50% para compuestos con un número <C<sub>7</sub> y para el PFNA (C<sub>9</sub>) en la campaña de muestreo de enero del 2014 (18%). En general, en la campaña de muestras de enero 2014 se observa una baja eliminación para todos los PFAAs (<42%), excepto para el PFOS (79%) indicando que el carbón posiblemente no estaba en condiciones óptimas de uso. Como se ha mencionado en la introducción, los filtros de GAC necesitan ser reemplazados o regenerados frecuentemente, lo que encarece su utilización y limita en el tiempo su eficiente aplicación. Por lo tanto, la utilización de filtros GAC en aplicaciones destinadas específicamente a PFASs debe ser cuidadosamente diseñada y optimizada para reducir la frecuencia de activado del carbón en la regeneración. Por su parte, la RO elimina de forma eficaz todos los PFAAs en estudio, especialmente los carboxilados de cadena larga (>C<sub>8</sub>) y los sulfonados, con un % de eliminación global medio de 94±13%. Es necesario obtener más datos para el PFPrA ya que el tratamiento con RO parece ser no tan adecuado (65%, n=1) y no existen estudios previos del comportamiento de este compuesto ante procesos de tratamiento de agua potable. En general el PFPrA ha presentado una eliminación baja (<65%, 19±30%) en todos los tratamientos investigados (filtro de arena, ozonización, filtro GAC y RO) con unas eliminaciones globales del 42 y el 0%.

El comportamiento de los PFAAs en los diferentes tratamientos estudiados está de acuerdo con otros autores (Appleman y col., 2014) que describen a los tratamientos convencionales a escala real como la coagulación, los procesos de separación física, y oxidación química, aeración y desinfección, como incapaces de eliminar PFASs, y a los tratamientos como el GAC, la RO y las resinas de intercambio iónico como tratamientos eficaces para la eliminación de estos compuestos. Aunque la eficiencia del GAC se reduce en presencia de NOM y es necesaria una reactivación frecuente del carbón. Además se ha demostrado que las PFASs de cadena larga se absorben mejor en el GAC que las de cadena corta. PFASs como el PFBA y e PFBS pueden pasar fácilmente a través del carbón o provocar muy rápidamente que se sobrepase el volumen de ruptura. En general, en otros trabajos el GAC y las resinas de intercambio iónico han presentado una menor efectividad para reducir las PFASs de cadena corta, mientras que la RO ha sido efectiva incluso para la PFAS más pequeña estudiada, PFBA.

El proceso de tratamiento global (agua tratada) ha sido muy eficaz para la eliminación de los PFAAs de cadena larga (≥C<sub>8</sub>) con eliminaciones siempre mayores del 72% y en muchos casos del 100% (de media 92±12). Para el PFBA y el PFHxS, únicamente tenemos dos datos con valores muy variables, 19 y 100% y 38 y 100 %, respectivamente, por lo que sería interesante continuar con este estudio y analizar un mayor número de muestras. Para los otros compuestos, las eliminaciones han sido en una media del 49±29%. En concreto para el PFOA (85±18) y el PFOS (88±10), las eliminaciones en el agua tratada han sido del mismo orden que las observadas en el estudio anterior cuando la ETAP operaba con tratamiento convencional y avanzado, período 2010-2012 (89±22 y 86±7, para el PFOA y PFOS, respectivamente) (ver *Tabla 3.2*).

Por último, indicar que tomando como referencia los niveles guía individuales más restrictivos, es decir, 40 ng/L (preliminary health-based guideline value, New Jersey) y 200 ng/L (Provisional Health Advisory, USEPA) para el PFOA y PFOS, respectivamente, todas las muestras de agua potable tratada tienen niveles de estos contaminantes un orden de magnitud por debajo de estos valores y no suponen un riesgo inmediato para la salud de los consumidores. De hecho, las aguas tratadas de las muestras analizadas están libres de PFPeA (que ya no se ha detectado en ninguna de las aguas superficiales de entrada a la ETAP en estudio), PFHxS y PFNA. Los niveles presentes de PFBA, PFHxA, PFOA, PFHpA y PFDA han sido entre <LOQ y 3,4 ng/L. Y los compuestos mayoritarios presentes en las aguas tratadas son: PFPrA ( $33,5 \pm 7,8$  ng/L); PFBS ( $15 \pm 8,5$  ng/L); y PFOS ( $10 \pm 6,8$  ng/L). Para el PFPrA, compuesto mayoritario en el agua tratada, no existe un nivel guía ni datos sobre su concentración en muestras de agua para el consumo humano y su concentración se aproxima al nivel más restrictivo para el PFOA, por lo que sería conveniente ampliar su estudio con un mayor número de muestras y seguir su monitorización y comportamiento en los tratamientos de potabilización. La concentración total de PFAAs en las aguas tratadas ha oscilado entre 7,7 y 69 ng/L coincidiendo con los niveles detectados para agua de bebida en el área urbana de la cuenca de Lambro, Italia (2-61 ng/L) (Castiglioni y col., 2014). En el área agrícola de esta cuenca no se han detectado PFAAs y en el área industrializada los niveles han variado entre 16 y 137 ng/L. En otro estudio a nivel europeo (Gellrich y col., 2013) para diferentes aguas destinadas al consumo humano (agua mineral envasada, agua de manantial, agua no tratada utilizada en la preparación de agua mineral y agua de grifo) el nivel máximo encontrado fue de 13,3 y 12,1 ng/L de PFBS y PFHxS para el agua mineral envasada y de grifo, respectivamente. El PFPrA no se incluyó en este trabajo.

### ***Aguas de pozo/subterráneas***

Por último, se analizó el agua subterránea involucrada en el proceso de la ETAP. Li y col., 2014 en su trabajo establecen un sistema de clasificación global para identificar los compuestos orgánicos de prioridad en aguas subterráneas y de recarga de acuíferos utilizando agua recuperada en China en base a tres criterios: la aparición de estos contaminantes en el agua regenerada o en efluentes de las EDARs de China, la exposición potencial y el impacto ecológico. De esta forma escogen 151 contaminantes orgánicos (disruptores endocrinos químicos, fármacos y antibióticos, PFASs, productos de cuidado personal, hidrocarburos aromáticos policíclicos y plaguicidas). De ellos el 11% corresponden a PFASs, siendo el cuarto grupo en porcentaje de contribución respecto al número total de OCs investigados. El PFOA fue la PFASs de más alta prioridad, seguida del PFHxA y PFHpA. En nuestro estudio, se han analizado muestras de los pozos 1, 2, 5, 6, antes y después de un tratamiento de extracción (*stripping*) y cloración y muestras del agua de pozos de mezcla con el agua después del filtro de arena en un proceso de dilución añadida en la ETAP en las diferentes campañas en estudio de esta planta.

En la *Tabla 3.4* se muestran los resultados para estas aguas de pozo, indicando también los valores del agua cruda de entrada a la ETAP en cada campaña de muestreo para comparar los niveles de concentración y perfiles de PFAAs entre esta agua superficial del río Llobregat y las diferentes aguas subterráneas. En las *Figuras 3.7 y 3.8* se muestran los resultados en forma de diagramas de barras.

Como se esperaba, el proceso de *stripping* y cloración no tiene ningún efecto y no reduce los niveles de PFAAs en las diferentes aguas subterráneas de los pozos 1, 2, 5 y 6. Los PFAAs mayoritarios son el PFOS (41-88 ng/L) y el PFBS (25-46 ng/L) como PFSA y el PFPrA (15-52 ng/L), el PFOA (7,4-24 ng/L), el PFPeA (<5,0-21 ng/L) y el PFBA (10-17 ng/L) como PFCAs. Los otros compuestos se han cuantificado a concentraciones inferiores a 9,5 ng/L.

Las concentraciones medias de las PFASs detectadas son del orden a las de otros autores en aguas subterráneas europeas (Eschauzier et al., 2010; Loos y col., 2010; Lopez y col., 2015) y en Tokyo (Kuroda y col., 2014), salvo algunas muestras puntuales que en este trabajo presentaron altos niveles (1800, 990 y 620 ng/L de PFOA, PFOS y PFNA, respectivamente). Estos estudios mostraron que, si bien los niveles de PFAAs en las aguas subterráneas, en general, no eran alarmantes, las concentraciones en las aguas subterráneas afectadas por actividades antropogénicas (por ejemplo, los efluentes de EDAR o industrias) estaban cerca de los niveles que podrían producir efectos adversos sobre la salud humana y el medio ambiente. En cambio, otros autores encuentran concentraciones más elevadas por impacto de la actividad antropogénica (efluentes de EDARs e instalaciones relacionadas con el PFOA) (Plumlee y col., 2008; Post y col., 2009) o incluso niveles extremadamente altos ( $\mu\text{g/L}$  y hasta  $\text{mg/L}$ ) se han encontrado en áreas de entrenamiento anti-incendio con espumas acuosas formadoras de films (Houtz y col., 2013; Moody y Field, 1999; Schultz y col., 2004; Weiß y col., 2012).

En cuanto a los perfiles son algo distintos, por ejemplo Lopez y col., 2015, describen unos niveles elevados (1-1000 ng/L) de PFAAs de  $C_6$  (PFHxA y PFHxS especialmente, que es el PFAAs mayoritario junto al PFOS) pero no estudiaron los PFAAs de cadena corta ( $C_3$ - $C_5$ ). Boone y col., (2004), también encuentran como PFASs mayoritarias al PFHxS (16,2-254 ng/L de media) y al PFHxA (31-125 ng/L de media) en agua de pozos, en este caso junto con el PFOA, que es el compuesto más detectado, y PFOS, PFPeA, PFBS, PFHpA, PFBA y PFNA en orden decreciente, con concentraciones totales medias de PFSA similares a nuestros resultados (156,8 y 111,8 ng/L en pozos 1 y 2), pero con niveles de PFAAs sensiblemente superiores (siempre > 200 ng/L). En nuestras muestras los PFAAs de  $C_6$  son minoritarios (<1,0-9,5 ng/L). Cabe destacar que el PFPeA como se ha mencionado anteriormente, solo se ha detectado en el agua subterránea y no en el agua superficial de entrada a la ETAP ni consecuentemente en ninguna agua tratada. Gellrich y col., (2013), encuentran que el PFPeA es el compuesto mayoritario en varios tipos de aguas destinadas al consumo humano (50% de la concentración total de los PFAAs estudiados en aguas no tratadas y 35% en agua mineral y de manatial). En un estudio de *screening* de contaminantes regulados y emergentes en agua subterránea en 494 puntos de Francia los PFASs se cuantificaron en más del 10% de las muestras analizadas (Lopez y col., 2015). Se detectaron nueve PFASs (PFOS, PFHxS, PFOA, PFHxA, PFHpA, PFDS, PFNA, PFDA, PFOSA, PFDoA) en estas

muestras de agua subterránea por encima del LOQ con una frecuencia de cuantificación mayor al 1%. Los PFASs de cadena más corta (C<sub>3,4,5</sub>) no fueron objeto de este trabajo. Al igual que en nuestro estudio el PFOS fue el más frecuentemente cuantificado (>20%).

Como se observa en la *Figura 3.8* todas las muestras de pozo muestran el mismo perfil en cuanto a tipo de PFAAs detectado y a nivel de concentración de ellos, teniendo en cuenta que algunos de los PFAAs no se analizaron en todas las muestras por no tener aún a punto la metodología. Si comparamos con las muestras de agua superficial (*Figuras 3.8 y 3.9*) a la entrada de la ETAP en cada campaña de muestreo el perfil de analitos y su nivel de concentración es similar, excepto para el PFBA, PFPeA y PFNA, en que los valores en el agua cruda son sensiblemente inferiores. De hecho el PFPeA, como hemos indicado, únicamente se detecta en el agua subterránea.

En concreto, para el PFOA y PFOS los niveles de concentración en el agua subterránea investigada desde el año 2008 se han mantenido prácticamente en el mismo orden, con una ligera disminución de los niveles de PFOA desde los años 2008 y 2009 (31-32 ng/L, ver *Tabla 3.2*) a partir del año 2010 hasta el último muestreo (7,4-26 ng/L) en concordancia con otros autores (Xiao y col., 2015) que sugieren que no hubo ningún cambio o un cambio limitado en el origen o la magnitud de la fuente de PFOA y PFOS. Además esta concordancia en los niveles y perfiles de los PFAAs determinados en todas las muestras de agua subterránea en las diferentes campañas indicarían una contaminación crónica y/o persistente por ellos, y posiblemente una adsorción de equilibrio en el subsuelo (Kuroda y col., 2014). Por lo tanto, se debe tener un especial cuidado si las aguas subterráneas se han de utilizar directamente para beber, la jardinería o el regadío y si son dispersadas en ríos.



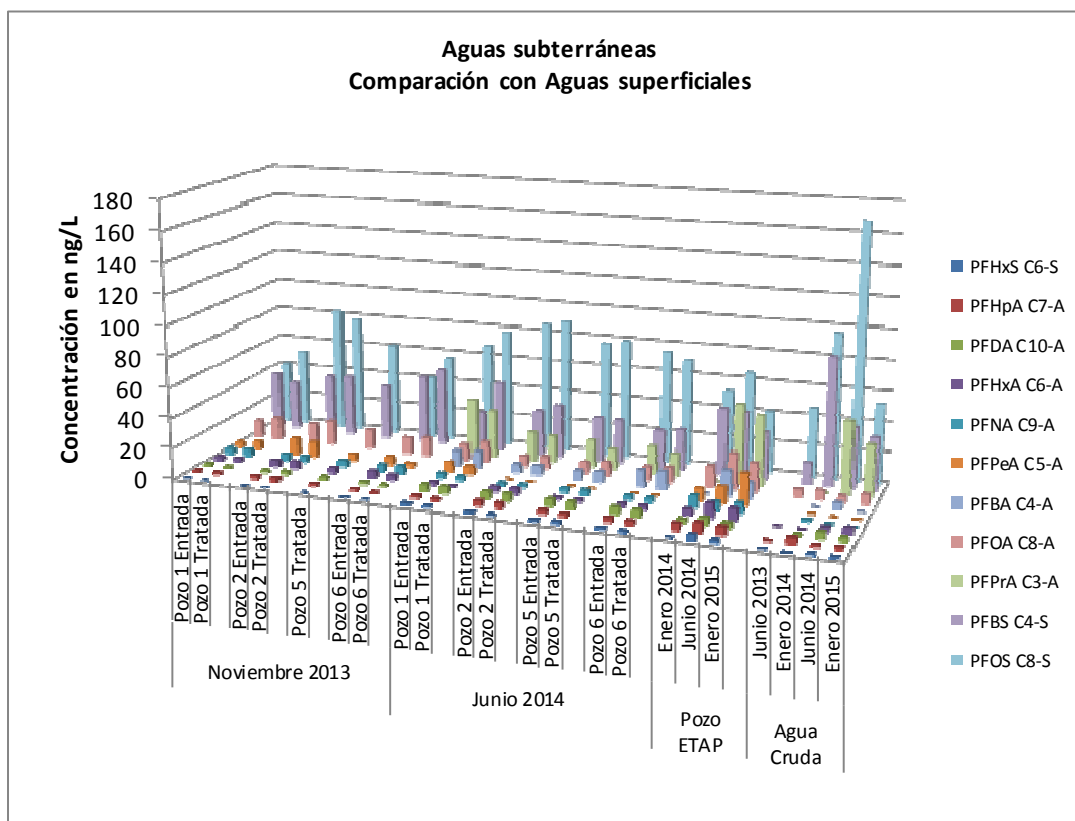


Figura 3.7. Niveles de concentración de los PFAAs en estudio (ng/L) en las aguas subterráneas y en el agua superficial de entrada a la ETAP (agua cruda) en el período 2013-2015.

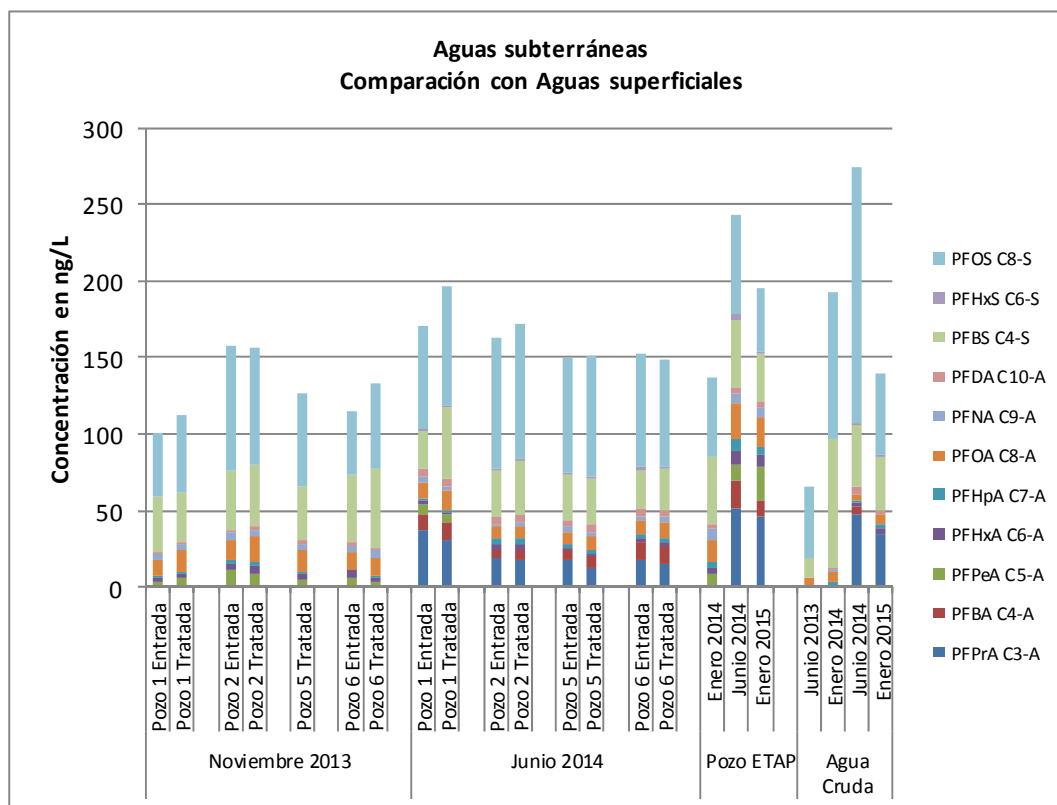


Figura 3.8. Perfiles de los PFAAs en estudio (ng/L) en las aguas subterráneas y en el agua superficial de entrada a la ETAP (agua cruda) en el período 2013-2015.

### **PFAAs en las aguas superficiales, de pozo y tratadas**

De forma general, como se muestra en la *Figura 3.9*, como promedio en las muestras de agua superficial de entrada a la ETAP (agua cruda), de las aguas de pozo y del agua tratada, más del 75% del total de la concentración (suma de todos los PFAAs en estudio) corresponde al PFOS, PFBS y PFPrA, con una proporción importante de PFOS en las aguas de entrada (superficial y subterránea) y de PFPrA en el agua a la salida de la ETAP. De hecho los PFASs son mayoritarios (> 60%) frente a los PFCAs en las aguas superficiales y de pozo, invirtiéndose este perfil en el agua tratada. Después del tratamiento en la ETAP investigada, mientras que el PFOS se reduce de forma considerable con una eliminación siempre superior al 77%, la muestra se enriquece proporcionalmente en los PFAAs de cadena más corta (C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>) que no son eliminados de forma tan eficaz. Estos resultados están de acuerdo con los de otros autores como y col., (2015) que en un estudio de carácter nacional en 133 ríos y lagos de toda Francia encuentran al PFOS como el PFASs predominante en promedio de entre los 22 PFASs investigados. En cambio, por ejemplo, varios sitios a lo largo del río Ródano muestran una peculiar huella de PFAS, en la que los PFCAs a menudo dominan el perfil de PFAS, probablemente como consecuencia de la descarga de fuentes puntuales industriales. También el PFBS, PFOS y PFOA son PFAAs abundantes en ríos del delta del río Pearl, en la China meridional (Liu B. y col., 2015). Pero en este aspecto contrastan con el trabajo de Gellrich y col., (2013), en el que no encuentran al PFOS como un PFAAs mayoritario pero que si observan una contribución importante de los PFAAs de cadena corta (C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>) en las aguas investigadas (aguas minerales, no tratadas utilizadas para preparar agua mineral, de manantial y de grifo), aunque no incluyen en su estudio al PFPrA. En este trabajo, el PFPeA también es un compuesto mayoritario en las aguas de manantial, minerales y no tratadas como en las aguas subterráneas estudiadas en la presente tesis. En algunos estudios (Guo y col., 2015; Munoz y col., 2015), el PFOS predomina en los sedimentos.

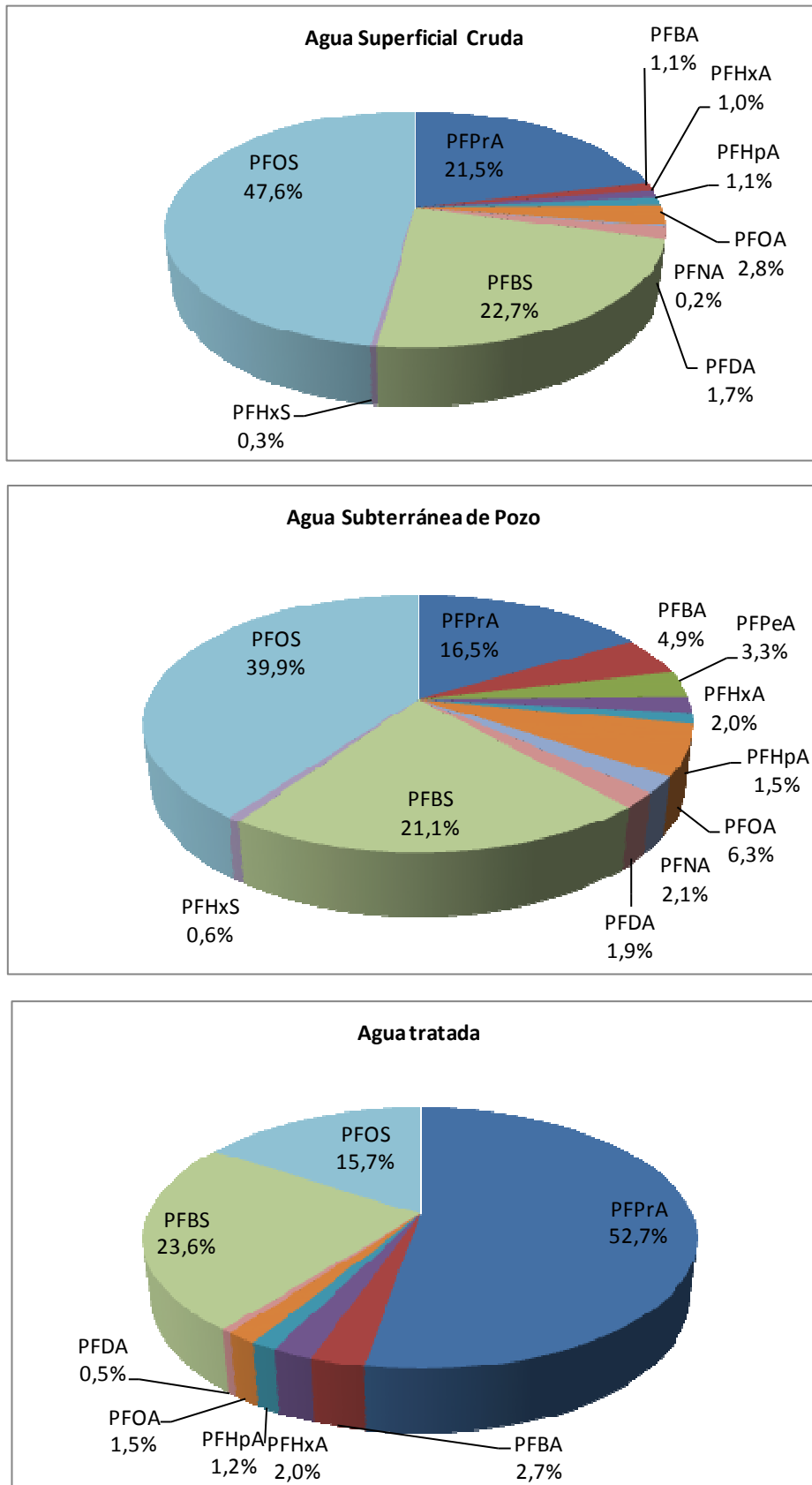


Figura 3.9. Porcentaje (promedio de todas las muestras) de los PFAAs individuales en tres tipos de aguas: superficial (entrada de la ETAP), subterránea (pozo) y tratada (salida de la ETAP).

### 3.3. Conclusiones

- ◆ Se ha investigado la presencia de PFAAs (8 PFCAs y 3 PFSA) en muestras de agua superficial, subterránea y en las muestras de agua tratada después de las diferentes etapas de potabilización de una ETAP en el período 2002-2015. En el agua superficial se han observado intervalos de concentración para el PFOA y el PFOS elevados durante los primeros años (2002-2007), atribuibles a una importante actividad industrial en esta área del río Llobregat. Estos niveles han presentado una tendencia a la baja en el período de años posterior (2008-2015), probablemente como resultado de las reducciones de sus emisiones y su producción debido a la vigilancia y a las regulaciones implementadas en 2006 (European Commission, 2006) que limitan la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos (PFOS). Cabe destacar que prácticamente todas las muestras analizadas (agua cruda, tratada, tratada final y de pozo) han presentado al menos uno de los compuestos en estudio en concentraciones cuantificables. Los PFAAs observados con mayor frecuencia y en un nivel de concentración más elevado han sido: PFOS (<5,0-168 ng/L) > PFBS (<5,0-84 ng/L) > PFPrA (12-52 ng/L) > PFOA (<0,5-24 ng/L) > PFBA (<5,0-17 ng/L). El PFPeA se ha detectado en concentraciones significativas (<5,0-21 ng/L) pero solo en el agua subterránea.
- ◆ Se ha estudiado la eficiencia de diferentes procesos de potabilización convencionales y avanzados para eliminar los PFAAs en diferentes configuraciones a escala de planta piloto y a escala real en una ETAP que combina ambos tipos de tratamientos en líneas paralelas. El proceso global (agua tratada) ha sido muy eficaz para la eliminación de los PFAAs de cadena larga ( $\geq C_8$ ) con eliminaciones siempre mayores del 72% y en muchos casos del 100% (de media  $92 \pm 12$ ). Para el PFBA y el PFHxS, tenemos valores muy variables, 19 y 100% y 38 y 100 %, respectivamente, por lo que sería interesante continuar con este estudio y analizar un mayor número de muestras. Para los otros compuestos, las eliminaciones han sido en una media del  $49 \pm 29\%$ .
- ◆ En general, en la ETAP investigada, los tratamientos que han resultado efectivos para la eliminación de los PFAAs en estudio a bajas concentraciones (niveles de ppt) han sido la filtración con GAC y la RO. Por su parte, los tratamientos convencionales como la pre-oxidación, sedimentación, filtración con arena y ozonización han tenido un impacto irrelevante. La RO ha eliminado de forma eficaz todos los PFAAs, especialmente los carboxilados de cadena larga ( $>C_8$ ) y los sulfonados, con un % de eliminación global medio de  $94 \pm 13\%$ . La filtración con GAC con un promedio de eficiencia de eliminación del  $51 \pm 25\%$  y del  $70 \pm 12\%$  para el PFOA y el PFOS, respectivamente, ha presentado un comportamiento variable en función de su estado de saturación, con eliminaciones  $<50\%$  para compuestos con un número  $<C_7$  y para el PFNA ( $C_9$ ) en una de las dos campañas de muestreo. Por lo que se ha constatado que la utilización de filtros GAC en aplicaciones destinadas específicamente a PFASs debe ser cuidadosamente diseñada y optimizada para reducir la frecuencia de activado del carbón en la regeneración. El remplazado o regeneración encarece su utilización y limita en el tiempo su eficiente aplicación.

- ◆ De los tratamientos avanzados en las diferentes configuraciones de las plantas pilotos ensayadas, la RO ha demostrado ser más efectiva que la RED para eliminar al PFOA y al PFOS.
- ◆ En las diferentes aguas subterráneas de los pozos, se ha constatado que el proceso de *stripping* y cloración no ha tenido ningún efecto y no ha reducido los niveles de PFAAs. Se ha observado que la incorporación de esta agua subterránea en el proceso de tratamiento de potabilización representa una fuente constante de PFAAs en el agua pre-tratada.
- ◆ Con el tratamiento avanzado, los niveles de PFOS y PFOA en el agua tratada han disminuido de forma significativa. No obstante, no se ha obtenido agua tratada completamente libre de PFAAs. Por lo tanto minimizar sus niveles en las aguas superficiales de entrada a las ETAPs, evitando los vertidos o contribuyendo a la mejora de los tratamientos de aguas residuales es esencial. Sin embargo, los valores máximos encontrados en el agua tratada incluso solo con el tratamiento convencional han sido considerablemente menores que los niveles guía individuales más restrictivos, y hasta un orden de magnitud menor, combinando la tecnología convencional y avanzada, y ambos CDIs han sido considerablemente inferiores a los valores provisionales y recomendados de RfD y TDI para ellos. Por lo tanto, no han de suponer un riesgo inmediato para la salud de los consumidores.

ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE MICROCISTINAS EN AGUAS SUPERFICIALES Y TRATADAS



#### 4.1. Introducción

La gestión de las floraciones de cianobacterias en el agua superficial es una tarea compleja que tiene por objeto prevenir, controlar y tratar este fenómeno para evitar problemas en la calidad del agua y consecuencias medio ambientales, estéticas y económicas, así como el riesgo y los problemas de salud humana asociados con estas toxinas. La OMS recomendó en el año 1998 un nivel guía de 1 µg/L para el total de MC-LR (libre y unida a la célula) en agua (OMS, 1998). En consecuencia, como ya se ha comentado en el *Capítulo 1* varias autoridades del agua y los organismos de salud de diferentes países han desarrollado niveles de alerta para las cianobacterias y valores umbral de algunas toxinas en el agua de consumo humano y las aguas de baño, que permitan proteger a los consumidores. En particular, las autoridades españolas han incluido a las cianobacterias en su legislación, en el real decreto 140/2003 por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano acordando un nivel máximo de 1 µg/L para la MC a cumplir a partir del 1 de enero de 2004 (RD 140/2003) y a analizar cuando la eutrofización sea evidente en la fuente de agua, e incluyeron tres niveles de probabilidad para la proliferación de cianobacterias en las masas de agua utilizadas para la recreación en el real decreto 1341/2007 sobre la gestión de la calidad de las aguas de baño (RD 1341/2007). Para alcanzar estos objetivos se pueden aplicar diferentes estrategias, pero cada emplazamiento ha de ser considerado cuidadosamente para seleccionar el enfoque más adecuado. Realizar el control y seguimiento de la presencia de cianotoxinas en los embalses es muy importante para conocer la situación de cada emplazamiento. En este sentido, diferentes organismos tienen establecidos diagramas de flujo para la gestión de las cianobacterias en el agua y protocolos de actuación, como por ejemplo en Australia y Canadá (Chorus y Bartram, 1999; Health Canada, 2002; Newcombe, 2012 NHMRC/NRMMC, 2004; Newcombe y col., 2010). La herramienta más importante para la reducción de la formación de floraciones es un conocimiento limnológico y una comprensión ecológica de qué especies están presentes y sus necesidades de crecimiento (Cirés y Quesada, 2011). La primera actuación debe ser a nivel de prevención con la disminución del aporte de nutrientes y evitando la eutrofización o al menos reduciendo el estatus trófico. Esto se ha conseguido con la mejora de los tratamientos de aguas residuales, el incremento del número de EDARs y el progreso en las prácticas de la agricultura, con especial énfasis en el uso de fertilizantes. Además existen diversas técnicas para controlar el reciclaje de nutrientes, como son la aireación, el dragado de sedimentos o su inactivación (generalmente mediante el uso de sulfato de aluminio) y la dosificación con sulfato de aluminio para unir P y que sea limitante para el crecimiento de cianobacterias. Por último, un control visual del emplazamiento es importante para establecer un plan adecuado para la toma de muestra y decidir los puntos y la frecuencia de muestreo.

Como ya hemos indicado anteriormente en la presente tesis, en las últimas décadas las cianotoxinas se han convertido en un grave problema a nivel global. La aparición masiva de cianobacterias ha dado lugar a la detección de cianotoxinas, y en



concreto MCs, en aguas eutrofizadas de todo el mundo, como se muestra en la *Tabla 4.1*. Diversos trabajos han compilado y revisado algunas concentraciones ambientales de cianotoxinas (Sivonen y Jones, 1999; Falconer y Humpage, 2006; Van Apeldoorn y col., 2007; Messineo y col., 2009; Corbel y col., 2014).

Como se muestra en la *Tabla 4.1*, las cianobacterias potencialmente tóxicas más comunes en Europa y a nivel mundial son las de género *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Anabaena* y *Planktothrix* (Carrasco y col., 2006; Cook y col., 2004; Fastner y col., 1999; Sivonen y col., 1990), siendo descrita la especie *Microcystis aeruginosa* como la productora más importante de MCs en la región Mediterránea (Carrasco y col., 2006; Cook y col., 2004). Esto contrasta con el centro de Europa donde las especies *Planktothrix* han sido al menos tan productoras de cianotoxinas como las *Microcystis*: *Planktothrix* en Alemania ha dominado en el 12,7 % de las muestras tóxicas (Fastner y col., 1999); y este género es dominante en el lago Zurich de Suiza (Kurmayer y Juttner, 1999) y en el norte de Europa, donde *Anabaena spp.* también es muy importante y tóxica (Sivonen y col., 1992). De forma general, en más del 70% de las muestras analizadas de afloramientos de cianobacterias potencialmente tóxicas han aparecido cianotoxinas (Cook y col., 2004; Fastner y col., 1999; Henriksen y Moestrup, 1997; Kotak y col., 1995; Vasconcelos, 1994; y Vezie y col., 1998). Este hecho implica que cuando las cianobacterias dominan la comunidad de fitoplancton, hay una probabilidad elevada de tener un episodio tóxico. La frecuencia de blooms tóxicos en Europa representa un escenario preocupante e indica un problema generalizado que debe ser considerado prioritario en relación con la calidad del agua superficial utilizada para abastecimiento y recreo (Carrasco y col., 2006).

En la *Tabla 4.1* se ofrece también una visión general de las variantes y concentraciones de MCs determinadas en los diferentes países. La identificación y las concentraciones de las diferentes variantes de MC han sido determinadas por diferentes métodos (ELISA, PPIA, LC, FAB-MS, MALDI-TOF, LC-MS, LC-MS/MS análisis de aminoácidos y molecular). Aunque, en ocasiones se han utilizado métodos inespecíficos que cuantifican un total de toxicidad o MC como el ELISA (Bradt y Villena, 2002; Caetano y col., 2001; De Leon y Yunes, 2001; Gkelis y Zaoutsos, 2014; Ueno y col., 1996; Vasconcelos y Pereira, 2001; y, Vieira y col., 2005) y no se han identificado las variantes individuales, en general, las MCs detectadas en las muestras han sido las variantes hidrofílicas MC-LR, MC-RR y MC-YR. La MC que ha sido identificada como la más tóxica, la MC-LR, es una de las cianotoxinas más comúnmente observada en floraciones naturales, constituyendo de forma general entre el 23 y 94% de la concentración total de MCs. Otras MCs que también se han encontrado en aguas son las MC-AA, -AR, -dmLR, -dmRR, -dmYR, -FR, -HiLR, -HtyR, -LA, -LF, -LY, -LV, -LW, -mLR, -WR y -YA.

Como ya se ha explicado en el *Capítulo 1*, las cianotoxinas son toxinas intracelulares contenidas dentro de las células vivas, dependiendo de la naturaleza de la toxina y la etapa de crecimiento, que no se excretan de forma continua y que se liberan en el agua, para formar la toxina disuelta, durante la senescencia celular o cuando se produce la muerte celular o la lisis a través, por ejemplo, de procesos de tratamiento de agua tales como la aplicación alguicida. Por lo tanto, los diferentes

trabajos encontrados en la literatura científica, han determinado las MCs en una de las dos fracciones, intra- o extracelular, en ambas fracciones y en muchos de ellos se publican los perfiles de los niveles totales de toxina (intra- más extracelular) después de la lisis de las células de cianobacterias, como se indica en la *Tabla 4.1*. Además la concentración de MC intracelular se ha expresado en algunos trabajos por g de alga y en otros por litro de agua filtrada.

Por otro lado, las concentraciones pueden variar, dependiendo de la edad de las floraciones y las condiciones y nutrientes. Park y col. (1998) demostraron que como los porcentajes relativamente altos de MCs en la fracción extracelular del agua del lago se producían al final del período de vida de las floraciones, durante el período de descomposición de las células *Microcystis* es plausible esperar que se produzca la liberación de MCs de las células al agua.

Además, los diferentes resultados de los trabajos están influenciados por la estrategia seleccionada para realizar el muestreo y el estado trófico de las masas de agua durante el estudio. Los niveles totales (intracelular más disuelto) de cianotoxinas más altos se han encontrado en natas y espumas de *blooms*. Pero los diferentes estudios se han realizado en ocasiones en presencia de *blooms* y en otros casos sin presencia aparente de algas. En zonas templadas, los *blooms* de cianobacterias son más prominentes durante el final del verano y el principio del otoño y pueden durar de 2 a 4 meses. En zonas con climas más Mediterráneos (templado, invierno húmedo y cálido, verano seco) o subtropical, la estación para las floraciones puede comenzar antes y persistir más tiempo.

Todo ello hace difícil comparar los resultados obtenidos de diferentes localizaciones. Por ejemplo, las concentraciones totales de MC en aguas superficiales varían desde niveles traza, no detectado en el estudio de Conti y col., (2005) en el embalse de San Roque (Argentina), hasta varios miligramos por litro (36500 y 23718 µg/L) en Nueva Zelanda (Wood y col., 2006b) y Sud Africa (Oberholster y col., 2009a), respectivamente, siendo fuertemente influenciadas por la presencia de biomasa de cianobacterias en forma de espumas o natas. Aunque se han detectado niveles mucho más altos de hasta 29000 mg/L en el estudio de Miller y col., (2010) en un “super-bloom” observado en el Lago Pinto (*Tabla 4.1*). Cabe señalar, no obstante, que esta concentración tan alta de cianotoxinas corresponden a muestras de espumas o de biomasa muy densa de cianobacterias.

Al igual que a nivel total (agua y biomasa), las concentraciones en la fracción intracelular suelen ser elevadas, puesto que es dentro de la célula donde se producen las MCs, y han oscilado entre niveles no detectados, inferiores al LOD o al LOQ (Kotak y col., 1995; Krienitz y col., 2013; Maatouk y col., 2002; Park y col., 1998b; Sobrino y col., 2004; y, Ueno y col., 1996) y 11410 µg/L (Frank, 2002) determinados por HPLC como la suma total de MCs en la espuma de una estanque de peces en Alemania. Otros países donde se han detectado concentraciones elevadas (superiores a 400 µg/L) son Marruecos (Oudra y col., 2001; 2002), Portugal (Vasconcelos y col., 1996), Reino Unido (Ward y col., 1997) y Corea (Park y col., 1998). Por gramo de peso seco de alga recuperada en el filtro, las concentraciones menores se han observado en España (0,067-3,320 µg/g) en un muestreo estacional realizado en ocho embalses de riego y

de agua potable de la provincia de Murcia (sureste de España) en el año hidrológico 2000-2001 (Aboal y Puig, 2005). Mientras que, los mayores niveles de MCs por g de peso seco (1900 µg/g), se han observado en Dinamarca (Henriksen, 1996; Henriksen y Moestrup, 1997).

Aunque la concentración total de MCs extracelular con frecuencia está por debajo de 10 µg/L, algunos autores han observado concentraciones elevadas durante episodios de *bloom* como Wood y col. (2006a) y Messineo y col. (2009) que determinaron una concentración extracelular máxima para la suma de todas las variantes de MCs detectadas por LC-MS(/MS) de 760 y 226 µg/L en el Lago Rotoiti (Kenia) y en el embalse Monteleone (Italia), respectivamente. Por su parte, Fastner y col. (1999b) y Barco y col. (2002) determinaron una concentración extracelular de MC-LR de 366 y 270 µg/L en una de las 55 masas de agua estudiadas en Alemania durante los años 1995-96 y en el embalse de Sau durante una floración aparecida en el año 2000, respectivamente. Pero, en pocos casos, las muestras de agua han superado el nivel guía recomendado por la OMS (1 µg/L de MCs totales). En las muestras naturales con más de 1 µg/L de MCs totales, la fracción disuelta no comprende más del 10% de la suma total de las fracciones setónica y acuosa (Lindholm y Meriluoto, 1991; Jones y Orr, 1994; Tsuji y col., 1996; Ueno y col., 1996; Lahti y col., 1997; Corbel y col., 2014).

Los estudios de floraciones de cianobacterias en Europa a menudo se limitan a la investigación de lagos, embalses o masas de agua individuales que pueden no ser representativas del país en su conjunto. Las concentraciones determinadas de MC disuelta en aguas continentales en España (0,010-270 µg/L; *Tabla 4.1*), han sido superiores a las encontradas en Portugal (<0,05-0,17 µg/L; Caetano y col., 2001). En cambio, en la biomasa se han determinado concentraciones de MC similares en España (de hasta 55,02 µg/L) y Francia (0,01-230 µg/L) que han sido menores a las encontradas en Portugal (0,1-7100 µg/L), como se puede observar en la *Tabla 4.1*. La mayor concentración descrita en España ha sido la de 270 µg/L de MC-LR, determinada mediante análisis LC-MS en el embalse de Sau durante la floración del año 2000.

Si las medidas de prevención no son suficientes, el tratamiento de potabilización del agua debe ser capaz de proteger a los consumidores de la exposición a cianotoxinas. Las cianobacterias y las toxinas asociadas pueden entrar a la ETAP como toxinas intracelulares (unidas a las células) o extracelulares (toxinas disueltas). En consecuencia, el tratamiento de agua potable debe excluir las cianobacterias sin comprometer la integridad de la célula con el fin de forma simultánea de suprimir las toxinas intracelulares, pero también debe eliminar potencialmente las toxinas extracelulares del agua cruda. Algunos tratamientos (pre-oxidación, coagulación química) es posible que provoquen la rotura de las células de estas cianobacterias y liberen las toxinas intracelulares al agua (Jurczak y col., 2005). Diversos de los procesos de tratamiento convencionales pueden ser ineficaces para la eliminación de toxinas extracelulares (Hitzfeld y col., 2000; Pantelic y col., 2013).

**Tabla 4.1.** Información general sobre las variantes de MCs encontradas en diferentes países y sus concentraciones. Como se indica, las concentraciones se expresan en µg/L o bien en µg/g de peso seco (DW).

País (período)	Localización	Uso	Géneros mayoritarios	Variantes de MCs	Concentración (µg/L o µg/g peso seco*)	Método	Referencia
<b>Alemania</b> , (1993-94)	Lagos del área de Frankfurt	Recreo	<i>P</i>	LR	0,07-36 <sup>i</sup>	ELISA	Ueno y col., 1996b
(1995-96)	55 masas de agua	-	<i>M, P, A</i>	LR	<0,1-366 ( 11-559,5) <sup>i,*</sup>	LC	Fastner y col., 1999b
(1996-98)	Lagos y ríos de Berlin	Recreo	<i>M, P</i>	LR	0,14-119 <sup>t</sup>	ELISA, LC	Fromme y col., 2000
Sud-oeste (1999)	155 lagos	Recreo	<i>M, P, L</i>	LR, RR, YR	11- 11410 <sup>i</sup>	ELISA, PP1A, LC	Frank, 2002
<b>Argentina</b> (1998-2002)	Embalse de San Roque	Abastecimiento y recreo	- <i>M,A, W</i>	LR, RR LR	5,8-2401 <sup>i,*</sup> n.d.-920 <sup>t</sup>	LC LC-MS	Amé y col., 2003 Conti y col., 2005
2007	Presa Salto Grande	Recreo	<i>M</i>	LR	48,6 <sup>t</sup>	LC	Giannuzzi y col., 2011
<b>Australia</b> (1991)	Lago Mokoan	-	<i>M</i>	24 no id.	2100-4100 <sup>t,*</sup>	LC	Jones y col., 1995
(1999-2002)	Lago Coolmunda	Recreo	<i>M, A, P</i>	LR	12	LC	Stewart y col., 2006
<b>Brasil</b> (1999-2000)	Lago Bolonha, Utinga	Abastecimiento	-	-	0,36-1,25	ELISA	Vieira y col., 2005
<b>Canada</b> (1990)	14 masas de agua del norte y centro de Alberta	Abastecimiento y agricultura	<i>M, Aph, A</i>	LR	4-605 <sup>i,*</sup>	LC, FAB-MS	Kotak y col., 1993
(1990-92)	Lagos Alberta	Abastecimiento y agricultura	<i>M, Aph, A</i>	LR	n.d.-6405 <sup>i</sup>	LC	Kotak y col., 1995
<b>Chile</b> (1995-96)	Lago Rocuant (marisma)	-	<i>M</i>	1 no id.	8,13-130 <sup>i,*</sup>	LC	Campos y col., 1999
1998	Lago Tres Pascualas	-	<i>M</i>	RR, FR, [Asp <sup>3</sup> ]LR, [Asp <sup>3</sup> ]YR	20 <sup>i,*</sup>	LC, MALDI-TOF	Neumann y col., 2000
<b>China</b> (1993 y 94)	Embalse Haimen	Abastecimiento	<i>P</i>	LR	1,556	ELISA	Ueno y col., 1996
2004	Lago Taihu	Abastecimiento y recreo	<i>M, A</i>	LR	34,2	LC	Liu y col., 2011

**Continuación tabla 4.1.** Información general sobre las variantes de MCs encontradas en diferentes países y sus concentraciones. Como se indica, las concentraciones se expresan en µg/L o bien en µg/g de peso seco (DW).

País (período)	Localización	Uso	Géneros mayoritarios	Variantes de MCs	Concentración (µg/L o µg/g peso seco*)	Método	Referencia
<b>Corea</b> (1992-95)	Embalse Younglang	Recreo	<i>M, A, P</i>	RR, YR, LR, [Dha <sup>7</sup> ]LR	0,6-856 <sup>i</sup>	LC	Park y col., 1998
<b>Dinamarca</b> (1993-95)	Lagos Knud so, Ravn so y Salten Langso	-	<i>A, M, P</i>	[Dha <sup>7</sup> ]RR, [Dha <sup>7</sup> ]LR, LR, YR, RR	~5-1900 <sup>i,*</sup>	LC	Henriksen, 1996; Henriksen y Moestrup, 1997
<b>España</b> (1999)	La Albufera de Valencia	-	<i>M, P</i>	-	0,005-2,1 <sup>t</sup>	ELISA	Bradt y Villena, 2002
(1998 y 2000)	Embalses de Pasteral, Sau, y Susqueda	Abastecimiento	-	LR, RR, YR, variante YR, HtyR, WR, 2 no conf. y 1 no id.	0,189-270	LC-MS	Barco y col., 2002
(2002)	Estuario río Guadiana	-	<i>M</i>	5 MCs (incluyendo la LR)	n.d.->1,0 <sup>i</sup>	LC	Sobrino y col., 2004
(2003)	Embalse de El Atazar	Abastecimiento	<i>P</i>	dm-RR, LR, RR, YR, variante YR, YA, 2 variantes LR, variante HtyR	0,010-19,126	LC-MS	Barco y col., 2004
(2000-01)	Embalses cuenca del Segura (Alfonso XIII, Argos, Cenajo, Cierva, Ojos, Pedrera, Puentes y Valdeinfierno)	Agricultura y abastecimiento	<i>Benthos, Aph</i>	> de 5 variantes, entre ellas LR, RR, YR	0,032-0,170 (0,067-3,320) <sup>i,*</sup>	LC, ELISA	Aboal y Puig, 2005
(2002-03)	Embalses región de Madrid (El Vellón, Lozoya, Picadas, Río Sequillo, San Juan, Santillana, y Valmayor)	Abastecimiento	<i>M, Aph, A</i>	MCs	1,2-55,02 <sup>i</sup>	LC	Carrasco y col., 2006
<b>Finlandia</b> (2001)	93 masas de agua continental y salobre localizadas en Aland	Abastecimiento y recreo	<i>M, A, P</i>	LR, RR, YR, dmLR, dmRR, LY, LF, LW	0,10-42 <sup>i</sup>	LC-MS	Spoof y col., 2003
<b>Francia</b> (1994)	Lago Grand Lieu	-	<i>M, A, Aph</i>	LR, 2 variantes RR, 1 no id.	30-230 <sup>i</sup>	LC	Vezie y col., 1998
(1998-99)	Embalse Saint-Caprais	Abastecimiento	<i>Aph</i>	LR	<0,02 (0,01-0,07) <sup>i</sup>	PP2A, LC	Maatouk y col., 2002

**Continuación tabla 4.1.** Información general sobre las variantes de MCs encontradas en diferentes países y sus concentraciones. Como se indica, las concentraciones se expresan en µg/L o bien en µg/g de peso seco (DW).

País (período)	Localización	Uso	Géneros mayoritarios	Variantes de MCs	Concentración (µg/L o µg/g peso seco*)	Método	Referencia
<b>Grecia</b> (1987-2000)	33 masas de agua	-	<i>M, A, Anp, Aph, Cyl</i>	LR, RR, LA, YR, dmLR, dmRR	50,3-1638 <sup>*</sup>	LC, LC-MS	Cook y col., 2004
(2009-11)	Embalse Kerkini y Lagos Doirani, Volvi, Kastoria, Pamvotis y Karla	-	<i>Cyl; M; A; Cyl; M; M; L; P, Anp</i>	-	3,9-108	ELISA	Gkelis y Zaoutsos, 2014
<b>Italia</b>	Embalse Monteleone	Abastecimiento	<i>M, P, A</i>	MCs	n.d.-226	LC-MS/MS	Messineo y col., 2009
<b>Japón</b> (1993-95)	Lago Inbanuma	Abastecimiento y recreo	<i>M</i>	-	<0,05-5,6 (0,05-1300) <sup>i</sup>	ELISA	Ueno y col., 1996b
(1992-94)	Lago Suwa	-	<i>M</i>	RR, LR, YR	0,05-3,61 (0,11-184) <sup>i</sup>	LC	Park y col., 1998b
<b>Kenia</b> (2001-02)	Lagos Simbi y Sonachi	-	<i>A, Anp</i>	MC-LR	19,7-39; 1,6-12 <sup>*</sup>	LC, MALDI-TOF	Ballot y col., 2005
(2008-13)	Lago Naivasha	Abastecimiento	<i>M, P, C, Anp</i>	MC-LR	n.d.-0,041 <sup>i</sup>	LC, LC-MS/MS	Krienitz y col., 2013
<b>Marruecos</b> (1994-2000)	Embalse Lalla Takerkoust	Abastecimiento y recreo	<i>M</i>	LR, RR, YR, [Asp <sup>3</sup> ]LR	496-8800 <sup>i</sup>	ELISA, AA, LC, FAB-MS, LC-MS	Oudra y col., 2001; 2002
<b>Nueva Zelanda</b> (2001-04)	Lagos Waitawa, Horowhenua, Ngaroto, Taupo y estanque Neuma	-	<i>M, N, P, A</i>	LR, RR, dmRR, YR, mLR, FR, WR, AR, LA, LY	0,02-36500 1535-28450 <sup>t</sup>	ELISA, LC-MS/MS	Wood y col., 2006b
2003-04	Lagos Rotoiti y Rotoehu	Agricultura	<i>A, M</i>	LR, YR, RR, AR, FR, LA, WR	10-760; 23	ELISA, LC-MS	Wood y col., 2006a
<b>Polonia</b> (2005)	Embalse Sulejow y Lago Brninskie	Abastecimiento y recreo	<i>M, P</i>	LR	1,17; 1,87	PPIA, Análisis molecular	Gagala y col., 2010
<b>Portugal</b> (1989-92)	Lagos, embalse y ríos de Portugal	-	<i>M, A, N</i>	LR, YR, RR, HilR, 1 mL 2 dmLR y 3 no id.	1000-7100 <sup>i</sup>	AA, FAB-MS, LC	Vasconcelos y col., 1996
(1994-95)	-	Abastecimiento y recreo	<i>M</i>	MCs	0,1-37 <sup>i</sup>	ELISA	Ueno y col., 1996
(1999)	Estuario del Guadiana	-	-	-	<0,05-0,17	ELISA	Caetano y col., 2001

**Continuación tabla 4.1.** Información general sobre las variantes de MCs encontradas en diferentes países y sus concentraciones. Como se indica, las concentraciones se expresan en µg/L o bien en µg/g de peso seco (DW).

País (período)	Localización	Uso	Géneros mayoritarios	Variantes de MCs	Concentración (µg/L o µg/g peso seco*)	Método	Referencia
<b>Portugal</b> (1999)	EDAR de Esmoriz (Norte de Portugal)	-	<i>M, P</i>	-	1,7-56,0 <sup>i</sup>	ELISA	Vasconcelos y Pereira, 2001
<b>Reino Unido</b> (1992)	-	-	<i>A</i>	RR, LR, 1 no id.	16,6-19,4 <sup>i</sup>	LC	Codd y col., 1995
(1995-96)	Lagos , embalses, ríos y estanques de las Islas Británicas	-	<i>A, Aph, M, P</i>	-	20-3430 <sup>i</sup>	LC, PP1A	Ward y col., 1997
<b>Sud Africa</b> (2005-06)	Presa Krugerdrift	-	<i>M</i>	MCs	Máximo de 43,7	ELISA	Oberholster y col., 2009a
(2007)	Presas Nhanganzwane y Makhohlolo, Parque Nacional Kruger	-	<i>M</i>	MCs	23718 <sup>t</sup> ; 0,317 <sup>t</sup>	ELISA	Oberholster y col., 2009b
<b>Uruguay</b> (1999)	La Plata	Recreo y doméstico	<i>M</i>	-	102-1074 <sup>i,*</sup>	ELISA	De Leon y Yunes, 2001
<b>USA</b> (1999-2002)	Lago Doctors	Recreo	<i>M, A, P</i>	LR	1	LC	Stewart y col., 2006
(2003-2004)	Lagos Bufalo Springs y Ransom Canyon	Recreo	<i>M</i>	-	0,096-4,914; 0,2-5,83	ELISA, PPIA	Billam y col., 2006
(2004)	Estuario de San Francisco	Agricultura	<i>M</i>	RR, LR, FR, WR, LA, LV, AA, LF, 2 no id.	0,01-81 ng/L	PPIA, LC	Lehman y col., 2007
(2004)	6 Lagos del centro de Florida Río St Johns	Recreo	<i>M</i>	-	0,1-3,6 ( 5-7500 blooms) 0,1-31	ELISA	Williams y col., 2007
(2007)	Lago Pinto	Recreo	<i>M</i>	LA, RR, LR, dmLR, LF, YR, LR	2900000 <sup>t</sup>	LC-MS/MS	Miller y col., 2010

*A: Anabaena; Anp: Anabaenopsis, Aph: Aphanizomenon, Ch: Chroococcus, Cyl:Cylindrospermopsin, L: Limnothrix, M: Microcystis, N: Nostoc, P: Planktothrix, W: Woronichinia; AA: análisis de aminoácidos; id: identificada; conf.: confirmada.*

\*Concentraciones presentadas en µg/g de peso seco; <sup>i</sup>: concentración intracelular; <sup>t</sup>: concentración total (intra + extracelular).

## 4.2. Análisis de muestras de aguas, cultivos y materiales de referencia

El procedimiento analítico seguido en esta tesis para el análisis de las MCs totales (intracelulares y extracelulares) en muestras de agua se describe detalladamente en el *Capítulo 2* y se resume en el esquema de la *Figura 2.19* y en la *Tabla 2.3*. En el *Anexo A* se incluye, a modo de ejemplo, el procedimiento normalizado de trabajo que se ha seguido en la presente tesis para el análisis de MC mediante SPE en línea al sistema LC-ESI-MS/MS (*CYANOCOST Handbook on Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*, en el marco de *CYANOCOST Action ES 1105*).

### 4.2.1. Toma de muestra

En la toma de muestra para el análisis de MCs en agua es imprescindible cumplir una serie de condiciones: la muestra ha de ser representativa de la masa de agua en estudio y se ha de evitar la alteración o contaminación de dicha muestra.

De forma general, se pueden diferenciar dos métodos en la toma de muestra para el análisis de MCs en agua:

(a) Muestreo de la columna de agua como cualquier sustancia soluble cuando se ha producido la muerte natural de las células de un *bloom*.

(b) Métodos de muestreo que recuperen las células de cianobacteria en el caso de que exista el *bloom*.

La distribución espacial y temporal de las cianobacterias y cianotoxinas es muy variable, dependiendo de las características de las especies/cepas, las características fisiográficas e hidrológicas de las masas de agua, y las condiciones meteo-climáticas. Las cianobacterias pueden tener una distribución homogénea o heterogénea en la masa de agua. En el caso de una distribución heterogénea de la población de cianobacterias, es importante tener en cuenta las variaciones horizontal y vertical debidas a una estratificación térmica y a la capacidad de flotar que tienen algunas especies de cianobacteria. La densidad de células y composición de especies son impredecibles. Cualquiera que sea la especie, el uso de sondas fluorométricas es muy útil para estimar la distribución vertical de las poblaciones. Cuando no se dispone de sonda, el muestreo discreto de agua es interesante realizarlo a varias profundidades. Además, se ha observado que la variabilidad horizontal de los niveles de toxicidad en los *blooms* es elevada. Para el diseño de los muestreos en las masas de agua estratificadas deben tenerse en cuenta los ciclos migratorios verticales diarios, observados por ejemplo en muchas Nostocales, que se mueven cerca de la superficie por la noche y en profundidad durante el atardecer (como *Dolichospermum* y *Aphanizomenon*; Reynolds, 2006). Asimismo, la distribución espacial puede cambiar en cuestión de días o incluso horas, debido a la variabilidad hidrológica y la acción del

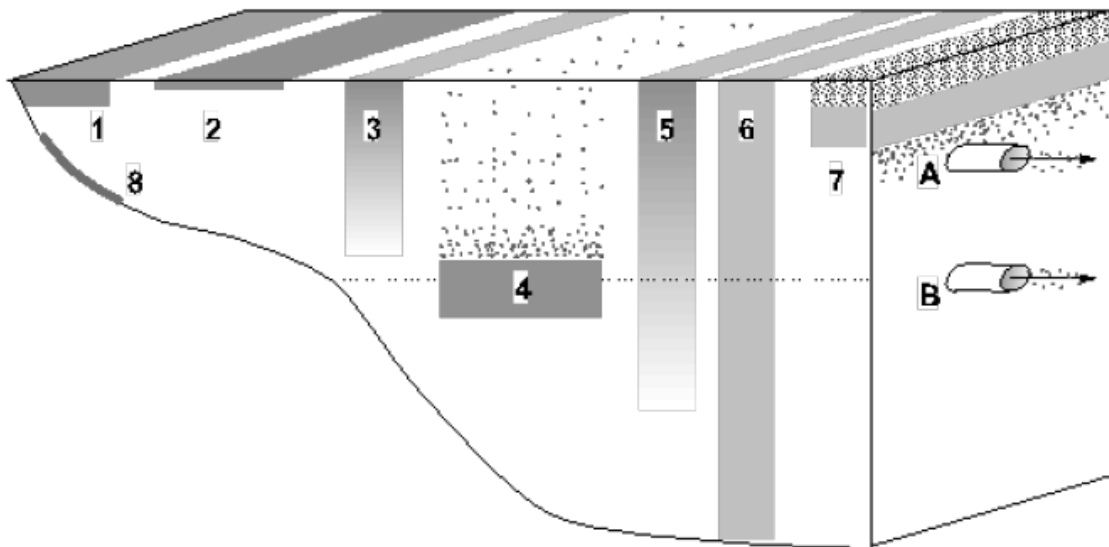


viento, lo que puede provocar la dispersión de las cianobacterias y floraciones de superficie (espumas) que se acumulen a lo largo de las orillas de los embalses, lagos y ríos o en puertos y bahías protegidas.

Por último, en la vigilancia y monitorización de floraciones de cianobacterias se debe tener en cuenta que suelen aparecer de forma estacional dependiendo de la especie y género de cianobacteria en la primavera o entre finales de verano y principios de otoño, cuando la temperatura del agua está próxima a 20°C y se establece una estratificación térmica en la columna de agua (en el caso de lagos > 3m de profundidad). Las concentraciones más elevadas de MCs se han detectado en estos meses después de la aparición del *bloom*. La duración de dicho *bloom* puede ser muy variable. Sin embargo, algunas especies son capaces de proliferar en agua fría como la *Planktothrix rubescens* que puede florecer incluso en invierno encima de la capa de hielo del lago (Blikstad Halstvedt y col. 2007) o la *Planktothrix agardhii* que es capaz de formar *blooms* perennes en estanques, en ocasiones hasta durante varios años.

Por lo tanto, los mecanismos de vigilancia deben ser definidos y adaptados para cada masa de agua individualmente y la ubicación de los puntos de muestreo depende principalmente de su superficie y forma.

Para realizar la toma de muestra de forma efectiva existen varias opciones de localización de los puntos de muestreo (Figura 4.1): en las orillas, en medio del embalse, a diferentes profundidades, etc...



**Figura 4.1.** Localización de las acumulaciones de cianobacterias en lagos y masas de aguas naturales y artificiales de climas templados (CYANOCOST Handbook on Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis; modificada de Lindholm y col., 1989 y Codd y col., 1999). 1-2, *blooms* en aguas superficiales; 3, 5-6, desarrollo a lo largo de la columna de agua, durante el verano, encima (3) o se extiende sobre la profundidad eufótica (5), y en (6) al volver al invierno; 7, debajo del hielo; 4, floraciones metalimnéticas (por ejemplo, *Planktothrix rubescens*); 8 tapetes de cianobacterias bentónicas. La línea de puntos horizontal indica el límite inferior de la zona eufótica, que corresponde a la capa que recibe el 1% de la luz que incide sobre la superficie del lago. A y B indican una posible localización de los puntos de captación de agua para el abastecimiento de agua potable.

Una aproximación ampliamente utilizada es la selección de los puntos de muestreo teniendo en cuenta las áreas donde las acumulaciones de cianobacterias puedan afectar a personas y animales:

- Los puntos del embalse próximos a las captaciones del agua de las ETAPs para su posterior uso como agua de bebida (*Figura 4.1: A, B*).
- Las orillas, bahías y golfos (*Figura 4.1: puntos 1 y 8*), que son las áreas más susceptibles a proliferaciones de cianobacterias y acumulaciones. Pobel y col., 2011 obtuvieron mejores estimaciones de la biomasa utilizando puntos de muestreo situados en la orilla opuesta a la dirección predominante del viento sobre el lago.
- Cuando las floraciones se localizan en la superficie, áreas importantes de posible exposición, el mayor riesgo puede estimarse tomando una muestra directamente de esta espuma (*Figura 4.1: puntos 2, 3, 5 y 6*) donde la acumulación de cianobacterias es mayor (Utkilen y col., 1999).

Las muestras de agua deben recogerse en botellas de vidrio ámbar o recipientes de polipropileno de boca ancha (normalmente de 1 - 2,5 litros) y mantenerse refrigeradas a 4°C hasta su análisis en el menor tiempo posible, para prevenir cualquier alteración de la muestra cómo sería un cambio de distribución entre el contenido de toxina intracelular/extracelular. Las botellas de vidrio son más adecuadas que los recipientes de plástico porque algunos autores han demostrado que las MCs se absorben en el plástico, pero el plástico es un material más resistente y duradero y por lo tanto más manejable para la recogida de las muestras de campo.

#### **4.2.2. Análisis cualitativo y cuantitativo de microcistinas por espectrometría de masas**

Para realizar el análisis de MCs en la muestra de agua en una etapa inicial se ha filtrado la muestra. Después de filtrar la muestra en el pre-tratamiento se obtienen dos fracciones: el agua filtrada (fracción intracelular) y la fracción sestónica o intracelular que se han analizado independientemente. A continuación se describen brevemente los métodos de análisis utilizados para cada fracción, que se han descrito ampliamente en el *Capítulo 2* y se resumen en la *Tabla 2.3* Inicialmente, el agua y el extracto del filtro se han analizado por LC-ESI-MS y MS/MS en modo de ionización electrospray positivo con un equipo QqQ. Posteriormente, se ha trabajado también en ESI negativo, se ha puesto a punto el análisis cualitativo de la fracción sestónica por MALDI-TOF/TOF (muestras de Alcántara 2009, Caldas y Forcadas 2010) y el análisis cuantitativo de las dos fracciones mediante LC-ESI-HRMS con un analizador Orbitrap (muestras 2011 y 2013). Los métodos con separación cromatográfica, permiten identificar a los analitos según su tiempo de retención.

Las metodologías de HRMS (TOF y Orbitrap) en ambos modos de ionización, positivo y negativo, hacen posible la confirmación de la identificación de las señales susceptibles de ser MCs mediante la medida de la masa exacta del ion molecular y los fragmentos obtenidos al romper la molécula por colisión inducida. Las señales se confirman cuando las formulas empíricas y estructuras propuestas concuerdan con las MCs en estudio con una exactitud inferior a 3 ppm y cuando en el espectro de fragmentación se detectan los fragmentos característicos de las MCs y compuestos relacionados.

La cuantificación de los analitos se realiza por el método de calibración interna. Como no hay MCs marcadas isotópicamente disponibles comercialmente, la nodularina ( $m/z$  825,4505) se ha utilizado como patrón interno. Se ha elegido este compuesto como patrón interno porque es un péptido pentacíclico análogo a las MCs que contiene el mismo aminoácido Adda característico y que hasta el momento sólo se ha descrito producido por la cianobacteria *Nodularia spumigena*, y detectado con frecuencia en aguas salobres y no en aguas dulces. La nodularina se ha añadido en cada fracción, calculando los factores de respuesta de los analitos. Se han preparado soluciones de los estándares de las MCs disponibles para la calibración interna a diferentes niveles de concentración ( $n=5$ ), recalculando a diario estos factores de respuesta. Mediante LC-MS/MS se monitorizan las señales de dos transiciones (precursor > producto) para cada MC y se calcula una relación entre las áreas de estas dos señales en todos los patrones de la recta de calibrado. Para la confirmación se sigue el criterio descrito en el apartado 2.5 del Capítulo 2 (se han de observar las dos transiciones monitorizadas para cada analito; la relación entre el área de las dos transiciones en la muestra se ha de corresponder con la relación en la curva de calibración [media de la relación en la curva de calibración  $\pm$  la desviación estándar de estas relaciones en las soluciones de la curva de calibración], teniendo en cuenta las tolerancias máximas incluidas en la Decisión 2002/657/CE). Las toxinas diferentes a los estándares disponibles se han cuantificado como equivalentes de MC-LR. Como en algunos casos, no se disponía de los pesos de los filtros tarados, para homogeneizar los datos, la concentración en la fracción intracelular en todas las muestras se ha calculado en equivalentes de  $\mu\text{g/L}$ , teniendo en cuenta el volumen de agua filtrado en cada caso, exceptuando las muestras de los *blooms* recibidos el año 2013.

### 4.2.3. Monitorización de la presencia de microcistinas en aguas superficiales y tratadas en una ETAP

Con el fin de controlar que el nivel de MC no supere el nivel máximo permitido de 1 µg/L en el agua de consumo humano según RD 140/2003 y valor guía propuesto por la OMS y monitorizar la presencia de *blooms* de cianobacterias que pudieran afectar a la calidad del agua potable, se han recibido muestras procedentes de los embalses de Sau y Susqueda de la cuenca del río Ter, principales fuentes de abastecimiento de agua del área metropolitana de Barcelona y Girona, a la entrada y la salida de la ETAP de Aigües de Girona, Salt i Sarrià de Ter que se abastece del sistema de embalses Sau-Susqueda-Pasteral.

En la *Tabla 4.2* se indican las muestras analizadas y las correspondientes fechas de muestreo. Como los anteriores episodios de *bloom* en estos embalses (Tesis Doctoral Barco, 2006) siempre se han observado en los meses de otoño, el muestreo se ha realizado cada año en los meses de septiembre a diciembre, durante los años de 2007 hasta la actualidad, con una periodicidad mínima de dos muestras al año, entrada y salida de la ETAP, excepto el año 2012 en que solo se analizaron las muestras de entrada a la ETAP, muestras de agua superficial del embalse, y el año 2014 en que solo se analizaron las muestras de la salida de la ETAP, aguas por lo tanto tratadas.

Durante estos 8 años (2007-2014) no se han detectado proliferaciones masivas de algas en estos embalses, y del total de las 23 muestras analizadas, únicamente en una muestra del embalse a la entrada y en dos muestras a la salida de la ETAP del año 2007 y 2014, respectivamente, se han detectado MCs (ver *Tabla 4.2*). Al filtrar la muestra no se ha detectado alga en el filtro, es decir, no se ha obtenido fracción intracelular. La concentración de MC total detectada (0,67; 0,004; y 0,006 µg/L) ha sido inferior al valor permitido por la legislación. Las variantes detectadas fueron la MC-RR y la MC-YR a un nivel de 0,45 y 0,12 µg/L, respectivamente, en la muestra del año 2007 y la MC-RR en las dos muestras del año 2014 a concentraciones muy bajas, inferiores a 20 ng/L (LOQ). En la correspondiente muestra a la salida de la ETAP del año 2007, no se detectaron MCs, por lo que el tratamiento realizado en la ETAP fue efectivo en la eliminación de las MCs a los niveles indicados. Debido a esta detección de MCs en esta muestra el año 2007 se decidió repetir la toma de muestra. En las dos sucesivas semanas no se detectó ni la presencia de alga ni de MCs en el agua. No se ha podido evaluar el rendimiento del tratamiento en el año 2014 porque no se recibieron las muestras de la entrada a la ETAP.

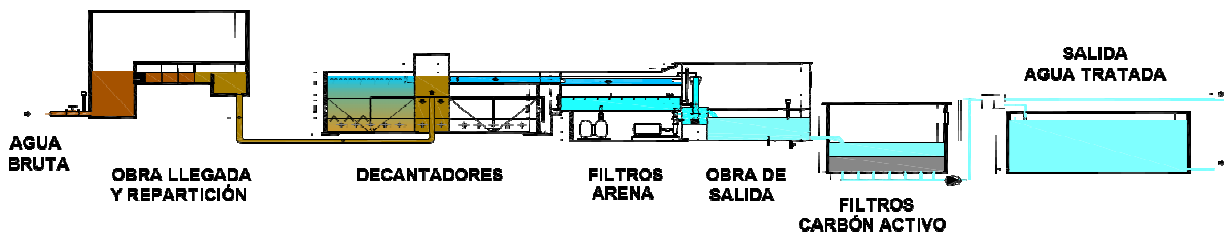
**Tabla 4.2.** Concentraciones en µg/L de las MCs detectadas en el agua de las muestras que provienen de la ETAP de Aigües de Girona. Aguas superficiales y tratadas a la entrada y salida de la ETAP, respectivamente. Cuantificación por SPE en línea LC-ESI-MS/MS en modo de adquisición SRM.

Nº muestra	Fecha	Referencia	µg/L			
			MC-RR	MC-YR	MC-LR	TOTAL
1	20/09/2007	Entrada	<b>0,45</b>	<b>0,12</b>	n.d.	<b>0,67</b>
2		Salida	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	27/09/2007	Entrada	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4		Salida	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5	04/10/2007	Entrada	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6		Salida	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
7	25/09/2008	Entrada	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8		Salida	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
9	16/10/2009	Entrada	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
10		Salida	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
11	07/10/2010	Entrada	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
12		Salida	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
13	20/09/2011	Entrada	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
14		Salida	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
15	18/10/2012	Entrada	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
16	07/11/2012	Entrada	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
17	13/11/2012	Entrada	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
18	24/10/2013	Entrada	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
19		Salida	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
20	31/10/2013	Entrada	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
21		Salida	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
22	22/10/2014	Salida	<b>0,004<sup>a</sup></b>	n.d.	n.d.	<b>0,004<sup>a</sup></b>
23	04/11/2014	Salida	<b>0,006<sup>a</sup></b>	n.d.	n.d.	<b>0,006<sup>a</sup></b>

<sup>a</sup> Estimación de la concentración de la MC-RR por extrapolación de la recta. Se detecta y se confirma cumpliendo la tolerancia permitida en la relación entre el área de las dos transiciones monitorizadas. LOQ (MC-LR, -RR y -YR): 20 ng/L. LOD (MC-LR, -RR y -YR): 6,0; 3,0; y 14 ng/L.

En las muestras de los años 2012-2014 también se analizaron las MC-LA, -LF, -LY, -LW, -WR, -dmRR, -dmLR para las que se hubo optimizado el análisis MS/MS y se introdujeron en el método de SPE en línea LC-ESI-MS/MS en modo de adquisición SRM e ionización positiva. Estas variantes no se detectaron en ninguna de estas muestras por encima del límite de cuantificación del método.

En la *Figura 4.2* se muestra el esquema de la ETAP en estudio. Es recomendable un control permanente del agua de entrada a la planta de tratamiento y después de algunas de las etapas claves del tratamiento (después de la coagulación, filtración y en el agua tratada).



**Figura 4.2.** Esquema ETAP Montfullà, Aigües de Girona, Salt i Sarrià de Ter S.A. (AGSST).

El tratamiento incluye una etapa de decantación-coagulación con un polímero AIOH PAX SL63, una filtración con lechos de arena seguida de carbón activado y una pre- y post-cloración con  $\text{ClO}_2$  y  $\text{Cl}_2$ , respectivamente, en la obra de llegada y a la salida del agua tratada.

El objetivo de la coagulación es eliminar el grueso del material algal, restos orgánicos y materia inorgánica. La coagulación implica la agregación de las partículas más pequeñas en partículas más grandes utilizando productos químicos como el cloruro férrico o el sulfato de aluminio. Este tratamiento de agua es un método eficaz para suprimir células de cianobacterias del agua pero no para eliminar de manera eficiente las cianotoxinas solubles (Pantelic y col., 2013). La eficiencia del proceso de coagulación depende del valor de pH y de las dosis químicas de coagulante utilizado (Pantelic y col., 2013). Hay que evitar que este tratamiento cause la lisis de las cianobacterias y la liberación de toxinas al agua. Además, el lodo que contiene las cianobacterias debe ser retirado del proceso de tratamiento para evitar que las células contenidas en los lodos puedan descomponerse rápidamente y solubilizar la toxina (Comisión Europea, 2005). La materia orgánica natural (NOM) de las aguas superficiales puede disminuir la eficiencia de la coagulación (Ma y Liu, 2002). Resultados obtenidos en el trabajo de Teixeira y Rosa (2007) atribuyen un efecto potenciador de la coagulación sobre cianobacterias a un proceso de oxidación como la pre-cloración.

La filtración física en arena elimina básicamente las partículas y las cianobacterias que pudieran permanecer después de la decantación-coagulación y por lo tanto las toxinas intracelulares. En algunos casos, también ayuda a la eliminación de

la fracción extracelular de toxinas, pudiéndose potenciar en la capa superior de los filtros de arena el crecimiento de microorganismos. Entre ellos, algunas bacterias de los recursos de agua superficial podrían degradar eficientemente las MCs si existe un período de latencia suficiente (Grützmacher y col., 2002). Este tratamiento de agua requiere el lavado normal de los filtros y si este proceso se realiza de manera inadecuada, se puede provocar la lisis de las células de cianobacterias y la liberación de cianotoxinas al agua.

Finalmente, la filtración con carbón es uno de los tratamientos más efectivos por el momento para la eliminación de MCs disueltas en el agua, con niveles de eliminación descritos de hasta el 99%. La saturación de los filtros con el correspondiente tiempo y coste del cambio o regeneración de estos filtros son los inconvenientes de esta tecnología. El carbón activado no siempre es un método muy eficiente debido a su corto tiempo de vida de adsorción, por lo tanto la eficiencia de la eliminación disminuye con el tiempo y tiene que ser cambiado con frecuencia, lo que aumenta significativamente los costes de tratamiento (Pantelic y col., 2013). Es necesario establecer períodos y mecanismos de uso, regeneración, sustitución y mantenimiento adecuados. El tipo de adsorbente empleado (carbón, madera > turba, coco), el área total de poro y las características de la superficie son críticos para la eficacia de la adsorción de MCs. La calidad del agua también tiene una fuerte influencia sobre la eliminación de cianotoxinas por carbón activado. La presencia de NOM puede competir con los contaminantes y limitar su adsorción (Merel y col., 2013; Huang y col., 2007). Este fenómeno aparece claramente al comparar las isotermas de adsorción de la MC-LR en agua ultrapura tratada con adsorbente fresco o ya utilizado durante un tiempo o de la MC-LR en agua ultrapura frente a agua superficial, tratadas ambas con adsorbente fresco (Lambert y col., 1996). En efecto, la adsorción de la toxina disminuye significativamente en el agua superficial y cuando se utiliza carbón activado pre-cargado. Existe controversia con el efecto que puede producir el crecimiento de microorganismos en la superficie de los filtros de carbón activado. Algunos trabajos han indicado que la formación de biopelículas mejora la eficacia a través de la biodegradación en combinación con la adsorción, incluso en presencia de NOM, y alarga la vida de estos filtros (Huang y col., 2007a). Sin embargo, un estudio más reciente a escala de laboratorio encontró que un tipo de filtro de carbón activado, virgen (estéril) GAC, fue menos eficaz después de la colonización por bacterias, debido a la unión competitiva de proteínas liberadas por las bacterias (Drogui y col., 2012).

La cloración o aplicación de dióxido de cloro es un proceso muy común de desinfección del agua potable, cuya utilización generalizada en el tratamiento del agua se basa en su doble papel como oxidante y desinfectante (De la Cruz y col., 2011). La eficiencia de este proceso depende del tipo de compuestos de cloro utilizados, la dosis usada, el pH, el tiempo de contacto (Pantelic y col., 2013; Nicholson y col., 1994;.. Tsuji y col., 1997; Bruchet y col., 1998; Hart y col., 1998; Merel y col., 2010; de la Cruz y col., 2011), y de la reactividad del cloro hacia la toxina (Acero y col., 2005). Las MCs tienen un doble enlace conjugado en su estructura que es susceptible de ser oxidado por el cloro, así como grupos de los amino ácidos reactivos. Como cada MC tiene amino ácidos distintos su reactividad frente al cloro es diferente (Ho y col., 2006). En las cuatro MCs más comunes, la facilidad de oxidación ante el cloro sigue el siguiente

orden: MC-YR > MC-RR > MC-LR > MC-LA. Como regla general para la oxidación de todas las MCs por debajo del valor de referencia en agua potable para Australia (1,3 µg/L) se recomiendan las siguientes condiciones (NHMRC/NRMMC, 2004; Newcombe y col., 2010): pH < 8; cloro residual > 0,5 mg/L después de 30 minutos de contacto; dosis de cloro > 3 mg/L; y valores de concentración por tiempo en el orden de 20 min mg/L se han establecido como eficaces. A escala de laboratorio la temperatura ha demostrado tener poco efecto sobre la cloración de las MCs y se ha determinado que la dosis de cloro necesaria para la eliminación de las MCs en el agua durante la presencia de altas concentraciones asociadas a episodios de *bloom* por debajo de los valores legislados sería también de 3 mg/L, con tiempos de contacto mayores a 30 min (Tesis Doctoral Barco, 2006). La pre-oxidación con ClO<sub>2</sub> tiene también como objetivo mejorar la eficiencia de los tratamientos en los siguientes pasos, pero puede también dañar la membrana de las cianobacterias y dar lugar a la liberación de las toxinas intracelulares (Miao y Tao, 2009) por lo que debe evitarse en presencia de una floración en el abastecimiento destinado para agua potable. Además, el rápido consumo del cloro por la alta cantidad de DOC en el agua en esta etapa del tratamiento es probable que evite sustancialmente la oxidación de la toxina. El cloro es más utilizado que otros métodos como el ozono o la irradiación de UV porque es persistente y previene también la contaminación del agua potable por patógenos en la red de distribución. Por último, hay que tener en cuenta la producción de subproductos nocivos por cloración de la materia orgánica. La cloración de MCs conduce a la formación de numerosos subproductos mediante múltiples hidroxilaciones o sustituciones de cloro sobre la toxina inicial (Merel y col., 2009; Tsuji y col., 1997) y es deseable desarrollar métodos que eliminen/destruyan cianotoxinas y reduzcan al mínimo la aparición de subproductos (Senogles y col., 2001). Sin embargo, varios estudios mediante bioensayos o PPIA han demostrado una disminución de la toxicidad de la mezcla después de la cloración (Merel y col, 2010a; Merel y col., 2013; Rodríguez y col, 2008; Tsuji y col., 1997). El uso de ClO<sub>2</sub> para eliminar las cianotoxinas no ha sido tan ampliamente estudiado. De hecho, el ClO<sub>2</sub> también transforma de manera eficiente a la MC-LR y disminuye la toxicidad de la mezcla, pero su eficiencia con otros cianotoxinas es limitada o desconocida.

En resumen, el control de cianobacterias en el agua potable puede lograrse a través de dos grupos de métodos; los eficaces para la eliminación de toxinas intracelulares como la coagulación y la coagulación- DAF, y los eficaces en la eliminación de toxina extracelular como el permanganato de potasio, el cloro libre, el ozono, y los filtros de carbón activado en polvo y granular.



#### 4.2.4. Estudio de la presencia de microcistinas en diferentes embalses españoles

Como ya hemos indicado anteriormente en la presente tesis, en las últimas décadas, las cianobacterias se han convertido en un problema importante para la calidad del agua, debido a su proliferación masiva a nivel mundial y a la posible producción de compuestos que dan sabor y olor y de toxinas que pueden liberar al agua. En concreto en Portugal (Vasconcelos, 1994), país vecino con clima e hidrología similar donde desembocan varios ríos que nacen en España, y recientemente en España (Aboal y col., 2005; Bradt y Villena, 2002; Carrasco y col., 2006; De Hoyos y col., 2004; Quesada y col. 2004; y Sobrino y col., 2004) se han realizado algunos estudios sobre la presencia, distribución y frecuencia de cianobacterias tóxicas (ver *Tabla 4.1*). El estudio de Bradt y Villena (2002) en La Albufera de Valencia es la primera cita de MCs en España con muestras recogidas en el año 1999. Estos estudios han mostrado que en un alto porcentaje de los embalses estudiados, entre el 35 y el 48% (Quesada y col., 2004), las cianobacterias potencialmente tóxicas han dominado la comunidad del fitoplancton en al menos una ocasión durante el período de estudio. Cabe mencionar que en un inicio, aunque se conocía que en nuestro país se producían fuertes episodios de *blooms* de cianobacterias en algunas aguas superficiales, existían pocos datos en la bibliografía sobre ellos. En este contexto, se decidió realizar el estudio sobre la presencia de MCs y compuestos relacionados en diferentes embalses españoles con el objetivo de evaluar la calidad de estas aguas y describir los géneros de cianobacteria y variantes de toxinas encontradas y su nivel de concentración en cada masa de agua y asegurar el cumplimiento de la legislación española (RD 140/2003 y 1341/2007).

Hasta el momento de inicio de la presente tesis, los datos disponibles en la bibliografía sobre cianotoxinas en España mostraban que, en diversas cuencas hidrográficas las cianotoxinas estaban presentes y algunas veces a altas concentraciones. Las MCs son las toxinas de cianobacterias más frecuentes en las aguas continentales de todo el mundo. En España, solo ocasionalmente se ha descrito además la presencia de anatoxina-a (ATX) en aguas dulces de la región del Mediterráneo (Carrasco y col., 2007) y de cilindrospermopsina (CYN) en una floración masiva de la cianobacteria *Aphanizomenon ovalisporum* en España (Quesada y col., 2006). En el primer trabajo, catorce embalses fueron muestreados y aunque en todos los embalses se detectó la presencia de géneros de cianobacterias que habían sido productores de ATX en otros países, esta toxina solo se detectó en un embalse a una concentración máxima de 0,31 µg/L. La incidencia de ATX en los embalses españoles investigados es menor que en otras masas de agua dulce de Europa, y en diferentes eco-regiones, han aparecido cepas distintas productoras potenciales de ATX. En el caso del estudio de CYN, se midieron por HPLC-UV concentraciones de esta toxina de entre 1,5 y 9,4 µg/L en la fracción sestónica en el 43% de las muestras analizadas del embalse de Arco (provincia de Cádiz, sud de España). Por primera vez se observan altas concentraciones de CYN en aguas europeas. La CYN también ha sido producida por seis cepas *Aphanizomenon ovalisporum* aisladas de diferentes masas de aguas españolas (Cirés y col., 2014) a niveles altos (de 5,7 a 9,1 µg/mg [peso seco]), con baja variación

entre cepas (1,5 a 3,9 veces) y una marcada liberación extracelular (19-41% CYN disuelta) durante el crecimiento exponencial. Por otra parte, en aguas salobres, Bates y col., (1978) encontraron una muestra de *Mytilus edulis* (mejillones azules) recogidos durante un episodio de marea roja en España con una cantidad apreciable de una toxina que se identificó como saxitoxina.

Como ya se ha introducido en el *Capítulo 1*, las MCs generalmente se presentan unidas a las células de cianobacterias. Sin embargo, en floraciones senescentes, la lisis celular se produce y conduce a la liberación de toxinas al agua. Pero existen muy pocos trabajos que estudian las dos fracciones por separado (Aboal y Puig, 2005). Por ello, nos pareció interesante plantear el estudio de forma que de cada muestra de *bloom* (agua más alga) se estudiara tanto la fracción extracelular (acuosa) como la fracción intracelular (sestónica). Como ya se ha mencionado anteriormente y se muestra en la *Tabla 4.1*, en la mayoría de trabajos encontrados en la literatura científica, se publican los perfiles de los niveles totales de toxina después de la lisis de las células de cianobacterias, utilizando en ocasiones métodos inespecíficos, tipo PPIA y ELISA, que cuantifican un total de toxicidad o MC y no describen las variantes individuales. En cambio, las toxinas disueltas en fase acuosa (extracelulares) raramente se han cuantificado por separado (Jones y Orr, 1994b; Lawton y col., 1994b; Tesis Doctoral Barco, 2006). Sin embargo, conocer el nivel de toxinas intracelulares y extracelulares independientemente es importante para determinar en qué estadio de evolución se encuentra el *bloom* y evaluar el riesgo que puede suponer su presencia para proteger a la población y a los animales que pudieran estar expuestos. Además, la fracción intracelular es un riesgo potencial si por alguna razón las cianobacterias liberan sus toxinas internas al agua. Aunque la ruta más habitual de intoxicación humana es el agua potable contaminada, la acumulación de toxinas en verduras como la lechuga, frijol o arroz después de la irrigación con agua contaminada, puede aumentar el número de intoxicaciones y los efectos a largo plazo, incluyendo el riesgo de cáncer (Abe y col., 1996; Codd y col, 1999; Rahman M. y col, 1996). La presencia de MC en esas aguas puede afectar al crecimiento del cultivo y también se puede acumular en el tejido vegetal (McElhiney y col., 2001). Por otra parte, las MCs pueden acumularse en los peces y cangrejos presentes en los embalses y su consumo podría constituir un riesgo para la salud humana (Dietrich y Hoeger, 2005; Mekebri y col., 2009).

En las *Tablas 4.3* y *4.4* se detallan las muestras y embalses estudiados. Excepto en el estudio de los años 2007 y 2008, se han analizado muestras siempre en presencia aparente de floración de las cuencas hidrográficas: Cataluña interna, Duero, Ebro, Galicia Costa, Guadalquivir, Guadiana, Miño-Sil y Tajo (ver mapa *Figura 4.3*). De forma que se han estudiado las vertientes españolas Atlántica y Mediterránea. Los embalses estudiados han sido de diferente tipo mayoritariamente de gravedad y relacionados (arco gravedad, gravedad/tierra, materiales sueltos núcleo arcillas, hormigón compactado, bóveda y escollera). También la capacidad y superficie de los embalses en estudio ha sido variada. El destino y uso del agua embalsada se describe en la *Tabla.4.4*. La mayoría de los embalses estudiados están destinados a riego, agua potable y/o recreo. Además muchos de estos embalses son utilizados para recreo, pesca y baño de forma autorizada y a veces de forma no controlada, lo que complica evitar el riesgo. Existen numerosos casos en la bibliografía de intoxicación e incluso

mortandad de animales por beber agua con presencia masiva de cianobacterias. También, de irritación por contacto durante la exposición a aguas recreativas y daños a la salud humana causados por cianobacterias tóxicas bien por contacto directo, ingestión o por inhalación. Estos problemas hacen que las distintas administraciones presten una mayor vigilancia de las aguas destinadas a consumo humano, baño o usos recreativos. En concreto, como ya se ha descrito en el *Capítulo 1*; la legislación española incluye a las cianobacterias en el *RD 1341/2007 sobre la gestión de la calidad de las aguas de baño*, estableciendo tres niveles de probabilidad para la proliferación de cianobacterias (bajo, medio y alto) en base a los datos obtenidos en dos años de intensiva vigilancia, y a la MC en el *RD 140/2003 por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano en España*, fijando un valor paramétrico a cumplir de 1 µg/L de MC.



**Figura 4.3.** Mapa de las cuencas y vertientes hidrográficas (<http://www.iagua.es/2007/11/el-nuevo-mapa-del-agua-en-espana-organismos-de-cuenca-demarcaciones-hidrograficas-y-autoridades-competentes/> del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente).

Tabla 4.3. Muestras de aguas superficiales analizadas.

Nº muestra	Muestra	Embalse	Cuenca	Río	Localización	Fecha
1	20					19/07/2007
2	22	Aguilar de Campoo		Pisuerga	Palencia	19/07/2007
3	23					21/08/2007
4	Aguilar					09/01/2008
5	Pozo					17/07/2007
6	45	Cuerda del Pozo		Duero	Soria	25/06/2008
7	53					31/07/2008
8	61		Duero			04/09/2008
9	42					17/06/2008
10	56	El Milagro		Almar	Ávila	19/08/2008
11	63					16/09/2008
12	43					18/06/2008
13	57	Santa Teresa		Tormes	Salamanca	20/08/2008
14	64					17/09/2008
15	98					17/09/2008
16	44					19/06/2008
17	58	Villagonzalo				21/08/2008
18	65					18/09/2008
19	48					09/07/2008
20	55	La Fresneda	Guadalquivir	Fresneda		06/08/2008
21	67					24/09/2008
22	49					08/07/2008
23	54	El Vicario		Guadiana	Ciudad Real	05/08/2008
24	66		Guadiana			23/09/2008
25	50	La Vega de Jabalón		Jabalón		10/07/2008
26	68					25/09/2008
27	41					12/06/2008
28	51	Cazalegas			Toledo	17/07/2008
29	60					02/09/2008
30	47			Alberche		03/07/2008
31	62	El Burguillo			Ávila	27/08/2008
32	69					08/10/2008
33	46					27/06/2008
34	52					28/07/2008
35	59	Miraflores	Tajo	Miraflores	Madrid	28/08/2008
36	70					08/10/2008
37	104					08/10/2008
38	12					13/06/2007
39	13					05/07/2007
40	14	Rosarito		Tietar	Toledo	14/08/2007
41	15					10/09/2007
42	16					24/10/2007
43	22	Valmayor		Aulencia	Madrid	26/07/2007
44	49					10/10/2007

Continuación Tabla 4.3. Muestras de aguas superficiales analizadas.

Nº muestra	Embalse	Cuenca	Río	Localización	Fecha
45	Foix	Cataluña Interna	Foix	Tarragona	10/06/2009
46					04/09/2009
47					16/09/2010
48	Boadella		Muga	Girona	04/09/2009
49	Gaià		Gaià	Tarragona	16/09/2010
50	La Pedrera		Riera de Caldes	Barcelona	24/10/2013
51	Oliana	Ebro	Segre	Lleida	04/09/2009
52	Rialb				
53	Santa Ana				
54	Caldas o A Baxe	Galicia	Umia	Pontevedra	
55	As Forcadas	Costa	Forcadas	La Coruña	20/10/2010
56					02/10/2013
57	Las Conchas		Limia	Orense	29/04/2011
58					12/09/2013
59					19/04/2011
60	Vilasouto	Miño-Sil	Mao	Lugo	
61	Cachamuiña		Loña	Orense	02/10/2013
62	Castadón				
63	Los Peares		Miño	Lugo	
64	Alcántara		Tajo	Cáceres	14/07/2009
65	Pedrezuela		Guadalix- Pedrezuela		05/05/2010
66			-		19/05/2010
67	Embalses del CYII <sup>a</sup>	Tajo	-	Madrid	22/07/2010
68			-		12/06/2012
69	31_El Atazar		Lozoya		28/07/2011
70	32_El Atazar				
71	San Juan		Alberche		17/09/2013

<sup>a</sup> La referencia de la muestra no indicaba el embalse de procedencia.

Tabla 4.4. Características generales de los embalses en estudio.

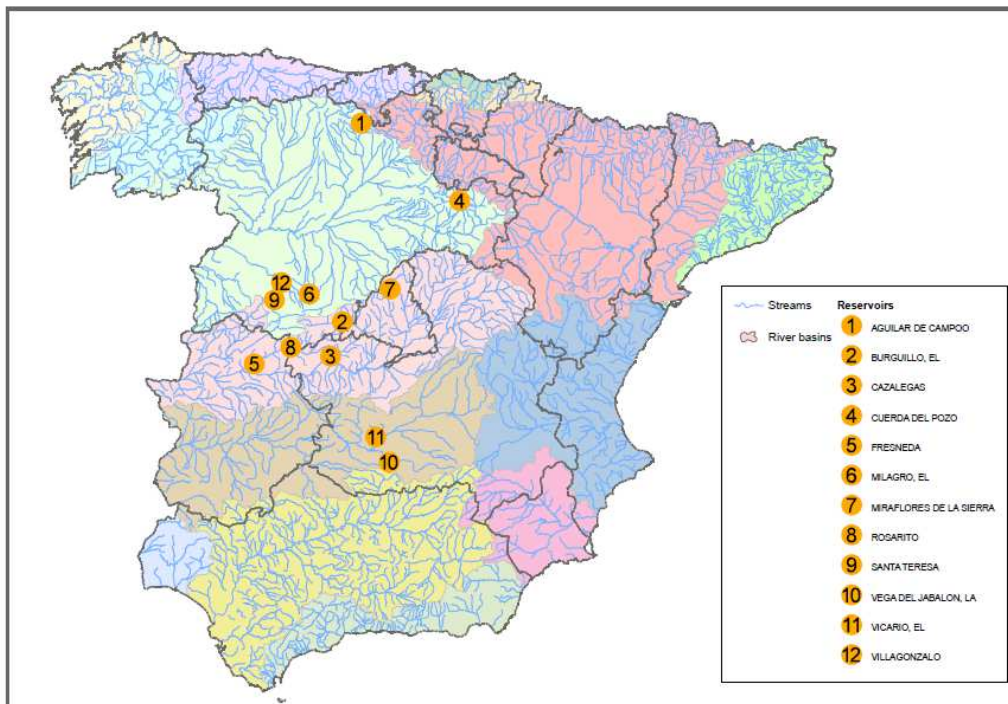
Embalse	Año terminación	Cuenca	Río	Localización	Tipo	Volumen (hm <sup>3</sup> )	Superficie (ha)	Destino
Foix	1928	Cataluña Interna	Foix	Tarragona	Gravedad	4	66	Riego
Boadella	1969		Muga	Girona		61	363	Riego/Abastecimiento/Energía
Gaià	1978		Gaià	Tarragona	Materiales sueltos núcleo arcilla	59	326	Riego/Abastecimiento/Usos Industriales
La Pedrera	-		Riera de Caldes	Barcelona	-	-	-	
Aguilar de Campoo	1963	Duero	Pisuerga	Palencia	Gravedad	247	1646	Riego/Energía
Cuerda del Pozo	1941		Duero	Soria		229	2176	Riego/Abastecimiento/Energía
El Milagro	1973		Almar	Ávila		2	16	Abastecimiento
Sta. Teresa	1960		Tormes	Salamanca		496	2663	Energía
Villagonzalo	1965		Tormes	Salamanca		6	208	Riego/Abastecimiento
Oliana	1959	Ebro	Segre	Lleida	Gravedad	101	443	Riego/Energía
Rialb	2000		Segre	Lleida		404	1505	Riego/Abastecimiento/Energía
Santa Ana	1961		Noguera Ribagorzana	Huesca		237	792	Riego/Abastecimiento/Energía
Caldas o A Baxe	1998	Galicia Costa	Umia	Pontevedra	Arco Gravedad	7	82	Energía
As Forcadas	Años 90		Forcadas	La Coruña	-	11	151	Abastecimiento/Energía
La Fresneda	1987	Guadalquivir	Fresneda		Arco Gravedad	13	243	Abastecimiento
El Vicario	1973	Guadiana	Guadiana	Ciudad Real	Gravedad	31	636	Riego/Usos Industriales
La Vega de Jabalón	1955		Jabalón		Gravedad/tierra (PG/TE)	33	646	Riego/Energía
Cachamuiña	1954	Miño Sil	Loña	Orense	Gravedad	27	2	Riego/Abastecimiento
Castadón	1929		Limia			0	5	Abastecimiento
Las Conchas	1949		Miño			72	631	Energía
Los Peares	1955		Miño	Lugo		182	535	Abastecimiento/Energía
Vilasouto	1969		Mao			21	111	Riego/Abastecimiento
Alcántara	1969	Tajo	Tajo	Cáceres	Hormigón compactado	3160	10400	Riego/Abastecimiento/Energía
Cazalegas	1949		Alberche	Toledo	Gravedad y Materiales sueltos homogénea	7	150	Derivación
El Atazar	1972		Lozoya	Madrid	Bóveda	426	1070	Riego/Abastecimiento/Energía
El Burguillo	1913		Alberche	Ávila	Gravedad	201	910	Riego
Miraflores	1975		Miraflores (Guadalix)	Madrid	-	243	5	Riego/Abastecimiento
Pedrezuela	1967		Pedrezuela(Guadalix)		Arco Gravedad	41	393	Riego/Abastecimiento/Energía
Rosarito	1958		Tiétar	Toledo	Gravedad	85	1475	Riego/Energía
San Juan	1955		Alberche	Madrid		138	650	Riego/Usos Industriales
Valmayor	1975		Aulencia		Escollera	124	755	Abastecimiento

-: Dato no disponible.

**Estudio embalses del centro de España (2007 y 2008)**

Inicialmente, durante los años 2007 y 2008, se realizó un seguimiento de la aparición de floraciones en diferentes embalses de la geografía española para realizar un inventario de la presencia de cianobacterias y las diferentes variantes de MCs asociadas y caracterizar dichos embalses. Este estudio se realizó en el contexto de un convenio de colaboración con el Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas (CEDEX), para atender al cumplimiento de las actuaciones de “Realización de análisis de Biotoxinas. Metodología analítica aplicada a aguas continentales” derivadas del Convenio de Ingresos “Realización de determinaciones analíticas en puntos de control de las redes de calidad de aguas subterráneas” suscrito con la Dirección General del Agua de la Secretaría General para el territorio y la Biodiversidad.

Se analizaron 44 muestras (ver la lista de muestras en la *Tabla 4.3*) de 12 embalses (Aguilar de Campoo, Cuerda del Pozo, El Milagro, Santa Teresa, Villagonzalo, La Fresneda, El Vicario, La Vega de Jabalón, Cazalegas, El Burguillo, Miraflores y Rosarito) con diferentes características y usos (ver *Tabla 4.2*) distribuidos en el centro de España (Castilla León, Madrid y Castilla La Mancha), como se muestra en el mapa de la *Figura 4.4*.



**Figura 4.4.** Mapa de los embalses del centro de España (Castilla León, Madrid y Castilla La Mancha) estudiados durante dos años (2007 y 2008) en el marco del convenio de colaboración entre el Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas (CEDEX) y nuestro laboratorio según convenio de ingresos “Realización de determinaciones analíticas en puntos de control de las redes de calidad de aguas subterráneas” suscrito con la Dirección General del Agua de la Secretaría General para el territorio y la Biodiversidad.

En la *Figura 4.5* se muestran las fotografías de cuatro de los embalses en estudio: Rosarito, El Vicario, Aguilar de Campoo y El Milagro.



**Figura 4.5.** Fotografías de los embalses Rosarito, El Vicario, Aguilar de Campoo y El Milagro.

Las muestras fijadas con solución de Lugol se sedimentaron y se observaron usando un microscopio invertido (CEDEX, 2008). Los estudios taxonómicos se realizaron utilizando el método de Utermöhl's (Sournia, 1978). Se identificaron las especies en 100x 200x 400x y 1000x, de acuerdo con sus tamaños. La *Tabla 4.5* resume la diversidad taxonómica de los tres órdenes de cianobacterias: Chroococcales, Nostocales y Oscillatoriales, que mostraron los embalses estudiados.

En Vega de Jabalón, Vicario y Rosarito se detectó una mayor variedad de órdenes de cianobacterias. Las especies encontradas concuerdan con las descritas en otros estudios anteriores realizados en España (De Hoyos y col., 2003; De Hoyos y col., 2004). Muchas de estas especies son capaces de producir toxinas: *Anabaena flos-aquae*, *Anabaena sp*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis sp*, *Planktothrix agardhii* (Cronberg y col., 1999; Fastner y col., 2001; Henriksen y Moestrup, 1997; Sivonen y Jones, 1999). En ocho de los embalses estudiados (Rosarito, Aguilar de Campoo, Burguillo, Cazalegas, Cuerda del Pozo, Vega Jabalón, Miraflores y El Vicario) se detectaron estas especies potencialmente tóxicas. Como en otros estudios sobre como las condiciones ambientales determinan la distribución de cianobacterias en diferentes ecosistemas de agua dulce (Dolman y col., 2012; Reynolds y col., 2002), se encontró una gran diversidad de tipo de cianobacterias



en cada embalse. De hecho, se ha observado que para algunas masas de agua, las especies dominantes son siempre las mismas, mientras que en otros, diferentes especies pueden florecer al mismo tiempo o sucesivamente. Incluso, recientemente, nuevas especies invasoras se han descrito en lagos europeos. Por ejemplo, *Cylindrospermopsis raciborskii*, una cianobacteria típica de zonas tropicales (Australia, América del Sur,...) se está detectando cada vez con más frecuencia desde finales del siglo pasado en numerosos lagos europeos probablemente en relación con el calentamiento climático (Briand y col., 2004).

**Tabla 4.5.** Cianobacterias detectadas en las muestras de agua superficial de los embalses del centro de España (año 2007 y 2008).

Embalse	Orden	Especies dominantes
Aguilar de campoo	Chroococcales	<i>Microcystis aeruginosa</i>
	Chroococcales	<i>Woronichinia</i> sp.
Cuerda del pozo	Nostocales	<i>Anabaena</i> cf. <i>Crassa</i>
		<i>Anabaena</i> sp.
		<i>Aphanizomenon</i> sp.
El Milagro	Nostocales	<i>Anabaena mendotae</i>
		<i>Aphanothece</i> cf. <i>Bachmannii</i>
Santa teresa	Chroococcales	<i>Aphanothece</i> cf. <i>Floccosa</i>
		<i>Woronichinia</i> sp.
		Chroococcales no identificada
Villagonzalo	Chroococcales	<i>Woronichinia</i> sp.
	Nostocales	<i>Anabaena circinalis</i>
La Fresneda	Chroococcales	<i>Woronichinia</i> sp.
	Nostocales	<i>Aphanizomenon</i> sp.
	Oscillatoriales	<i>Pseudanabaena</i> cf. <i>Catenata</i>
		<i>Anabaena</i> sp.
El Vicario	Nostocales	<i>Anabaenopsis</i> cf. <i>Circularis</i>
		<i>Anabaenopsis cunnigtonii</i>
		<i>Glaucospira</i> sp.
	Oscillatoriales	<i>Limnothrix redekei</i>
		<i>Planktothrix agardhii</i>
		<i>Pseudanabaena limnetica</i>
	No identificada	Cyanophyceae no identificada
Vega de Jabalon	Chroococcales	<i>Merismopedia tenuissima</i>
	Nostocales	<i>Anabaena</i> sp.
		<i>Aphanizomenon aphanizomenoides</i>
		<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>
		<i>Raphidiopsis</i> sp.
	Oscillatoriales	<i>Planktolyngbya</i> sp.
		<i>Planktothrix agardhii</i>
<i>Pseudanabaena limnetica</i>		
Oscillatoriales no identificada		
Cazalegas	Chroococcales	<i>Merismopedia</i> sp.
		<i>Microcystis</i> sp.
	Nostocales	<i>Woronichinia</i> sp.
		<i>Anabaena</i> sp.

**Continuación Tabla 4. 5.** Cianobacterias detectadas en las muestras de agua superficial de los embalses del centro de España (año 2007 y 2008).

Embalse	Orden	Especies dominantes
El Burguillo	Chroococcales	<i>Woronichinia</i> sp.
		Chroococcales no identificada
	Nostocales	<i>Anabaena</i> cf. <i>Crassa</i>
		<i>Anabaena flos-aquae</i>
		<i>Aphanizomenon</i> sp.
Nostocales no identificada		
Miraflores	Oscillatoriales	<i>Planktothrix agardhii</i>
		<i>Pseudoanabaena voronichinii</i>
Rosarito	Chroococcales	<i>Planktothrix agardhii</i>
		<i>Planktolyngbya</i> spp.
	Nostocales	<i>Aphanizomenon aphanizomenoides</i>
		<i>Anabaena flos-aquae</i>
		<i>Raphidiopsis mediterránea</i>
	Oscillatoriales	<i>Limnothrix redekei</i>
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>		

Las muestras se filtraron en el momento de la toma de muestra. Se recibieron por separado el agua filtrada y el filtro. No se nos enviaron los filtros de las muestras 20-Aguilar, Aguilar, 104-Miraflores, 98-Sta Teresa, 22 y 49-Valmayor, ni el agua de la muestra Cuerda del Pozo. El agua se ha extraído por SPE en línea, el filtro por extracción en metanol acidificado y el análisis de MCs en las dos fracciones se ha realizado por LC-ESI(+)-MS en el QqQ según la metodología puesta a punto en la presente tesis y las condiciones resumidas en el apartado 2.3 del Capítulo 2. En las Figura 4.6 y 4.7 se muestran, a modo de ejemplo, los cromatogramas LC-ESI-MS del TIC y de las especies detectadas en una de las muestras extrayendo su relación  $m/z$ , el filtro de la muestra 16-Rosarito, y los respectivos espectros de masas. En esta muestra se han detectado tres MCs (-dmRR, -RR y -YR) y tres anabaenopeptinas (B, F y G). En los espectros de masas se han indicado las señales de tipo  $[M+H]^+$  y  $[M+2H]^{2+}$ .

En las Tablas 4.6 y 4.7 se recogen a modo de resumen las concentraciones de las MCs encontradas en los diferentes extractos. Se han cuantificado las MCs de las que se disponía de patrón comercial en el momento del análisis (MC-LR, -RR y -YR). Por su significación y elevado nivel en las muestras analizadas también se estimó la concentración de la variante desmetilada de la MC-RR ( $m/z$  513,0), que ya había sido detectada de forma frecuente en blooms de cianobacterias de otros embalses españoles (Barco y col., 2004). Al no disponer de patrón para poder comparar tiempo de retención y espectro de masas de esta variante, su concentración se estimó respecto a la MC-RR por similitud en tiempo de retención y espectro de masas.

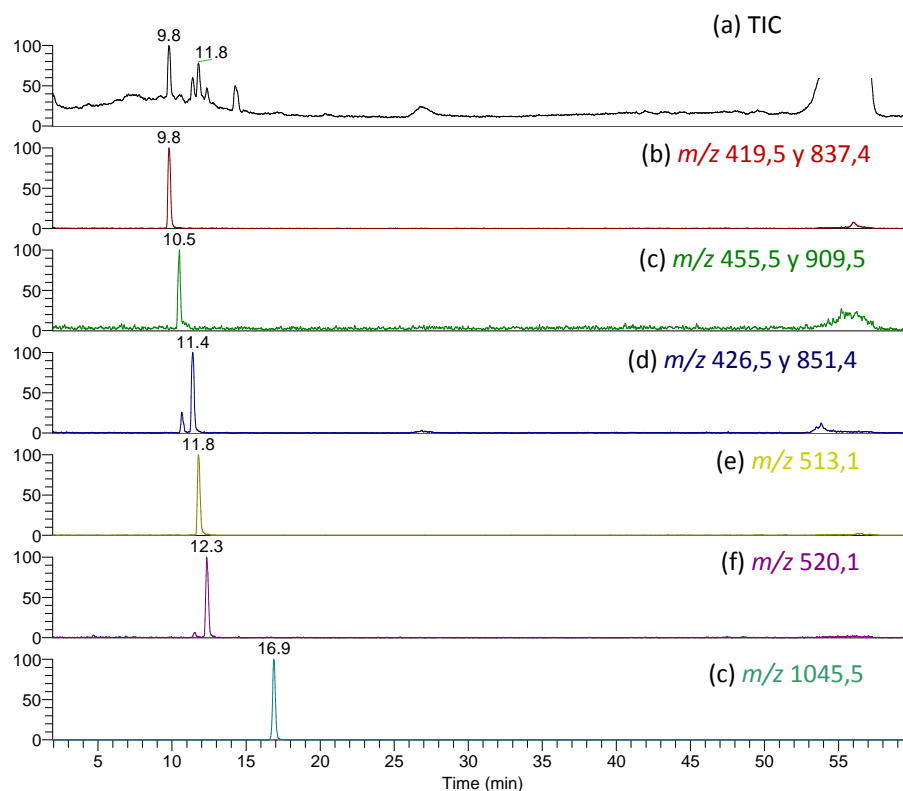


Figura 4.6. Cromatogramas LC-ESI-MS del TIC y de las señales detectadas en el filtro de la muestra 16-Rosarito mediante LC-ESI-MS (QqQ).

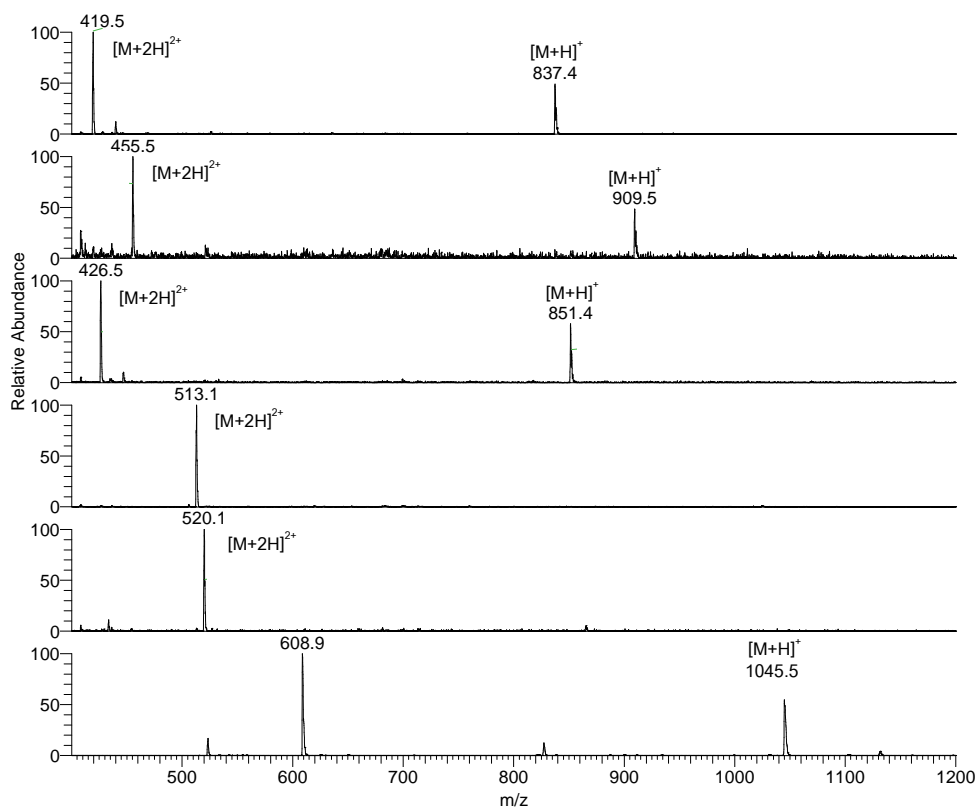


Figura 4.7. Espectros de masas de las señales detectadas en el filtro de la muestra 16-Rosarito mediante LC-ESI-MS (QqQ): (a) anabaenopetin B; (b) anabaenopeptin G; (c) anabaenopeptin F; (d) MC-dmRR; (e) MC-RR; y, (f) MC-YR.

Los intervalos de concentración total de MC extra- e intracelular oscilaron entre 0,031-0,20 y 0,020-14,6 µg/L, respectivamente. Ninguna de las muestras de agua superó el límite para "MC" (variantes no precisadas) de 1 µg/L del RD 140/2003 que establece los criterios sanitarios de la calidad del agua para consumo humano en la legislación española. En otros estudios se han determinado niveles totales de MC similares: de 21 ng/L hasta más de 70 µg/L intracelularmente (Carrasco y col., 2006); por debajo de 10 µg/L en la fracción particulada (Fastner y col., 1999); y entre 0,032 y 0,170 µg/L en la fracción disuelta (Aboal y col., 2005). Además, en la mayoría de las muestras de agua (88%) no se detectaron MCs. En cambio, en el 45% de los filtros (fracción intracelular) se determinaron MCs, y en concreto siete de estas muestras mostraron un nivel intracelular de MC total superior al nivel legislado. Estas concentraciones representan un riesgo potencial debido a que las cianobacterias podrían liberar las toxinas internas al agua. Se ha observado en estudios previos de episodios de *bloom* de cianobacterias que es necesario un período de tres días a tres semanas para la inducción de la liberación de toxinas por degradación en aguas naturales (Poon y col., 2001). Es posible que este sea el motivo por el que no se detectaron concentraciones extracelulares de MC significativas en estas muestras.

En general, en el 50% de las muestras se detectaron MC extracelulares, intracelulares o ambas. Se identificaron cuatro variantes de MC: -LR, -RR, -YR, y -dmRR. La MC-YR no se detectó en la fracción acuosa (extracelular). La MC-RR y -dmRR fueron las variantes más habituales y detectadas a un nivel de concentración mayor, se observaron en los embalses de Aguilar de Campoo, Cuerda del Pozo, El Vicario, La Vega de Jabalón, Cazalegas, Miraflores, Rosarito y Valmayor. En la *Figura 4.7* se puede observar el espectro de masas de la MC-dmRR en la muestra 16-Rosarito que al igual que la MC-RR presenta una señal mayoritaria  $[M+2H]^{2+}$  característica de la presencia de 2 aminoácidos Arg en su estructura y una señal  $[M+H]^+$  minoritaria. No se detectaron MCs en las fracciones extra- e intracelulares de los embalses de El Milagro, Villagonzalo, La Fresneda y el Burguillo ni en las aguas de Cuerda del Pozo, Cazalegas, Miraflores y Rosarito. Sin embargo, Rosarito es el embalse que presentó la concentración intracelular de MC-RR, -YR y -dmRR mayor. La MC-YR también se detectó en Cuerda del Pozo, El Vicario y Cazalegas. Finalmente la MC-LR se asoció a los embalses de Aguilar de Campoo, Cuerda del Pozo, Cazalegas y Miraflores. En la fracción sestónica (intracelular) se observaron otras posibles MCs, identificadas a partir de su espectro de masas individual, ver *Tabla 4.8*.

**Tabla 4.6.** Concentración extracelular (en µg/L) de las MCs cuantificadas por SPE en línea a LC-ESI-MS/MS en las muestras de agua superficial de los embalses del centro de España (Castilla León, Madrid y Castilla La Mancha) durante los años 2007 y 2008.

Fecha	Muestra	MC-RR	MC-YR	MC-LR	MC-dmRR	MC Total *
19/07/2007	20_Aguilar	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
19/07/2007	22_Aguilar	n.d.	n.d.	<b>0,03</b>	n.d.	<b>0,03</b>
21/08/2007	23_Aguilar	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
09/01/2008	Aguilar	<b>&lt;LOQ</b>	n.d.	<b>0,03</b>	n.d.	<b>0,03</b>
25/06/2008	45_Cuerda del pozo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
31/07/2008	53_Cuerda del pozo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
04/09/2008	61_Cuerda del pozo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
17/06/2008	42_Milagro	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
19/08/2008	56_Milagro	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
16/09/2008	63_Milagro	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
18/06/2008	43_Sta teresa	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
20/08/2008	57_Sta teresa	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
17/09/2008	64_Sta teresa	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
17/09/2008	98_Sta teresa	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
19/06/2008	44_Villagonzalo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
21/08/2008	58_Villagonzalo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
18/09/2008	65_villagonzalo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
09/07/2008	48_Fresneda	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
06/08/2008	55_Fresneda	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
24/09/2008	67_Fresneda	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
08/07/2008	49_Vicario	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
05/08/2008	54_Vicario	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
23/09/2008	66_Vicario	n.d.	n.d.	n.d.	<b>0,07</b>	<b>0,07</b>
10/07/2008	50_Jabalon	n.d.	n.d.	n.d.	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>
25/09/2008	68_Jabalon	n.d.	n.d.	n.d.	<b>0,20</b>	<b>0,20</b>
12/06/2008	41_Cazalegas	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
17/07/2008	51_Cazalegas	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
02/09/2008	60_Cazalegas	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
03/07/2008	47_Burguillo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
27/08/2008	62_Burguillo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
08/10/2008	69_Burguillo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
27/06/2008	46_Miraflores	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
28/07/2008	52_Miraflores	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
28/08/2008	59_Miraflores	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
08/10/2008	70_Miraflores	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
08/10/2008	104_Miraflores	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
13/06/2007	12_Rosarito	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
05/07/2007	13_Rosarito	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
14/08/2007	14_Rosarito	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
10/09/2007	15_Rosarito	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
24/10/2007	16_Rosarito	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
26/07/2007	22_Valmayor	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
10/10/2007	49_Valmayor	n.d.	n.d.	n.d.	<b>0,02</b>	<b>0,02</b>

n.d.: no detectado.

LOQ: límite de cuantificación del método (0,02 µg/L).

\* MC Total es la suma de las variantes: MC-LR, -RR, -YR y -dmRR.

**Tabla 4. 7.** Concentración intracelular (en µg/L) de las MCs cuantificadas por LC-ESI-MS/MS en los filtros de las muestras de agua superficial de los embalses del centro de España (Castilla León, Madrid y Castilla La Mancha) durante los años 2007 y 2008.

Fecha	Muestra	MC-RR	MC-YR	MC-LR	MC-dmRR	Total MC*
19/07/2007	22_Aguilar	<b>0,07</b>	n.d.	n.d.	n.d.	<b>0,07</b>
21/08/2007	23_Aguilar	<b>0,02</b>	n.d.	n.d.	n.d.	<b>0,02</b>
17/07/2007	Cuerda del pozo	<b>0,02</b>	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>	n.d.	<b>0,08</b>
25/06/2008	45_Cuerda del pozo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
31/07/2008	53_Cuerda del pozo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
04/09/2008	61_Cuerda del pozo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
17/06/2008	42_Milagro	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
19/08/2008	56_Milagro	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
16/09/2008	63_Milagro	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
18/06/2008	43_Sta teresa	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
20/08/2008	57_Sta teresa	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
17/09/2008	64_Sta teresa	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
19/06/2008	44_Villagonzalo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
21/08/2008	58_Villagonzalo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
18/09/2008	65_Villagonzalo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
09/07/2008	48_Fresneda	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
06/08/2008	55_Fresneda	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
24/09/2008	67_Fresneda	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
08/07/2008	49_Vicario	n.d.	<b>0,54</b>	n.d.	<b>2,6</b>	<b>3,2</b>
05/08/2008	54_Vicario	n.d.	n.d.	n.d.	<b>0,77</b>	<b>0,77</b>
23/09/2008	66_Vicario	<b>0,22</b>	n.d.	n.d.	<b>0,47</b>	<b>0,69</b>
10/07/2008	50_Jabalón	<b>0,16</b>	n.d.	n.d.	<b>0,49</b>	<b>0,65</b>
25/09/2008	68_Jabalón	<b>0,56</b>	n.d.	n.d.	<b>1,5</b>	<b>2,1</b>
12/06/2008	41_Cazalegas	<b>0,06</b>	n.d.	n.d.	n.d.	<b>0,06</b>
17/07/2008	51_Cazalegas	<b>0,41</b>	n.d.	<b>0,20</b>	n.d.	<b>0,61</b>
02/09/2008	60_Cazalegas	<b>0,26</b>	<b>0,24</b>	<b>0,26</b>	n.d.	<b>0,76</b>
03/07/2008	47_Burguillo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
27/08/2008	62_Burguillo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
08/10/2008	69_Burguillo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
27/06/2008	46_Miraflores	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
28/07/2008	52_Miraflores	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
28/08/2008	59_Miraflores	<b>0,15</b>	n.d.	<b>0,18</b>	n.d.	<b>0,33</b>
08/10/2008	70_Miraflores	<b>0,06</b>	n.d.	<b>0,06</b>	n.d.	<b>0,12</b>
13/06/2007	12_Rosarito	<b>1,2</b>	n.d.	n.d.	<b>0,50</b>	<b>1,7</b>
05/07/2007	13_Rosarito	<b>1,4</b>	n.d.	n.d.	<b>0,53</b>	<b>1,9</b>
14/08/2007	14_Rosarito	<b>4,2</b>	n.d.	n.d.	<b>3,0</b>	<b>7,2</b>
10/09/2007	15_Rosarito	<b>7,9</b>	<b>1,1</b>	n.d.	<b>5,7</b>	<b>14,7</b>
24/10/2007	16_Rosarito	<b>4,0</b>	<b>0,43</b>	n.d.	<b>5,3</b>	<b>9,7</b>

LOQ: límite de cuantificación del método (0,01 µg/L).

\* MC Total es la suma de las variantes: MC-LR, -RR, -YR y -dmRR.

**Tabla 4.8.** Otras señales identificadas mediante LC-ESI-MS/MS como posibles variantes de MCs en las muestras de agua superficial de los embalses del centro de España (Castilla León, Madrid y Castilla La Mancha) durante los años 2007 y 2008.

[M+H] <sup>+</sup> / [M+2H] <sup>2+</sup> <sup>a</sup>	Identificación provisional	Muestra
491,5 (981,5)	MC-dmLR	Rosarito 15
597,6 (1193,8)	No identificada	Rosarito 13; Jabalón 68; Vicario 66
902,0	No identificada	Vicario 66
909,6	No identificada	Santa Teresa 64
916,5	No identificada	Jabalón 50, 68; Vicario 54, 66
941,7	MC-LAba, [D-Asp <sup>3</sup> ,Glu(OMe)]MC-LAba o [D-Asp <sup>3</sup> ]MCY-LV	Santa Teresa 57, 64
(436,3) 978,3	No identificada	Santa Teresa 57, 64
(511,5) 1021,6	MC-AW, MC-WA, MC-OiaA o [L-Ser <sup>7</sup> ]MC-LR	Miraflores 59, 70; Santa Teresa 64
(540,4) 1079,6	[ADMAdda <sup>5</sup> ,MeSer <sup>7</sup> ]MC-LR	Santa Teresa 57, 64
1111,5	[D-Asp <sup>3</sup> ,ADMAdda <sup>5</sup> ,Dhb <sup>7</sup> ]MC-HtyR o [D-Asp <sup>3</sup> ,ADMAdda <sup>5</sup> ]MC-HtyR	Santa Teresa 64
1149,8	No identificada	Vicario 66

<sup>a</sup> Entre paréntesis se indica la señal menos intensa del espectro de masas.

En las muestras de Santa Teresa, El Vicario, La Vega de Jabalón y Rosarito también se detectaron dos anabaenopeptinas, anabaenopeptina B, F y G de  $m/z$  837,6; 851,5; y 909,5 como  $[M+H]^+$  y  $m/z$  419,5; 426,4, y 455,5 como  $[M+2H]^{2+}$ , respectivamente. Estos compuestos son péptidos cíclicos con un enlace ureico (ver su estructura química en la *Figura 4.8*) producidos por diferentes géneros de cianobacterias (*Anabaena*, *Nodularia*, *Planktothrix*, *Oscillatoria* y *Aphanizomenon*) considerados como menos tóxicos que las MCs. Sus masas están comprendidas entre 800 y 950, del orden de la nodularina (pentapéptido cíclico). Las señales obtenidas son del tipo  $[M+2H]^{2+}$  y  $[M+H]^+$ . En la *Figura 4.7* se pueden observar los espectros de masa de las anabaenopeptinas B, G y F en la muestra 16-Rosarito. De acuerdo con otros autores, algunas géneros y especies de cianobacterias como la *Microcystis aeruginosa* y la *Planktothrix rubescens* han demostrado ser una fuente rica de péptidos cíclicos únicos, tales como las anabaenopeptinas (Barco y col., 2004; Erhard y col., 1997 y 1999).

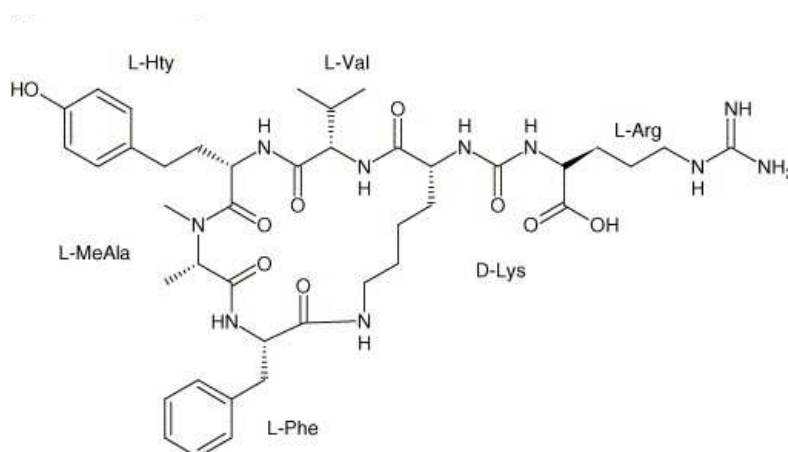


Figura 4.8. Estructura de la anabaenopeptina B.

Mediante los métodos de fragmentación y LC-ESI-HRMS se pudo confirmar la identificación de la MC-dmRR y las dos anabaenopeptinas en todas las muestras y de la MC-dmLR en la muestra de 15-Rosarito por identificación de los fragmentos característicos de cada MC y obteniendo la masa exacta de los iones moleculares y de los fragmentos con una exactitud inferior a 3 ppm. Las otras señales no se pudieron confirmar por baja sensibilidad y/o falta de muestra suficiente para realizar los experimentos.

Las muestras también se analizaron por bioensayo de *Artemia salina*. El bioensayo se realizó por triplicado con los extractos de la fracción sestónica en microplacas de 96 pocillos. En algunos casos, la LD<sub>50</sub> no se pudo calcular, y la muestra se consideró tóxica cuando la relación entre el volumen de extracto y el número de *Artemia salina* muertas fue directamente proporcional. El 50 % del total de las 22 muestras resultaron tóxicas. Estos valores son similares a los indicados en otros países: 72% en Alemania (Fastner y col., 1999), 66% en Dinamarca (Henriksen y Moestrup, 1997) y 74% en Canada (Kotak y col., 1995). En países Mediterraneos, el 70% de las muestras en Francia (Vezie y col., 1998), el 60% en Portugal (Vasconcelos, 1994) y todas las floraciones analizadas en Grecia (Cook y col., 2004) fueron tóxicas.

Se cruzaron los datos de toxicidad, taxonomía y nivel de toxina pero no se llegó a conclusiones relevantes. La complejidad de las muestras (se detectaron varias órdenes y especies de cianobacteria en cada muestra) hizo imposible encontrar una relación directa entre las MCs identificadas por LC-MS y las cianobacterias observadas. Los resultados del estudio de toxicidad con *Artemia salina* se muestran en la *Tabla 4.9* y se comparan con la concentración total de MC cuantificada por LC-MS y calculada como la suma de las concentraciones de MC-LR, -RR, -YR y -dmRR. No se observó correspondencia entre ambos resultados. Esto probablemente se podría atribuir a posibles efectos sinérgicos y antagonistas producidos por otras toxinas y/o contaminantes presentes en las muestras de agua.



**Tabla 4. 9.** Resultados del estudio de toxicidad con *Artemia salina* y concentración total de MCs en los filtros (fracción sestónica o intracelular) analizados por LC-MS.

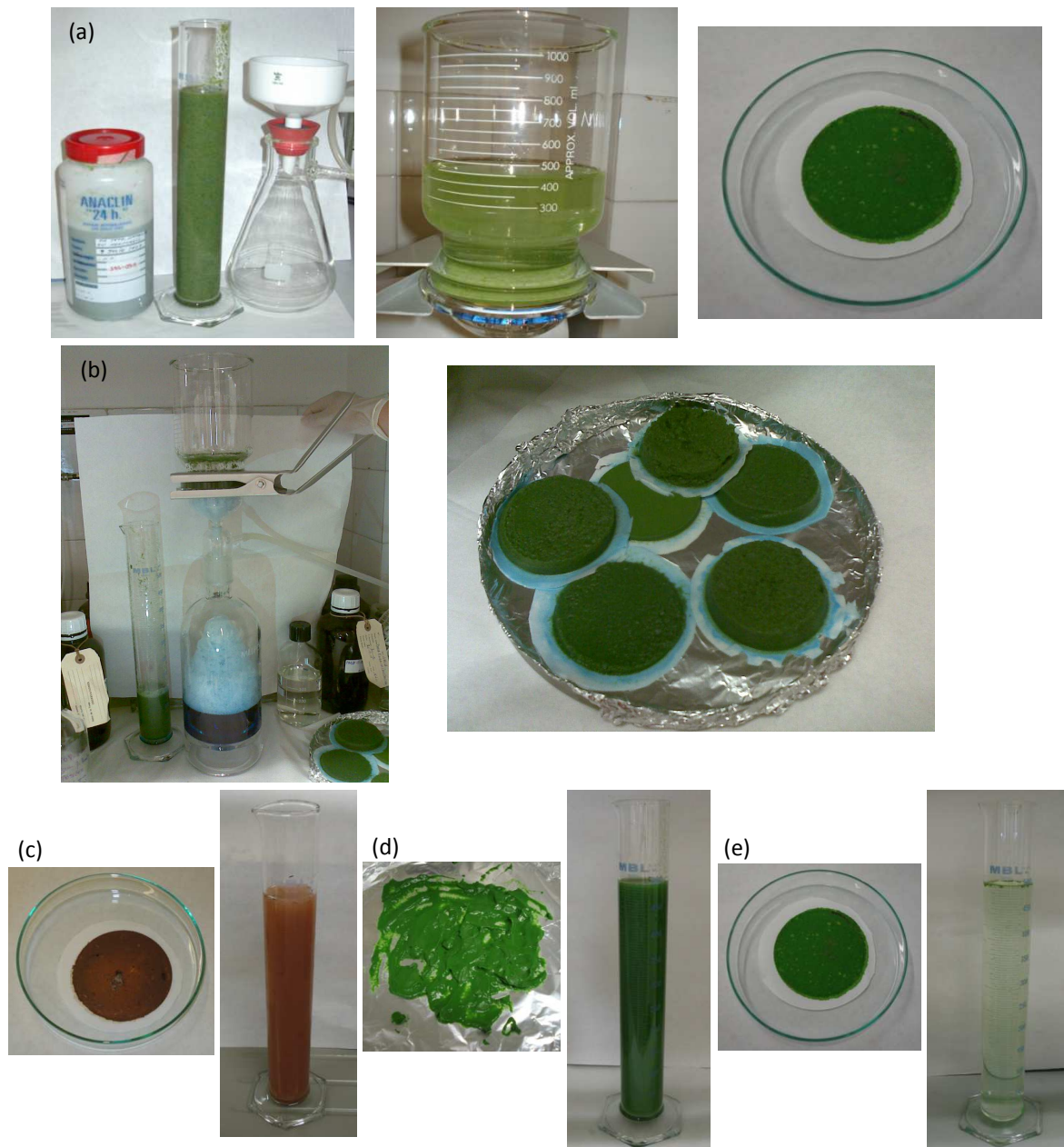
Fecha	Muestra	Toxicidad	MC Total ( $\mu\text{g/L}$ ) <sup>a</sup>
19/07/2007	22_Aguilar	No tóxico	<b>0,07</b>
21/08/2007	23_Aguilar	No tóxico	<b>0,02</b>
25/06/2008	45_Cuerda del pozo	<b>Tóxico</b>	n.d.
18/06/2008	43_Sta teresa	<b>Tóxico</b>	n.d.
17/09/2008	64_Sta teresa	<b>Tóxico</b>	n.d.
06/08/2008	55_Fresneda	<b>Tóxico</b>	n.d.
24/09/2008	67_Fresneda	<b>Tóxico</b>	n.d.
08/07/2008	49_Vicario	<b>Tóxico</b>	<b>3,2</b>
05/08/2008	54_Vicario	<b>Tóxico</b>	<b>0,76</b>
23/09/2008	66_Vicario	No tóxico	<b>0,70</b>
10/07/2008	50_Jabalon	<b>Tóxico</b>	<b>0,66</b>
25/09/2008	68_Jabalon	<b>Tóxico</b>	<b>2,0</b>
12/06/2008	41_Cazalegas	No tóxico	<b>0,06</b>
17/07/2008	51_Cazalegas	No tóxico	<b>0,61</b>
02/09/2008	60_Cazalegas	No tóxico	<b>0,76</b>
28/08/2008	59_Miraflores	<b>Tóxico</b>	<b>0,34</b>
08/10/2008	70_Miraflores	No tóxico	<b>0,12</b>
13/06/2007	12_Rosarito	No tóxico	<b>1,7</b>
05/07/2007	13_Rosarito	No tóxico	<b>1,9</b>
14/08/2007	14_Rosarito	No tóxico	<b>7,3</b>
10/09/2007	15_Rosarito	<b>Tóxico</b>	<b>15</b>
24/10/2007	16_Rosarito	No tóxico	<b>9,7</b>

n.d.: no detectado.

<sup>a</sup> MC Total es la suma de las variantes: MC-LR, -RR, -YR y -dmRR.

**Otros embalses (2009-2013)**

Entre los años 2009 y 2013 recibimos diferentes muestras de las cuencas Cataluña Interna, Ebro, Galicia Costa, Miño-Sil y Tajo (ver *Tabla 4.3*) en presencia aparente de *bloom*. En ninguna de las muestras recibidas de los 3 embalses de la Cuenca del Ebro en el año 2009, Oliana, Rialb y Santa Ana, se detectaron MCs. Destacar las muestras de las floraciones de *Planktothrix rubescens* de Vilasouto (2011) y de *Microcystis aeruginosa* de Alcántara, Caldas, Las Conchas (2011) y Forcadás (2010) por su volumen de contenido de alga (ver *Figura 4.9* con las fotografías de estas muestras y los filtros resultantes con la fracción sestónica).



**Figura 4.9.** Fotografías de las muestras y los filtros resultantes con la fracción sestónica de los blooms de: (a) embalse de Alcántara, *Microcystis aeruginosa*, año 2009; (b) embalse de Las Conchas, *Microcystis aeruginosa*, año 2011; (c) embalse Vilasouto, *Planktothrix rubescens*, año 2011; (d) embalse de Caldas, *Microcystis aeruginosa*, año 2010; y (e) embalse de Forcadás; *Woronichinia naegeliana*, *Anabaena planctónica* y *Microcystis aeruginosa*, año 2010.

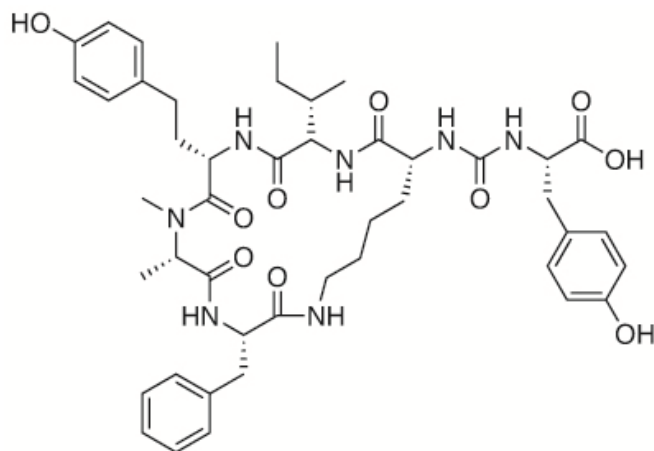
En la *Tabla 4.10* se muestran el género y las especies de cianobacterias dominantes en los embalses estudiados durante los años 2009-2013. La identificación se llevó a cabo por microscopía, permitiendo reconocer los principales géneros y especies que forman la floración en cada masa de agua específica y región geográfica. Esta información básica es esencial en la evaluación del riesgo que representan las cianobacterias potencialmente tóxicas. Para la evaluación de la gestión de riesgos, la identificación de cianobacterias a nivel de género, teniendo en cuenta la taxa potencialmente tóxica, puede ser suficiente porque según lo descrito sobre la producción de cianotoxinas, el contenido de toxinas varía extremadamente en los subgéneros y el nivel de población. De acuerdo con la bibliografía sobre los embalses de la península ibérica (Aboal y col., 2005; Bradt y Villena, 2002; Carrasco y col., 2006; De Hoyos y col., 2004; Quesada y col. 2004; Sobrino y col., 2004), las especies más comunes en las muestras estudiadas son la *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena planctónica*, *Anabaena crassa* y *Planktothrix rubescens*. Todas estas especies pertenecen a géneros identificados como potencialmente tóxicos en diversas muestras ambientales. Como ya hemos introducido, la *Microcystis aeruginosa* es la especie de cianobacteria productora de MC más importante en la región Mediterránea (Cook y col., 2004).

**Tabla 4.10.** Cianobacterias detectadas en los embalses de las muestras de agua superficial (años 2009-2013).

Embalse	Género	Especies dominantes
Alcántara	<i>Microcystis</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>
		<i>Microcystis flos-aquae</i>
Caldas o A Baxe	<i>Microcystis</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>
		<i>Woronichinia</i>
As Forcadas	<i>Woronichinia</i>	<i>Woronichinia naegeliana</i>
	<i>Anabaena</i>	<i>Anabaena planctónica</i>
	<i>Microcystis</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i> .
Vilasouto	<i>Planktothrix</i>	<i>Planktothrix rubescens</i>
	<i>Anabaena</i>	<i>Anabaena planctónica</i>
Las Conchas	<i>Microcystis</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>
	<i>Aphanizomenon</i>	
El Atazar	<i>Microcystis</i>	
	<i>Anabaenopsis</i>	-
	<i>Anabaena</i>	
	<i>Planktothrix</i>	
Las Conchas	<i>Microcystis</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>
San Juan	<i>Microcystis</i>	
	<i>Aphanizomenon</i>	-
Castadón	<i>Microcystis</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>
	<i>Anabaena</i>	<i>Anabaena crassa</i>
Cachamuiña	<i>Microcystis</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>
	<i>Anabaena</i>	<i>Anabaena crassa</i>
Los Peares	<i>Microcystis</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>
As Forcadas	<i>Anabaena</i>	<i>Anabaena planctónica</i>
	<i>Microcystis</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>

El análisis de las muestras se ha realizado siguiendo los métodos desarrollados en esta tesis, descritos en el *Capítulo 2* y resumidos en el *apartado 2.3* y en la *Tabla 2.3* de dicho capítulo. A lo largo de la discusión de los resultados, en cada caso, se indicará brevemente el método utilizado.

En la *Tabla 4.11* se muestra a modo de resumen las variantes identificadas en las muestras, destacando en cada caso la variante mayoritaria. En general las MCs más frecuentes en las muestras analizadas son la MC-RR, -LR y -dmRR. La MC-RR y -LR son variantes de especies de cianobacteria *Microcystis aeruginosa* y la MC-dmRR se ha descrito frecuentemente en *blooms* de *Planktothrix rubescens* (Barco y col., 2004; Fastner y col., 1999). Estas variantes con estructura química diversa han presentado diferencias importantes en cuanto a su toxicidad (Sivonen y Jones, 1999). Los valores de la LD<sub>50</sub> (ratón, intraperitoneal (i. p.) de las diferentes MCs y nodularinas varían desde alrededor de 50 µg/kg a más de 1 mg/kg. La MC-LR junto a la MC-YR han sido identificadas como las MCs más tóxicas, con una toxicidad alrededor de 50 µg/kg, mientras que la MC-RR tiene una toxicidad i. p. mucho más pequeña, de 600 µg/kg. Pequeñas diferencias en la estructura pueden dar lugar a un aumento o disminución pronunciada en la toxicidad, según el caso. Por ejemplo, se han descrito LD<sub>50</sub> de entre 180 a 250 µg/kg para las variantes desmetiladas de la MC-RR. Todas las MCs de floraciones *Planktothrix* que hemos observado en nuestras muestras, y en la literatura revisada, son congéneres Asp<sup>3</sup>, como confirman los patrones de fragmentación y en concordancia con la ruta biosintética. La MC-(H<sub>4</sub>)YR se ha observado en las muestras de los embalses de Cachamuiña, Castadón y San Juan, siendo una variante mayoritaria en las dos primeras muestras. Esta variante se ha confirmado en los dos modos de ionización, positivo y negativo, y ha presentado las señales [M+H]<sup>+</sup> y [M+2H]<sup>2+</sup>. También hemos encontrado MCs análogas desmetiladas en algunas muestras de *Microcystis*, como en la muestra del embalse de Alcántara. La presencia de variantes desmetiladas en floraciones *Microcystis* ha sido descrita anteriormente en muestras de África (Miles, comunicación personal), donde es bastante común, pero no en Europa. Otros péptidos relacionados que se han detectado con elevada frecuencia en las muestras han sido las anabaenopeptinas, al igual que en las muestras de los embalses del centro de España durante los años 2007 y 2008, y la oscillamida Y. Como ya se ha mencionado anteriormente en la presente tesis estos péptidos cíclicos son típicos de las cianobacterias *Microcystis aeruginosa* y *Planktothrix rubescens*. Las anabaenopeptinas observadas de nuevo han sido la B, F y G. La oscillamida Y (ver su estructura en la *Figura 4.10*) es también un hexapéptido cíclico bioactivo con enlace ureico que inhibe a proteínas fosfatasa como la PP1 y la PP2A (Gesner-Apter y Carmeli, 2008) pero considerada como un metabolito secundario no tóxico de cianobacterias de las especies *Microcystis sp.* y *Planktothrix spp.* (Barco y col., 2004; Gesner-Apter y Carmeli, 2008; Sano y col., 2001).



**Figura 4.10.** Estructura de la oscillamida Y.

Una serie de señales no han sido identificadas inequívocamente debido a que existen diversas variantes de MC isobáricas que tienen la misma fórmula empírica y por lo tanto idéntica masa exacta. El espectro de fragmentación no ha permitido diferenciar entre las posibles variantes con la misma  $m/z$ . En otros casos no se han podido identificar por no haber sido descritas en la bibliografía consultada. Por último, de algunas muestras no se ha realizado el análisis mediante HRMS, por lo que algunas señales no se han podido confirmar. Todos estos compuestos se muestran en la *Tabla 4.12*.

**Tabla 4.11.** Variantes identificadas en las muestras en las que se ha realizado un *screening* de MCs en modo de adquisición de *Full Scan* mediante análisis LC-ESI-MS, MS/MS o HRMS.

Nº muestra	Embalse	Fecha	MCs identificadas	MC mayoritaria
47	Foix	16/09/2010	RR, WR, 2 MC no confirmadas ( <i>m/z</i> 922,2 y 937,3) Anabaenopeptina B y F	<i>m/z</i> 922,2
49	Gaià		2 MC no confirmadas ( <i>m/z</i> 1059,3 y 1064,3) 2 MC no confirmadas ( <i>m/z</i> 1073,3 y tr diferentes)	Todas a bajas concentraciones < 0,5 µg/L
50	La Pedrera	24/10/2013		LR y RR del mismo orden
54	Caldas o A Baxe			Anabaenopeptina B y F
55	As Forcadas	20/10/2010	RR 2 MC no identificadas Anabaenopeptina F y G	<i>m/z</i> 1063,6158 en ESI NEG
56		02/10/2013	RR, dmLR, YR, LR, LY, LW, LF <i>m/z</i> 1009,5731 no confirmada	LR, <i>m/z</i> 1009,5731, RR, dmLR
57	Las Conchas	29/04/2011	LR, RR, YR, WR	LR
58		12/09/2013	RR, dmLR, YR, LR, WR Anabaenopeptina A y B	LR agua, RR filtro
59	Vilasouto	19/04/2011	dmLR, dmRR Anabaenopeptina B y F	dmRR
60				dmRR y RR a muy bajas concentraciones (20 y 10 ng/L)
61	Cachamuiña	02/10/2013	dmRR, RR, dmLR, YR, LR, WR, (H <sub>4</sub> )YR, L-Ser <sup>7</sup> -MC-LR, LL, L-Mser <sup>7</sup> MC-LR 2 MC no confirmadas Anabaenopeptina A, B y F Oscillamida Y	RR, LR, (H <sub>4</sub> )YR
62	Castadón		dmRR, RR, dmLR, YR, LR, WR, (H <sub>4</sub> )YR 2 MC no confirmadas Anabaenopeptina A, B y F	R, LR, (H <sub>4</sub> )YR
63	Los Peares			RR a muy bajas concentraciones (10 ng/L)

**Continuación tabla 4.11.** MCs identificadas en las muestras en las que se ha realizado un *screening* de MCs en modo de adquisición de *Full Scan* mediante análisis LC-ESI-MS, MS/MS o HRMS.

Nº muestra	Embalse	Fecha	MCs identificadas	MCs mayoritarias
64	Alcántara	14/07/2009	2 dmLR, dmRR, 2 dmYR, LR, RR, WR, YR Anabaenopeptina B y F	RR
67	Embalses del CYII	22/07/2010	dmRR, RR, YR, dmLR 1 MC no confirmada Oscillamida Y	dmRR
68		12/06/2012	dmRR, dmLR 1 MC no confirmadas	[(6Z)-Adda <sup>5</sup> ]MC-RR y dmLR
71	San Juan	17/09/2013	dmRR, RR, dmLR, YR, LR, WR, WAba, (H <sub>4</sub> )YR, HtyR, KynA, OiaA, [Gly <sup>1</sup> , Asp <sup>3</sup> , ADMAdda <sup>5</sup> ]MC-LR, OiaAba 10 MC no identificadas Anabaenopeptina B	RR, LR, YR, WR y OiaA

MC no confirmadas: no se ha realizado su análisis por HRMS.

MC no identificadas: tienen la misma fórmula empírica y por lo tanto masa exacta o no han sido descritas en la bibliografía consultada. El espectro de fragmentación no ha permitido diferenciar entre las posibles variantes con la misma *m/z*.

NEG: modo de ionización negativo.

Si el análisis se ha realizado por LRMS, la relación *m/z* se ha anotado con un solo decimal. En cambio sí se ha trabajado mediante HRMS, se han indicado 4 decimales.

**Tabla 4.12.** Posibles MCs en las muestras en las que se ha realizado un *screening* de MCs en modo de adquisición de *Full Scan* mediante análisis LC-ESI-MS, MS/MS o HRMS.

<i>m/z</i>	Modo de ionización	Identificación provisional	Muestra
995,5 (498,0)		[D-Asp <sup>3</sup> , D-Glu(OH <sub>3</sub> ) <sup>6</sup> ] MC-LR, [D-Asp <sup>3</sup> , Dhb <sup>7</sup> ]MC-HiIR o [(6Z-Adda <sup>5</sup> )-MC-LR	Embalses del CYII
1059,3		MC-HtyR, [L-Ser <sup>7</sup> ]MC-RR, [D-Asp <sup>3</sup> MeSer <sup>7</sup> ]MC-RR o [ADMAdda <sup>5</sup> ]MC-LHar	
1073,1	POS	[D-Asp <sup>3</sup> , ADMAdda <sup>5</sup> , Dhb <sup>7</sup> ]MC-HtyR o [D-Asp <sup>3</sup> , ADMAdda <sup>5</sup> ]MC-HtyR	Gaià
1073,3			
1064,3		[L-Ser <sup>7</sup> ]MC-RR o [D-Asp <sup>3</sup> MeSer <sup>7</sup> ]MC-RR	
922,2		No identificada	
937,3		No identificada	Foix
1063,6158	NEG	No identificada	
1077,6089		No identificada	
1009,5731 (505,2905)	POS	[Mdhb <sup>7</sup> ]MC-LR o MC-HiIR	As Forcadas
989,5096	POS	[D-Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>7</sup> ]MC-LR o [Gly <sup>1</sup> , Asp <sup>3</sup> ]MC-LR	Cachamuiña
1009,5718 (505,2898)	POS	[Mdhb <sup>7</sup> ]MC-LR o MC-HiIR	
1007,5582	NEG		
1009,5727	POS	[Mdhb <sup>7</sup> ]MC-LR o MC-HiIR	Castadón
1007,5585	NEG		
1029,5431	POS	[Dha <sup>7</sup> ]MC-HphR o MC-FR	Embalses del CYII
1045,5361	POS	[D-Asp <sup>3</sup> ]MC-HtyR o [Dha <sup>7</sup> ]MC-HtyR	
981,5432		[DMAdda <sup>5</sup> ]MC-LR, [Gly <sup>1</sup> , Asp <sup>3</sup> ]MC-LHar, MC-Rapa o MC-VR	
979,5287			
1031,5212	POS	[D-Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>7</sup> ]MC-HtyR, [D-Asp <sup>3</sup> , Dhb <sup>7</sup> ]MC-RY,	
1029,5068		[D-Asp <sup>3</sup> ]MC-RY, [D-Asp <sup>3</sup> ]MC-YR, [Dha <sup>7</sup> ]MC-RY,	
1009,5717	NEG	[Dha <sup>7</sup> ]MC-YR o [DMAdda <sup>5</sup> ]MC-YR	
1007,5574		[Mdhb <sup>7</sup> ]MC-LR o MC-HiIR	
1009,4884	NEG	MC-ER o [D-Asp <sup>3</sup> ]MC-LW	San Juan
1029,5406	POS	[Dha <sup>7</sup> ]MC-HphR, MC-FR o MC-RF	
1027,5261			
1009,5716	NEG	[Mdhb <sup>7</sup> ]MC-LR o MC-HiIR	
1007,5573			
1031,5437	POS	[Mdhb <sup>7</sup> ]MC-LR o MC-HiIR	
1045,5256	POS	[D-Asp <sup>3</sup> , Dhb <sup>7</sup> ]MC-HtyR, [D-Asp <sup>3</sup> ]MC-HtyR,	
1043,5100		[Dha <sup>7</sup> ]MC-HtyR o MC-RY	
983,4900	NEG	MC-AW o MC-WA	
981,4733			
1071,5038	NEG	[D-Asp <sup>3</sup> , ADMAdda <sup>5</sup> , Dhb <sup>7</sup> ]MC-HtyR o [D-Asp <sup>3</sup> , ADMAdda <sup>5</sup> ]MC-HtyR	

POS: modo de ionización positivo; NEG: modo de ionización negativo.

Entre parentésis se ha anotado la señal [M+2H]<sup>2+</sup> minoritaria. Si el análisis se ha realizado por LRMS, la relación *m/z* se ha anotado con un solo decimal. En cambio sí se ha trabajado mediante HRMS, se han indicado 4 decimales.



De estas señales no confirmadas, tres potenciales MCs se han presentado en diferentes muestras:

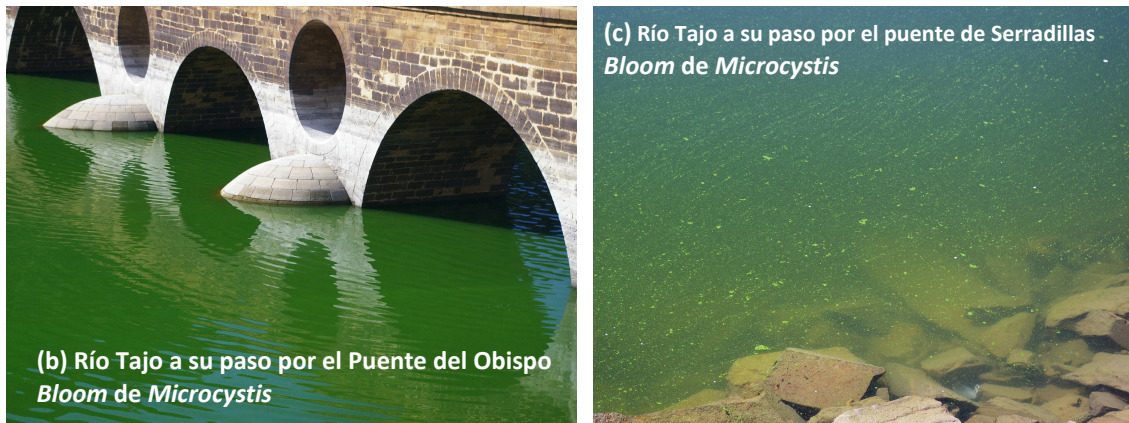
- [Mdhb<sup>7</sup>]MC-LR o MC-HilR, en las muestras de los embalses de Cachamuiña, Castadón y San Juan.
- [D-Asp<sup>3</sup>]MC-HtyR o [Dha<sup>7</sup>]MC-HtyR, en los embalses de CYII y San Juan
- Dha<sup>7</sup>]MC-HphR o MC-FR, en Castadón y San Juan.

*Embalse de Alcántara (cuenca del Tajo, 2009)*

En el mes de julio se recibió una muestra de un extenso *bloom* en el parque natural de Monfragüe en Cáceres (ver fotografías de la *Figura 4.11*). El área de influencia de la floración se observó en la mitad del curso bajo del río Tajo, entre el embalse de Alcántara (uno de los mayores embalses de agua en España, actualmente utilizado para producción hidroeléctrica, abastecimiento de agua, riego y usos recreativos) y unos 40 km aguas arriba. En esta área, el río Tajo está influenciado aguas arriba por las altas temperaturas del agua desviada por una planta de energía nuclear, la presencia de una presa aguas abajo y una alta carga de nutrientes, que proporcionan condiciones óptimas para la proliferación masiva de cianobacterias.

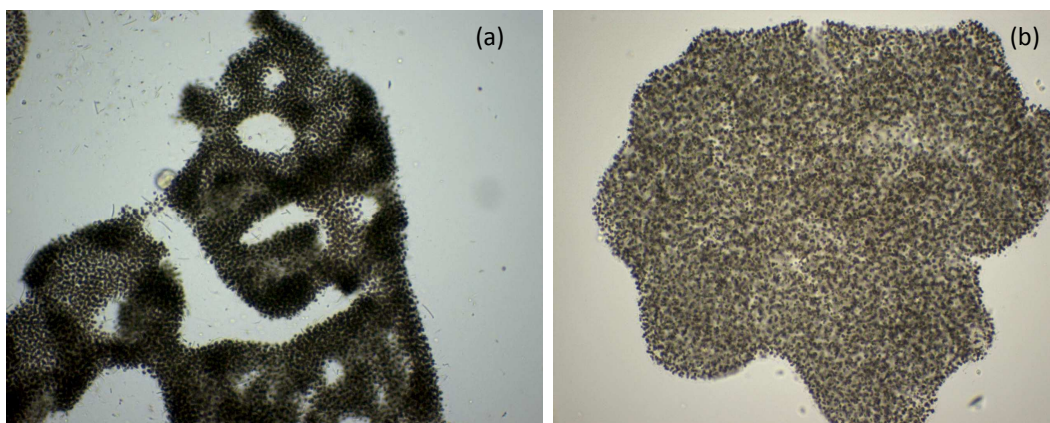


**Figura 4.11.** Fotografías del río Tajo durante un *bloom* de *Microcystis* (año 2009): (a) embalse de Alcántara; (b) puente del Obispo; (c) puente de Serradillas. (Fotografías cedidas por Pedro Soto, CH Tajo; Antonio Quesada, Universidad Autónoma Madrid).



**Continuación figura 4.11.** Fotografías del río Tajo durante un *bloom* de *Microcystis* (año 2009): (a) embalse de Alcántara; (b) puente del Obispo; (c) puente de Serradillas. (Fotografías cedidas por Pedro Soto, CH Tajo; Antonio Quesada, Universidad Autónoma Madrid).

En lo que se refiere a la distribución taxonómica de cianobacterias presentes, la comunidad fitoplanctónica estuvo dominada por el género *Microcystis*, aunque aparecieron distintas especies en los diferentes sitios de muestreo y profundidades. *M. aeruginosa* representó la especie dominante junto a la presencia de *M. flos-aquae* (Figura 4.11). En el muestreo además se puso de manifiesto variabilidad en la composición de especies en el perfil de la columna de agua, en la abundancia de cianobacterias y en la composición de la comunidad.



**Figura 4.11.** Fotografías en microscopía de las especies dominantes en la muestra del embalse de Alcántara: (a) *Microcystis aeruginosa*; (b) *Microcystis flos-aquae*. (Fotografías cedidas por Antonio Quesada, Universidad Autónoma Madrid).

El agua filtrada, fracción extracelular, se analizó en primer lugar por SPE en línea LC-ESI-MS/MS. Una alícuota del agua filtrada se guardó en el congelador a -20°C y posteriormente se analizó por LC-ESI-HRMS Orbitrap mediante inyección directa para confirmar la identificación de algunas señales. Como recibimos una muestra con una cantidad considerable de alga, después de filtrar toda la muestra con diferentes filtros, estos filtros se liofilizaron. Se obtuvo un total de 12 gramos de liofilizado triturado y homogeneizado. El liofilizado se analizó por LC-ESI-MS (QqQ), por MALDI-TOF/TOF y por LC-ESI-HRMS Orbitrap.

En la *Figura 4.13* se muestran los espectros de masas MALDI-TOF del liofilizado directamente sólido, sin extracción ni pre-concentración, de la muestra del embalse de Alcántara en modo de ionización positivo y negativo. Como no existe separación cromatográfica, todas las MCs se ionizan simultáneamente. De esta forma de una manera rápida se obtiene la “huella dactilar” de la muestra y el perfil de variantes de MC observadas. El análisis del extracto metanólico del liofilizado mediante LC-ESI-HRMS reveló la presencia de dos señales con un tiempo de retención diferente de  $m/z$  1045,5353 (ver *Figura 4.14* que incluye los cromatogramas TIC y con las  $m/z$  de las MCs mayoritarias de la muestra extraídas). En MALDI-TOF, los perfiles isotópicos de cualquier interferencia isobárica incluyendo los congéneres con el mismo o similar peso molecular pueden solaparse. En la *Figura 4.15* se muestran los perfiles isotópicos en modo de ionización positivo de las señales de  $m/z$  1045,5353 de la muestra de Alcántara en los espectros de masas MALDI-TOF y LC-ESI-HRMS y se comparan con el teórico simulado de la MC-YR. La intensidad de la señal M+2 en el espectro de masas MALDI-TOF es un 30% de la señal base del espectro de masas, debido a que todas las señales de  $m/z$  1045,5353 se solapan. En cambio la intensidad de esta señal en el espectro de masas ESI-HRMS es de un 17% respecto a la señal base y el perfil isotópico coincide con el teórico simulado para la MC-YR (intensidad del 17% para la señal M+2). La primera especie se confirma como la MC-YR y la otra señal posiblemente sea la variante MC-HtyR or MC-RY de acuerdo con la bibliografía. La otra señal no se ha incluido en la tabla final de resultados (*Tabla 4.13*).

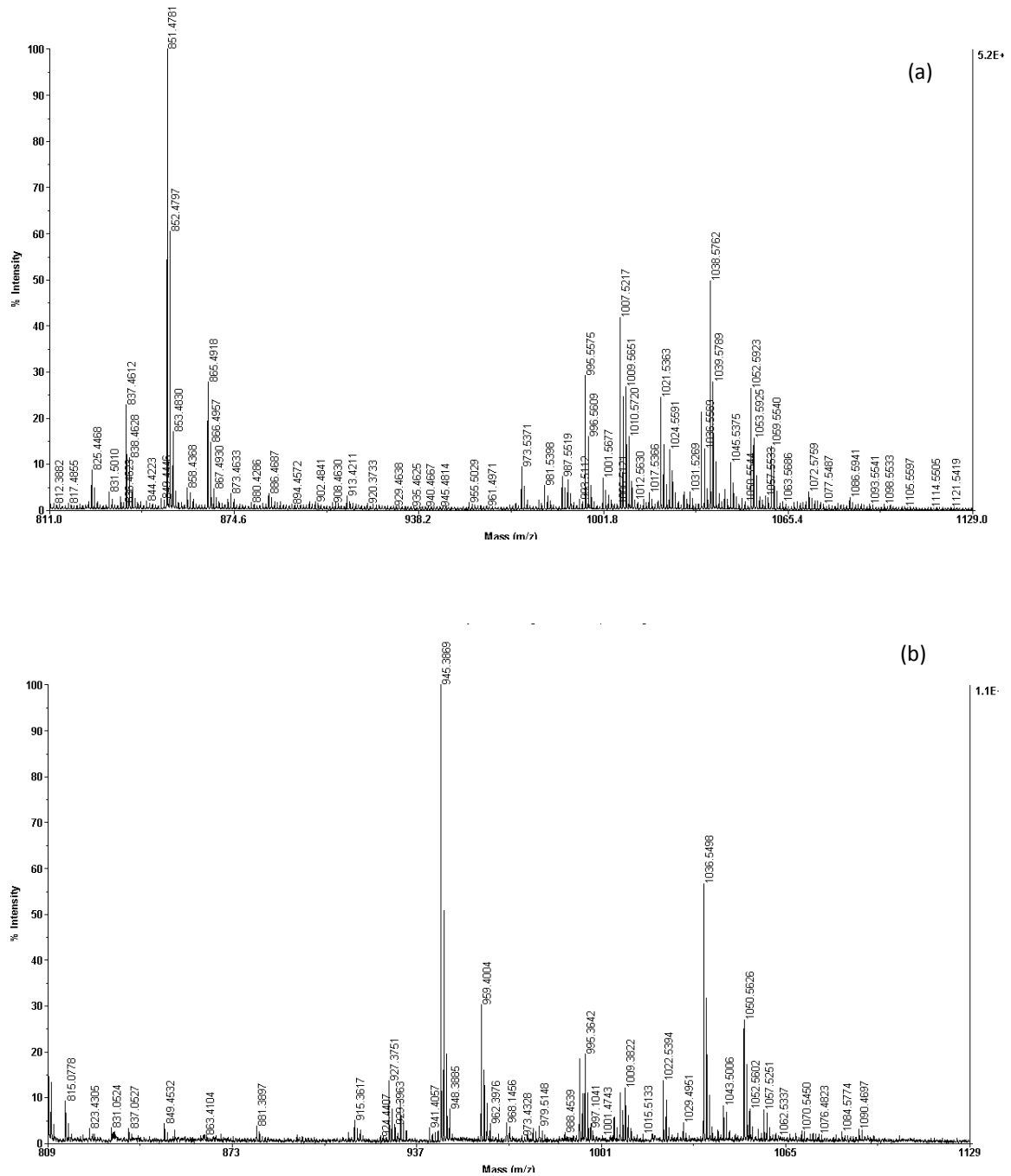
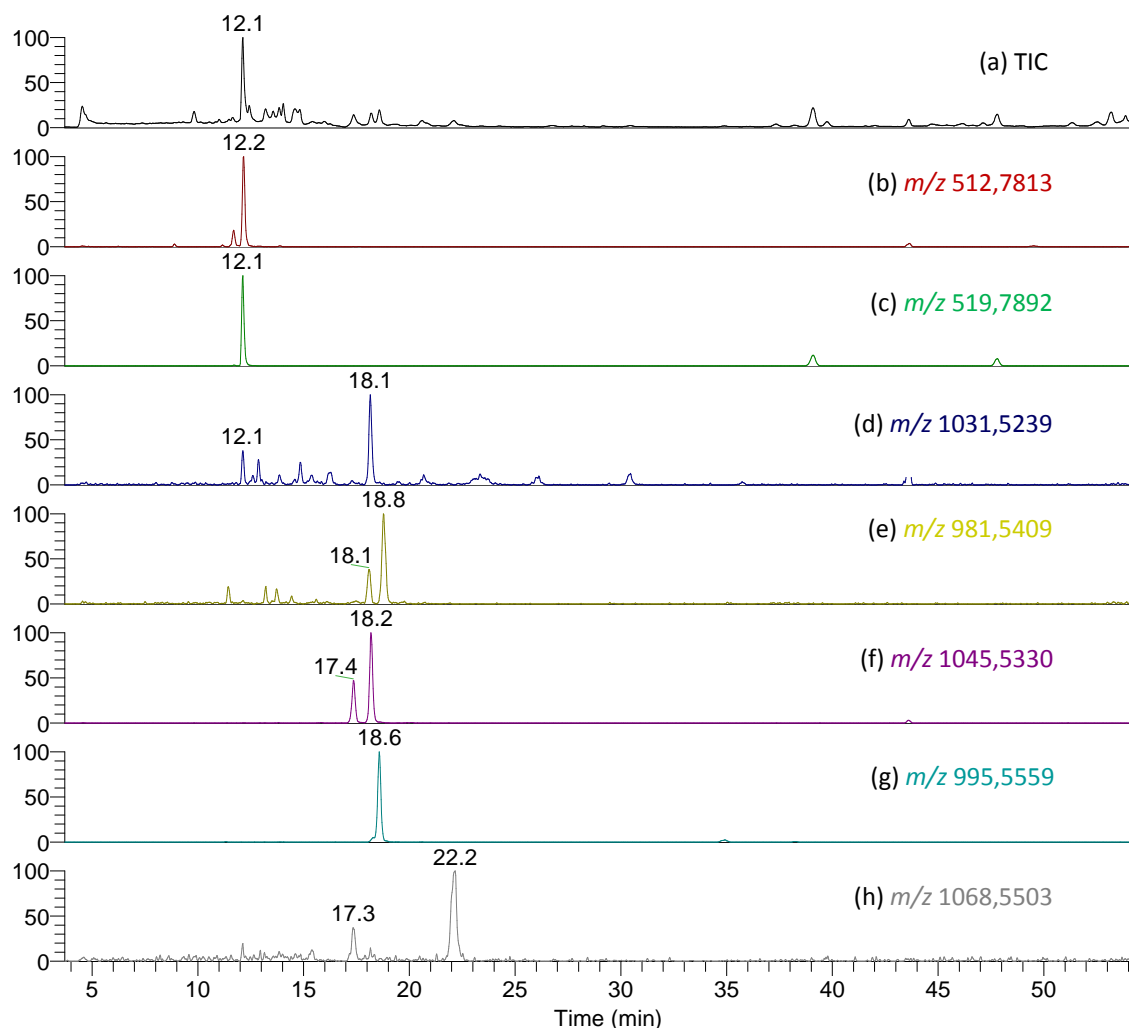
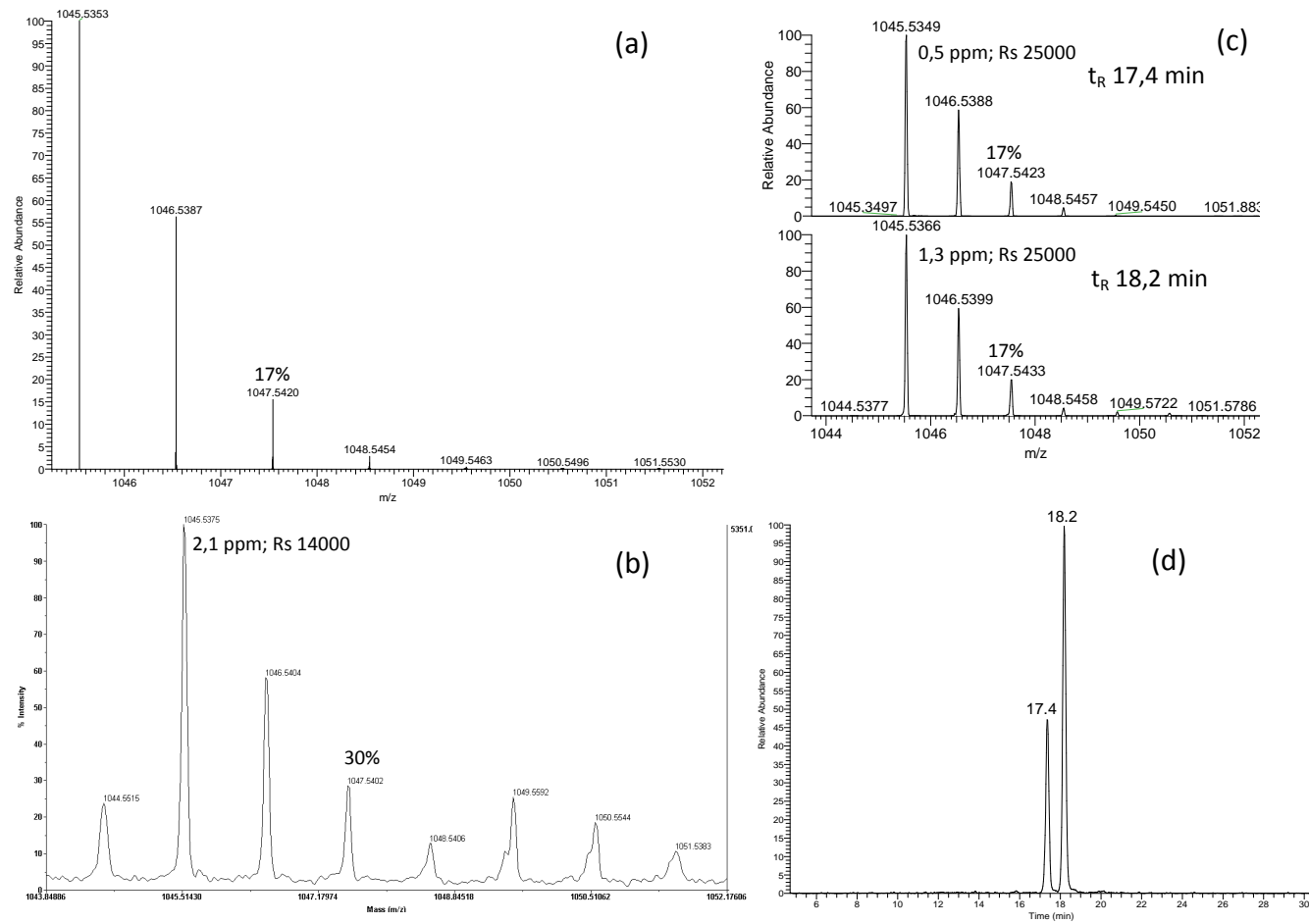


Figura 4.13. Espectros de masas MALDI-TOF del liofilizado de la fracción sestónica de la muestra del bloom de Alcántara mediante ionización en modo: (a) positivo; y (b) negativo.



**Figura 4.14.** Cromatograma LC-ESI-HRMS de las MCs detectadas en la fracción intracelular del *bloom* de Alcántara: (a) TIC; (b) MC-dmRR; (c) MC-RR; (d); MC-dmYR; (e) MC-dmLR; (f) MC-YR; (g) MC-LR; y, (h) MC-WR.

En la fracción sestónica de la muestra de Alcántara se identificaron diferentes variantes de MC: 2 MC-dmLR, -LR, -dmRR, 2 -dmYR, -RR, -YR y -WR (ver *Tabla 4.13*); confirmadas por AMM (< 3 ppm), su espectro de fragmentación y la presencia de los iones diagnósticos. Las concentraciones intracelulares de las MCs detectadas oscilaron entre 20 y 2271  $\mu\text{g/L}$  equivalentes, teniendo en cuenta el volumen de agua filtrada, con un contenido total de unos 5 mg/L. Hay que resaltar que los valores llegan a los miligramos por litro, lo que le confiere un elevado riesgo e indica niveles alrededor de 3 órdenes de magnitud por encima del valor guía para aguas de consumo humano en España y al recomendado por la OMS (1  $\mu\text{g/L}$ ). Las variantes mayoritarias fueron la MC-RR y la -LR, representando el 43 y 26% de la concentración total de MC, respectivamente. Cuatro señales ( $m/z$  945,4589; 959,4799; 965,4123; 973,5586; ver *Tabla 4.13*) fueron descartadas como posibles MCs por HRMS y estudios de fragmentación. Teniendo en cuenta que el modo de ionización negativo presenta normalmente LOQ superiores, excepto para las MCs que no contienen el aminoácido Arg, la detección de las MCs menos concentradas no se pudo confirmar en este modo de ionización.



**Figura 4.15.** Comparación del perfil isotópico de la señal  $m/z$  1045,5353 ( $C_{52}H_{73}N_{10}O_{13}$ ) en modo de ionización positivo de los espectro de masas: (a) simulado; (b) MALDI-TOF; y (c) LC-ESI-HRMS de la muestra de Alcántara. (d) Cromatograma LC-ESI-HRMS extrayendo las señales de  $m/z$  1045,5353.

$t_R$ : tiempo de retención; ppm: error en la AMM; Rs: resolución.

La fracción acuosa normalmente contiene las MCs más hidrofílicas, por lo que la MC-LR y la MC-RR fueron las MCs detectadas en la fracción extracelular a 4,5 y 1,8 µg/L, un 71 y 29% del contenido total de MC extracelular, respectivamente (ver *Tabla 4.13*). Sobrepasando también el nivel legislado para las aguas de consumo humano en España y el nivel recomendado por la OMS.

Como se trabajó en modo de adquisición *Full Scan* en las metodologías MALDI-TOF/TOF y LC-ESI-HRMS se pudo realizar un *screening* de otras toxinas y péptidos relativos *a posteriori* sin necesidad de re-inyectar la muestra. Se identificaron las anabaenopeptinas B y F, que como ya hemos mencionado con anterioridad, de acuerdo con otros autores, son otros péptidos cíclicos frecuentes en *blooms* de *Microcystis aeruginosa* (Barco y col., 2004; Erhard y col., 1997 y 1999).

La situación del tramo investigado en el río Tajo fue preocupante. Una gran extensión de agua resultó afectada por la floración, más de 100 km de longitud y probablemente varias decenas de miles de hectáreas. La abundancia de cianobacterias tóxicas fue muy elevada y el contenido en MCs alcanzó niveles destacables. Por todo ello se recomendó un plan de monitorización continuo de la zona dependiendo de los usos a los que se destinara el agua. Destacando hacer un estudio detallado sobre la posibilidad de la entrada de toxinas en las vías de distribución del agua para consumo humano (según el real decreto de aguas de consumo humano, RD 140/2003). Por último se aconsejó la posibilidad de delimitar los usos recreativos del agua en la zona investigada.

Por último, esta muestra se ha utilizado para verificar la aplicabilidad de diferentes tipos de bioensayos y contrastar los resultados obtenidos por comparación con el análisis mediante LC-HRMS como técnica de referencia. Este estudio se ha desarrollado en el marco del proyecto ALARMTOX (SOE1/P1/E129 Interreg IVB SUDOE, en el programa de cooperación territorial del sud-este de Europa) integrado en la primera prioridad del programa: "Promoción de la innovación y constitución de redes estables de cooperación en materia tecnológica".

Por un lado, el extracto de la fracción intracelular del *bloom* de Alcántara se ha utilizado para la comparación con métodos de proteína fosfatasa 1 recombinante (PP1<sub>Rec</sub>) y un ensayo directo competitivo de enzima ligada a inmunopartículas (ELIPA). Por otro lado, se ha utilizado en diferentes ensayos de proteína fosfatasa (PP1<sub>Rec</sub> y PP2A<sub>Rec</sub> y PP2A de tipo salvaje, PP2A<sub>Salvaje</sub>).

**Tabla 4.13.** MCs y péptidos relacionados identificados en la muestra del embalse de Alcántara (año 2009), río Tajo. Niveles de concentración (en µg/L) determinados por LC-ESI-HRMS en las fracciones intra- y extracelular de esta muestra.

m/z	Identificación	Modo ionización	Confirmación <sup>a</sup>	µg/L	
				Extracelular	Intracelular <sup>b</sup>
837,4631/ 835,4442	Anabaenopeptin B	+/-	SI	n.c.	n.c.
851,4751/ 849,4629	Anabaenopeptin F	+/-	SI	n.c.	n.c.
945,4589	X	-	NO	X	X
959,4799	X	-	NO	X	X
965,4123	X	+	NO	X	X
973,5586	X	+	NO	X	X
981,5409 <sup>c</sup>	[Asp <sup>3</sup> ]MC-LR (-dmLR)	+	SI	n.d.	<b>68</b>
981,5392/ 979,5248 <sup>c</sup>	[Dha <sup>7</sup> ]MC-LR (-dmLR)	+/-	SI	n.d.	<b>312</b>
995,5559/ 993,5389	MC-LR	+/-	SI	<b>1,8</b>	<b>1353</b>
512,7813 (1024,5571)/ 1022,5440 <sup>c</sup>	[Asp <sup>3</sup> ]MC-RR (-dmRR)	+/-	SI	n.d.	<b>406</b>
1031,5239 <sup>c</sup>	[Asp <sup>3</sup> ]MC-YR (-dmYR)	+	SI	n.d.	<b>20<sup>d</sup></b>
1031,5189 <sup>c</sup>	[Dha <sup>7</sup> ]MC-YR (-dmYR)	+/-	SI	n.d.	<b>176<sup>d</sup></b>
519,7892 (1038,5710)/ 1036,5571	MC-RR	+/-	SI	<b>4,5</b>	<b>2271</b>
1045,5330/ 1043,5251	MC-YR	+/-	SI	n.d.	<b>522</b>
1068,5503	MC-WR	+	SI	n.d.	<b>94</b>
<b>TOTAL MCs</b>				<b>6,3</b>	<b>5222</b>

n.d.: no detectado (<LOD, S/N<3).

LOQ: 0,06-0,2 y 0,01 µg/L, para las fracciones extra- e intracelular, respectivamente.

n.c.: no se han cuantificado por no disponer de patrón o análogo.

X: identificación descartada, no son MC. No cumplen alguno o todos los criterios de confirmación.

<sup>a</sup> Confirmación por HRMS (exactitud < 3 ppm) y mediante experimentos de fragmentación TOF/TOF y HCD (detección de los fragmentos diagnósticos).

SI: cumple estos criterios de confirmación.

NO: no se observan los fragmentos característicos de los compuestos en estudio en los espectros de MS/MS y/o la exactitud de la medida de masa exacta es > 3 ppm.

<sup>b</sup> µg/L equivalentes teniendo en cuenta el volumen de muestra filtrado.

<sup>c</sup> Tiempo de retención diferente por LC-ESI-HRMS.

<sup>d</sup> µg/L equivalentes de MC-LR.

Las MC de las que no se disponía de patrones comerciales se cuantificaron como equivalentes de MC-LR.



Por vez primera, se han utilizado partículas magnéticas (MP) como soporte para la inmovilización de moléculas de biorreconocimiento para la detección de MCs en dos formatos diferentes. En un enfoque, una PP1<sub>Rec</sub> ha sido conjugada con las MPs a través de química de coordinación, y la detección de la MC-LR se ha basado en la inhibición de la actividad enzimática. En el otro enfoque, un anticuerpo monoclonal (mAb), en lugar de la MC-LR, se ha conjugado con la proteína G-recubierta de las MPs para realizar un ensayo ELIPA. Ambos enfoques, PP1<sub>Rec</sub> y ELIPA, se han aplicado al análisis del extracto de la fracción intracelular del embalse de Alcántara y de un cultivo (PCC7820, como se describirá en el *apartado 4.2.5*).

El contenido equivalente de MCs ha sido comparado con el obtenido mediante el análisis LC-HRMS (ver *Tabla 4.14*). De forma general, el contenido de MCs medido como equivalentes de MC-LR en µg/L, en los dos extractos, ha sido superior mediante los ensayos enzimáticos e inmunoensayos con detección colorimétrica y electroquímica, a las concentraciones de MC-LR y de MCs totales (sumando todas las señales identificadas como MCs potenciales) detectadas por LC-HRMS. Las diferencias se han explicado en base a la naturaleza de la muestra. En ambas muestras, además de la MC-LR se han detectado otras variantes.

En concreto, en el extracto intracelular de la muestra del embalse de Alcántara, además de la MC-LR se han detectado ~74% del total de la muestra de otras variantes y péptidos relacionados (anabaenopeptinas B y F). Dos hipótesis pueden explicar esta observación, o los enfoques enzimático y de inmunoensayo están sobreestimando el contenido de MC debido a las inhibiciones de enzimas inespecíficas y a la reactividad cruzada de la matriz de la muestra, efecto evidente en las floraciones naturales y cultivos. O, la presencia de otras MCs diferentes a la MC-LR y péptidos relacionados, sin información de su potencia de inhibición y reactividad cruzada, podrían ser responsables de que se produzcan inhibiciones más altas. Finalmente, las concentraciones también se han medido mediante ensayos bioquímicos convencionales (PPIAs con enzimas libres y ELISA) obteniendo resultados similares que con los bioensayos en los que hemos utilizado MP (ver *Tabla 4.14*). Por lo tanto, los resultados han demostrado la viabilidad de la utilización de soportes de MPs como biomoléculas de inmovilización en herramientas biotecnológicas para el seguimiento de MCs. Hasta el momento, no conocemos, otros enfoques basados en estrategias bioquímicas que integren MPs para el desarrollo futuro de la microfluídica compacta en dispositivos para la detección de MCs.

**Tabla 4.14.** Contenido en µg/L de equivalentes de MC-LR del extracto de la muestra natural del *bloom* de Alcántara determinado mediante los métodos enzimáticos e immunoquímicos y mediante LC-HRMS.

Método	PP2A	PP1	PP1-MP	ELISA	ELIPA colorimétrico	ELIPA electroquímico	LC-HRMS <sup>a</sup>
Concentración (µg/L)	17187 ± 862	14148 ± 707	13036 ± 302	12320 ± 1715	11731 ±1147	12343 ±1551	5222 (1353)

<sup>a</sup> El primer valor es la suma de todas las MCs observadas; el valor entre paréntesis es la concentración de MC-LR.

Los métodos de PPIA, ELISA y ELIPA son económicos, sencillos de utilizar y ofrecen una respuesta rápida y una sensibilidad adecuada. Por lo tanto, los métodos desarrollados pueden ser utilizados como herramientas de *screening* rápido y fiable para la detección de MCs. Estos enfoques serían útiles para el subsiguiente desarrollo de sistemas automatizados de flujo y dispositivos compactos de análisis. Sin embargo los métodos ELISA no distinguen entre variantes tóxicas o no tóxicas. A diferencia del ELISA, los tests de PPIA no se basan en el reconocimiento estructural, y dan una respuesta funcional. Aunque un ensayo basado en células proporcionaría información toxicológica de una muestra, PPIA es de fácil manejo y puede ser considerado como indicativo de la toxicidad. Sin embargo, para conocer mejor la toxicidad de las muestras y proporcionar herramientas útiles de *screening*/detección, se necesitan más datos de las potencias de inhibición de las diferentes variantes de MCs, y sus factores de equivalencia de inhibición (IEFs) en relación con la MC-LR. En este contexto, por otro lado, se ha utilizado el método de la PPIA para evaluar el comportamiento de cuatro PPs (PP1<sub>Rec</sub>, PP1<sub>Salvaje</sub>, PP2<sub>Rec</sub> y PP2<sub>Salvaje</sub>) en el análisis de MCs.

El primer paso ha sido comprobar su actividad enzimática. Las enzimas han sido comparadas en base a la MC-LR como cianotoxina modelo. La actividad de la solución madre de la PP1<sub>Salvaje</sub> ha sido demasiado baja, por lo que no se ha considerado económicamente viable para realizar la correspondiente PPIA. Por lo tanto, la PP1<sub>Salvaje</sub> no se ha continuado estudiando. El método de PP2A<sub>Rec</sub>, ha proporcionado un LOD de 3,1 µg/L, mientras que con los PP1A<sub>Rec</sub> y PP2A<sub>Salvaje</sub> se han obtenido LODs de 0,6 y 0,5 µg/L, respectivamente, por debajo del valor guía propuesto por la OMS (1 µg/L).

Además, se ha evaluado la potencia de inhibición de siete variantes de MC: -LR, -RR, -dmLR, -YR, -LY, -LW and -LF. Se han obtenido unos coeficientes del 50% de inhibición (IC<sub>50</sub>) que han oscilado entre los valores de 1,4 y 359,3 µg/L dependiendo de la MC y de la PP. Como era de esperar, la MC-LR ha sido la variante con una potencia de inhibición mayor para todas las enzimas. De forma general, las variantes con Arg en la posición 4 (-LR, -RR and -YR) han presentado una mayor inhibición que el resto de MCs estudiadas y la tendencia de inhibición ha sido la misma para todas las enzimas: MC-LR > -RR > -YR > -LY > -LW > -LF.

Los PPIAs se han aplicado a la determinación del contenido de MCs en la muestra natural del *bloom* del embalse de Alcántara que, como ya se ha mencionado, ha presentado un perfil con la presencia de múltiples MCs. La muestra del *bloom* de Alcántara se ha tenido que diluir hasta que la curva dosis-respuesta ha presentado la correspondiente forma sigmoïdal. Los factores de equivalencia de inhibición (IEFs) se han aplicado a la cuantificación individual de las MCs determinadas por análisis LC-HRMS, y se han comparado los resultados estimados como contenido equivalente de MC-LR por los diferentes métodos PPIA con los obtenidos por LC-HRMS.

**Tabla 4.15.** Contenido en µg/L de equivalentes de MC-LR determinado por los diferentes métodos PPIAs y por LC-HRMS en un extracto de una muestra natural del embalse de Alcántara y en muestras fortificadas con un perfil múltiple de MCs de contenido mínimo y máximo.

Método	Alcántara	Contenido mínimo	Contenido máximo
PP1A <sub>Rec</sub>	11292±1685	1862±94 (1699)	2572±226 (4568)
PP2A <sub>Salvaje</sub>	13646±442	2090±60 (1783)	3540±84 (4651)
PP2A <sub>Rec</sub>	16482±849	3331±78 (2180)	4865±15 (5048)
LC-HRMS <sup>a</sup>	5222 (1353)	-	-

El contenido mínimo y máximo indican que todas las MCs, incluidas las minoritarias y las no identificadas han sido consideradas como no tóxicas o como tóxicas con una potencia de inhibición equivalente a la MC-LR, respectivamente.

Entre parentesis se indican los valores de IE calculados mediante la aplicación de los IEF correspondientes a la cuantificación de las MCs individuales obtenidas mediante el análisis LC-HRMS.

<sup>a</sup> El primer valor es la suma de todas las MCs observadas; el valor entre paréntesis es la concentración de MC-LR.

Las curvas de calibración para la MC-LR se realizaron en paralelo al análisis de cuantificación debido a posibles diferencias leves en los porcentajes de inhibición entre ensayos. Los resultados se han expresado como contenido de MC-LR equivalentes (µg/L) del extracto, calculado a partir de los valores de IC<sub>50</sub> de las curvas de calibración de la MC-LR y los valores de IC<sub>50</sub> de las curvas dosis-respuesta de la muestra, valores determinados por ecuaciones de logística sigmoïdal de cuatro parámetros.

Como se muestra en la *Tabla 4.15*, mediante los test de PPIA con PP1A<sub>Rec</sub> y PP2A<sub>Salvaje</sub> se han obtenido contenidos de MC-LR equivalentes similares ( $t=1,941$  y  $p=0,192$ ), y diferentes a la PP2<sub>Rec</sub> (PP2A<sub>Rec</sub> vs PP1<sub>Rec</sub>  $t=5,221$  y  $p=0,035$ ; PP2A<sub>Rec</sub> vs PP2A<sub>Salvaje</sub>  $t=5,594$ ,  $p=0,030$ ). De nuevo, el análisis LC-HRMS ha presentado resultados menores para la MC-LR y el total de MCs. La muestra natural contiene otros compuestos como las anabenopectinas, y estos podrían inhibir a las PPs (Heresztyn y Nicholson, 2001). Además esta inhibición podría darse en diferente extensión dependiendo de la fuente y naturaleza de la enzima, y si es así, ello también podría explicar el diferente contenido de equivalentes de MC-LR encontrado por las tres enzimas. Por otra parte, el efecto de las variantes minoritarias o no identificadas en la potencia de inhibición de la mezcla podría también ser responsable de la sobreestimación por PPIAs.

Para estudiar en profundidad el efecto de la matriz y/o del perfil multi-MC, se ha trabajado con una muestra fortificada con una solución estándar de MCs de la misma composición en MCs que la muestra natural de la floración de cianobacterias (sin extracción). Se han considerado dos escenarios extremos: que las MCs minoritarias no inhiben a las PPs (contenido mínimo); y, considerar que provocan una inhibición equivalente a la MC-LR (contenido máximo). Con esta muestra dopada la tendencia ha sido la misma que en la muestra natural: el mayor contenido de equivalentes de MC-LR lo ha proporcionado la PP2A<sub>Rec</sub>, seguida de la PP2A<sub>Salvaje</sub> y finalmente la PP1A<sub>Rec</sub>. Como se esperaba, el escenario de contenido mínimo ha tenido menor respuesta que el del contenido máximo para todas las enzimas. Por lo tanto, aunque la presencia de diferentes variantes de MCs pueda en parte ser responsable de las sobreestimaciones de las PPIAs en las muestra naturales, es más plausible que a pesar de las altas diluciones utilizadas se produzca un efecto añadido de interferencia por la presencia de compuestos de la matriz. En un futuro trabajo sería conveniente realizar una evaluación exhaustiva de los posibles efectos matriz de las muestras naturales. La eliminación de las interferencias con protocolos adecuados de purificación podría mejorar los resultados.

En cualquier caso, los métodos de PPIAs desarrollados en este estudio no proporcionan falsos negativos; aunque pueden producirse falsos positivos. En consecuencia, los PPIAs podrían ser utilizados como herramientas de *screening* de la presencia de MCs en el medio ambiente, protegiendo la salud humana y animal, y en el caso de obtener resultados positivos o sospechosos, las muestras deberán analizarse por métodos de confirmación, como el análisis mediante técnicas de MS.

#### *Embalses de la cuenca Cataluña interna (2009-2013)*

De la cuenca Cataluña interna se recibieron un total de seis muestras durante los años 2009-2013 de los embalses de Foix (tres muestras), Boadella, Gaià y la riera de La Pedrera. Las aguas una vez filtradas se analizaron por SPE en línea al sistema LC-ESI-MS/MS (QqQ). En ninguna de estas aguas se determinaron las MC monitorizadas en modo SRM, MC-LR, -RR, -YR y -dmRR, por encima del LOQ (0,02 µg/L). En la muestra de La Pedrera se monitorizaron también las MC-LA, -LF, -LW, -LY, -WR y -dmLR. En cambio en los filtros, fracción intracelular o sestónica, de las muestras de Foix en el año 2010 y Gaià se detectaron mediante LC-ESI-MS (QqQ) las MCs resumidas en la *Tabla 4.16*. Además en la fracción sestónica de la riera de La Pedrera se detectó la presencia de MC-LR y -RR a niveles por debajo del LOQ, que se estimaron por extrapolación de la recta como una concentración del orden de 1 ng/L, individualmente.

**Tabla 4.16.** Concentración intracelular en µg/L de las MCs detectadas en las muestras de la cuenca de Cataluña interna por LC-ESI-MS (QqQ).

t <sub>R</sub> (min)	MCs identificadas	µg/L	
		Foix (16/09/2010)	Gaià (16/09/2010)
9,6	Anabaenopeptina B	n.c.	n.d.
10,4	Anabaenopeptina F	n.c.	n.d.
16,3	MC-HtyR, [L-Ser <sup>7</sup> ]MC-RR, [D-Asp <sup>3</sup> MeSer <sup>7</sup> ]MC-RR o [ADMAAdda <sup>5</sup> MC-LHar]	n.d.	<b>0,44</b>
16,8	No identificada (m/z 1073,3)	n.d.	<b>0,25</b>
24,3	No identificada (m/z 1073,3)	n.d.	<b>0,41</b>
41,1	No identificada (m/z 922,2)	<b>7,7</b>	n.d.
47,8	No identificada (m/z 937,3)	<b>0,35</b>	n.d.
51,5	[L-Ser <sup>7</sup> ]MC-RR o [D-Asp <sup>3</sup> MeSer <sup>7</sup> ]MC-RR	n.d.	<b>0,35</b>
<b>TOTAL</b>		<b>8,0</b>	<b>1,4</b>

n.c.: no se han cuantificado por no disponer de patrón o análogo.

n.d.: no detectado.

t<sub>R</sub>: tiempo de retención.

Límite de cuantificación (LOQ): 0,010 µg/L.

µg/L equivalentes teniendo en cuenta el volumen de muestra filtrado.

Las MC de las que no se disponía de patrones comerciales se cuantificaron como µg/L equivalentes de MC-LR.

No identificada: no se ha podido identificar de acuerdo a las MCs descritas en la bibliografía.

#### *Embalses Canal Isabel II (Cuenca del Tajo, 2010 y 2012)*

Durante los años 2010 y 2012, desde el Canal de Isabel II (CYII), ente público responsable de la gestión del ciclo integral del agua en la Comunidad de Madrid, nos enviaron un total de seis muestras como sistema de monitorización de la presencia de MCs en sus embalses: dos de ellas de El Atazar, una de Pedrezuela y tres en las que no se especificaba el embalse del que procedían.

Brevemente, las aguas una vez filtradas se analizaron por SPE en línea al sistema LC-ESI-MS/MS (QqQ) adquiriendo en modo SRM y monitorizando las MC-LR, -RR, -YR y -dmRR. Los filtros después de su extracción con metanol acidificado se analizaron también por LC-ESI-MS (QqQ), adquiriendo, en este caso, en modo de *Full Scan* y con un gradiente de fase móvil, para el *screening* de MCs. En las 2 muestras de El Atazar no se detectó la presencia de MCs. Las muestras no contenían alga y no se pudo recuperar material en el filtro por lo que el análisis de los filtros de todas las muestras, excepto la muestra del 22/07/2010, dieron negativo a la presencia de MCs (ver *Tabla 4.17*).

**Tabla 4.17.** Concentración en  $\mu\text{g/L}$  de las MCs detectadas por LC-ESI-MS(/MS) en las muestras de los embalses de la Cuenca del Tajo gestionados por el CYII.

Variante	Pedrezuela		Embalses CYII		
	05/05/2010	19/05/2010	22/07/2010	12/06/2012	
	Extra	Extra	Extra	Intra <sup>a</sup>	Extra
MC dmLR	n.a.	n.a.	n.a.	<b>1,9</b>	<b>0,03</b>
MC-LR	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MC-dmRR	n.a.	n.a.	n.a.	<b>6,0</b>	<b>0,02</b>
MC-RR	<b>0,01<sup>c</sup></b>	<b>0,02</b>	n.d.	<b>1,1</b>	n.d.
MC-YR	n.d.	n.d.	<b>0,18</b>	<b>1,4</b>	n.d.
[D-Asp <sup>3</sup> , D-Glu(OH <sub>3</sub> ) <sup>6</sup> ]MC-LR o [(6Z-Adda <sup>5</sup> )MC-LR <sup>b</sup>	n.a.	n.a.	n.a.	<b>0,4</b>	n.a.
[(6Z-Adda <sup>5</sup> )MC-RR	n.a.	n.a.	n.a.	<b>0,03</b>	n.a.
MC-dmHtyR	n.a.	n.a.	n.a.	<b>0,01</b>	n.a.
Anabaenopeptina B	n.a.	n.a.	n.a.	n.c.	n.a.
Anabaenopeptina F	n.a.	n.a.	n.a.	n.c.	n.a.
Oscillamida Y	n.a.	n.a.	n.a.	n.c.	n.a.
<b>TOTAL</b>	<b>0,01<sup>c</sup></b>	<b>0,02</b>	<b>0,18</b>	<b>11</b>	<b>0,05</b>

n.a.: no analizado; n.d.: no detectado; n.c.: no se han cuantificado por no disponer de patrón o análogo. Extra: fracción extracelular (disuelta, agua filtrada); Intra: fracción intracelular (sestónica, biomasa retenida en el filtro).

LOQ: 0,02 y 0,01  $\mu\text{g/L}$ , para las fracciones extra- e intracelular, respectivamente.

<sup>a</sup>  $\mu\text{g/L}$  equivalentes teniendo en cuenta el volumen de muestra filtrado.

<sup>b</sup> MC no identificada. Tiene la misma fórmula empírica y por lo tanto masa exacta. El espectro de fragmentación no ha permitido diferenciar entre las posibles variantes con la misma  $m/z$ .

<sup>c</sup> La concentración, inferior al LOQ, se ha estimado por extrapolación de la recta.

Las MC de las que no se disponía de patrones comerciales se cuantificaron como  $\mu\text{g/L}$  equivalentes de MC-LR.

La concentración en el agua no superó en ningún caso el valor guía de la OMS y legislado en España para el agua de consumo humano (1  $\mu\text{g/L}$ ). Sólo en una de las muestras se observaron MCs intracelulares a una concentración total de 11  $\mu\text{g/L}$ , valor que puede suponer un riesgo en el caso de que se produjera la liberación de estas toxinas del interior de las células al agua. Aunque se debe tener en cuenta, que el valor paramétrico del RD 140/2013, aplica al agua tratada de salida de la ETAP, y las concentraciones elevadas de MCs se detectaron en la fracción sestónica del agua del embalse, sin tratamiento y que además las muestras se recogieron en las zonas de acumulación de algas y formación de *scums*. Hay que destacar también el nivel elevado de MC-dmRR en esta muestra (6,0  $\mu\text{g/L}$ ). En esta fracción se han encontrado diferentes variantes desmetiladas de las MC-HtyR, -LR y -RR y una variante de la MC-RR, la [(6Z-Adda<sup>5</sup>)MC-RR. La MC habitual en estas muestras ha sido la MC-RR, a niveles próximos al LOQ (0,02  $\mu\text{g/L}$ ) en el agua filtrada y a 11  $\mu\text{g/L}$  de MC total en la fracción intracelular de la muestra del 22/07/2010.

### *Embalses de la cuenca Galicia Costa (2010)*

De la cuenca Galicia Costa se recibieron dos muestras en el año 2010, de los embalses de Caldas y As Forcadas, y una muestra del embalse de As Forcadas en el año 2013. El muestreo en los dos años se realizó en el mes de octubre. La especie mayoritaria en Caldas fue *Microcystis aeruginosa* y en As Forcadas ambos episodios coincidieron con proliferaciones de *Anabaena planctónica* y *Microcystis aeruginosa* como especies dominantes junto a *Woronichinia naegeliana* en el año 2010.

El análisis cuantitativo de MCs en las dos fracciones se ha realizado por LC-ESI(+)-MS en el QqQ, excepto la fracción sestónica de la muestra de As Forcadas del año 2013 que se ha analizado por LC-ESI-HRMS. La fracción acuosa de las muestras recibidas en el año 2010 se ha extraído por SPE en línea al sistema LC-ESI-MS/MS adquiriendo en modo SRM y monitorizando las MC-LR, -RR, -YR y -dmRR. Para el análisis de la muestra de As Forcadas 2013 se ha añadido al método las transiciones para la cuantificación de las otras MCs de las que se dispuso de patrón comercial (MC-LA, -LF, -LW, -LY, -WR y -dmLR). En cambio para el *screening* de MCs en la fracción intracelular se ha realizado una extracción con metanol acidificado y se ha adquirido en modo de *Full Scan* y con un gradiente de fase móvil. En la *Tabla 4.18* se resumen las concentraciones de los compuestos detectados en todas las fracciones analizadas. En la fracción disuelta no se ha observado la presencia de MCs, excepto en la muestra de As Forcadas 2013 a concentraciones muy bajas (0,10 y 0,01 µg/L de MC-LR y MC-RR, respectivamente). En el extracto intracelular de las muestras, además de las MCs habituales y cuantificadas se han observado otras señales (ver *Tabla 4.18*) en las que podemos diferenciar dos grupos principales de compuestos: posibles variantes de MCs y otros péptidos relacionados como las anabaenopeptinas B, F y G.

**Tabla 4.18.** Concentración en µg/L de las MCs y péptidos relacionados detectados en las muestras de la cuenca Galicia Costa.

MCs identificadas	Caldas		Forcadas			
	20/10/2010		02/10/2013			
	Extra	Intra <sup>a</sup>	Extra	Intra <sup>a</sup>	Extra	Intra (µg/g)
MC-RR	n.d.	n.d.	n.d.	<b>0,23</b>	<b>0,01<sup>b</sup></b>	<b>6,3</b>
MC-YR	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<b>0,1</b>
MC-LR	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<b>0,11</b>	<b>200</b>
MC-dmRR	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MC-dmLR	n.a.	n.d.	n.a.	n.d.	n.d.	<b>6,4</b>
MC-WR	n.a.	n.d.	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.
MC-LA	n.a.	n.d.	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.
MC-LY	n.a.	n.d.	n.a.	n.d.	n.d.	<b>0,4</b>
MC-LW	n.a.	n.d.	n.a.	n.d.	n.d.	<b>0,4</b>
MC-LF	n.a.	n.d.	n.a.	n.d.	n.d.	<b>0,1</b>
No identificada ( <i>m/z</i> 1063,6; Ionización Negativa)	n.a.	n.d.	n.a.	<b>8,4</b>	n.a.	n.d.
No identificada ( <i>m/z</i> 1077,6; Ionización Negativa)	n.a.	n.d.	n.a.	<b>5,7</b>	n.a.	n.d.
Anabaenopeptina B	n.a.	n.c.	n.a.	n.d.	n.a.	n.d.
Anabaenopeptina F	n.a.	n.c.	n.a.	n.c.	n.a.	n.d.
Anabaenopeptina G	n.a.	n.d.	n.a.	n.c.	n.a.	n.d.

n.a.: no analizada.

n.d.: no detectado (<LOD, S/N<3).

n.c.: no se ha cuantificado por no disponer de patrón o análogo.

LOQ: 0,06-0,2 y 0,01 µg/L, para las fracciones extra- e intracelular, respectivamente.

<sup>a</sup> µg/L equivalentes teniendo en cuenta el volumen de muestra filtrado.

<sup>b</sup> <LOQ pero >LOD. Concentración estimada por extrapolación de la recta.

µg/L equivalentes de MC-LR.

Las MC de las que no se disponía de patrones comerciales se cuantificaron como equivalentes de MC-LR.



Como las muestras del año 2010 tenían una gran cantidad de alga después del filtrado de toda la muestra se pudo proceder a su posterior liofilización. En este caso, se ha realizado el análisis cualitativo directo de este liofilizado sin extracción ni separación cromatográfica mediante MALDI-TOF/TOF. En las Figuras 4.16 y 4.17 se muestra, a modo de ejemplo, los espectros de MALDI-TOF MS de la muestra de Caldas en modo de ionización positivo y el espectro de MALDI-TOF/TOF MS/MS de la señal de  $m/z$  1036,5556 [MC-RR-H]<sup>-</sup>, de la muestra de As Forcadas. Como no hay separación cromatográfica, el espectro de MS por esta técnica muestra de forma rápida y sencilla el perfil de MCs de la muestra, y permite la confirmación de la asignación de estas señales mediante su masa exacta (error inferior a 3 ppm). El análisis TOF/TOF permite confirmar la presencia de los fragmentos característicos de los compuestos en estudio y péptidos relacionados (ver Figura 4.17). En la Tabla 4.19 se muestran los compuestos mayoritarios observados ordenados por  $m/z$  con una identificación provisional, con las premisas de AMM y fragmentación, en base a búsqueda bibliográfica y el embalse en que se han identificado. Nueve señales susceptibles de ser consideradas MCs no han sido confirmadas por HRMS (la exactitud de la medida de masa exacta es superior a 3 ppm) y/o por fragmentación en MS/MS. En resumen, en la muestra de Caldas únicamente se ha confirmado la presencia de las anabaenopetinas B y F en la fracción intracelular (ver Figura 4.16), péptidos cíclicos presentes de forma frecuente en muestras de floraciones de *Microcystis aeruginosa*, como ya se ha mencionado anteriormente en la presente tesis. Por su parte, en la muestra de As Forcadas 2010 se han detectado dos anabaenopeptinas (F y G) y tres MCs, la MC-RR y dos MCs no descritas. Por su alta intensidad en el cromatograma, estas señales se han cuantificado (ver Tabla 4.18).

En la fracción sestónica de la muestra del embalse de As Forcadas del año 2013 se han identificado mediante LC-ESI-HRMS siete MCs (-LR, -RR, -dmLR, -LF, -LW, -LY y -YR). Las concentraciones se han expresado en  $\mu\text{g/g}$ . Destacar los 200  $\mu\text{g/g}$  de MC-LR y los 6,4 y 6,3  $\mu\text{g/g}$  de MC-dmLR y -RR, respectivamente, que representan el 94 y 3% del contenido total. También se ha identificado una MC sin confirmar ([Mdhb<sup>7</sup>]MC-LR o MC-HiIR) a un tiempo de retención de 7,8 minutos a un nivel estimado de 10  $\mu\text{g/g}$ . En la Figura 4.18 se muestran los espectros de masas en modo de ionización positivo y negativo registrados por adquisición *Full Scan* y *AIF* con fragmentación en la celda HCD de esta MC. La exactitud en la medida de masa respecto a las  $m/z$  teóricas ha sido de 1,8 ppm para las dos señales en ESI positivo ([M+2H]<sup>2+</sup> y [M+H]<sup>+</sup>) y de 1,2 ppm para la señal [M-H]<sup>-</sup>. Ambas MCs tienen la misma fórmula empírica y en consecuencia igual masa exacta. No se han podido comparar sus espectros de masas de fragmentación con los teóricos.

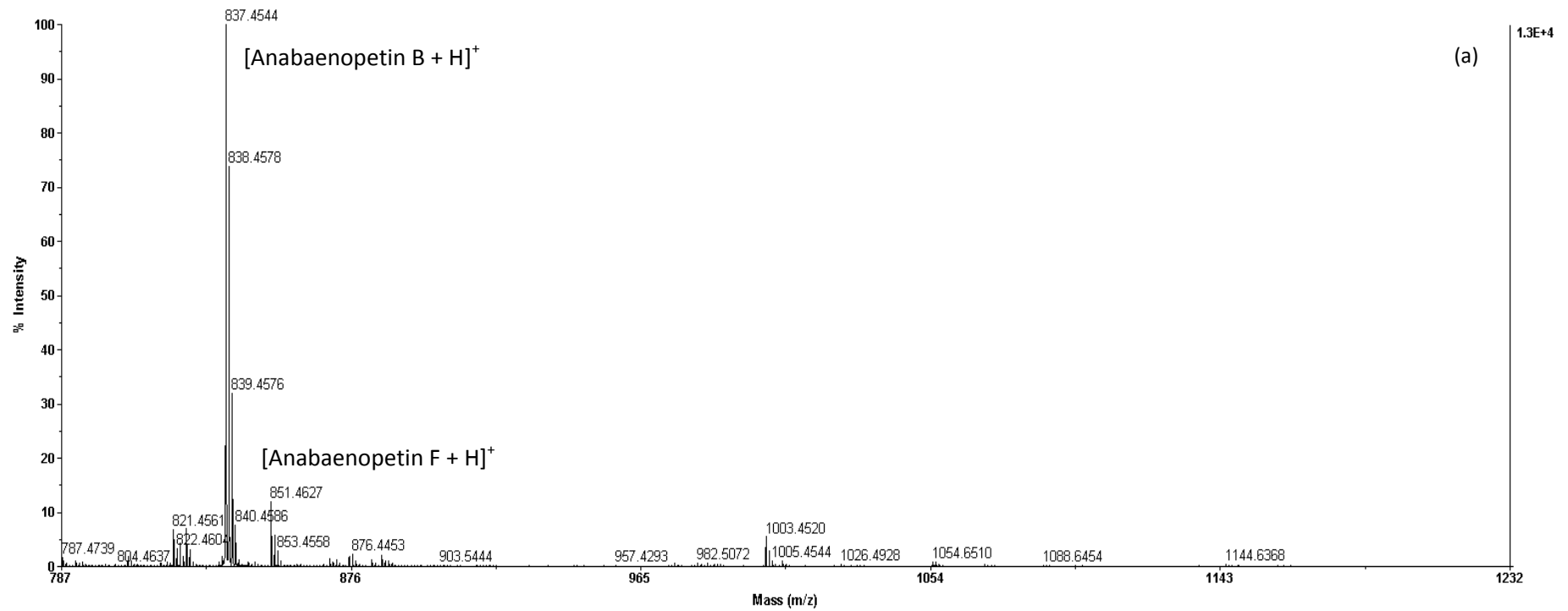


Figura 4.16. Espectro de masas MALDI-TOF de la fracción sestónica del *bloom* de Caldas en modo de ionización positivo.

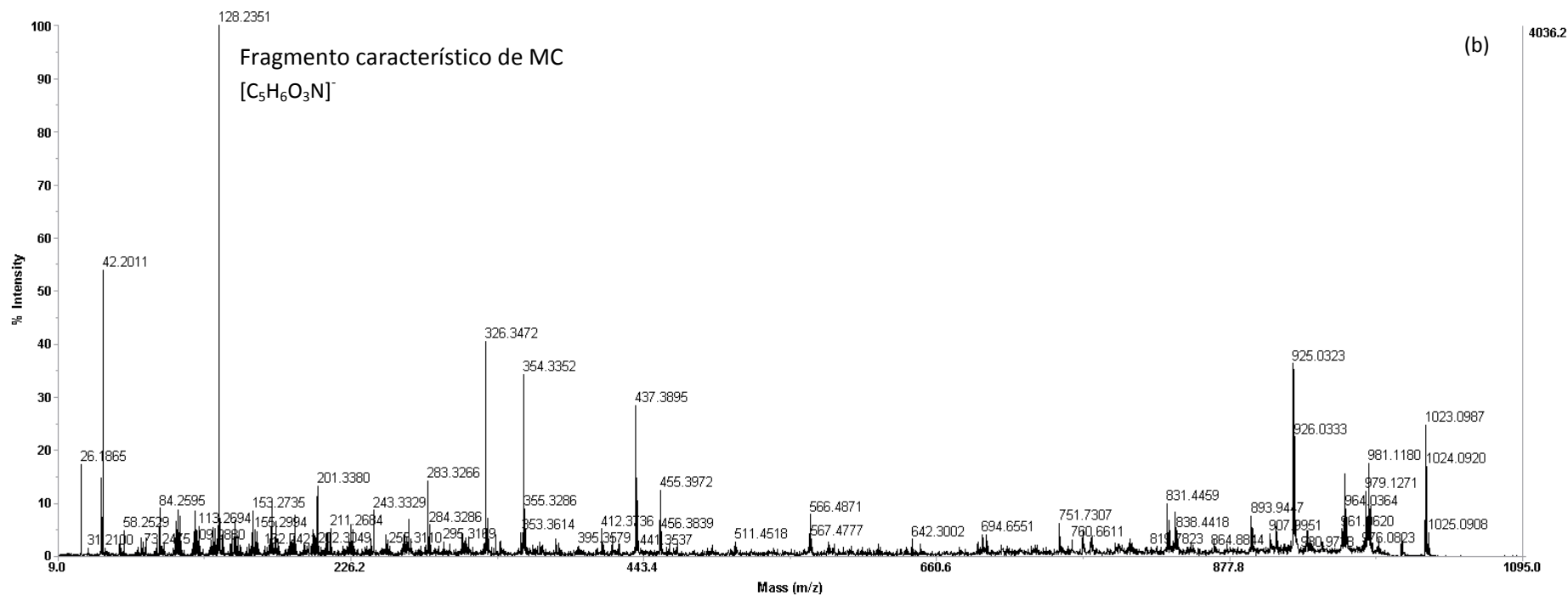


Figura 4.17. Espectro MS/MS MALDI-TOF/TOF de la señal de  $m/z$  1036,5556, [MC-RR-H]<sup>-</sup> del liofilizado de la muestra de Forcadás.

**Tabla 4.19.** Posibles MCs y péptidos relacionados en el análisis mediante MALDI-TOF/TOF en las muestras de los dos *blooms* de la cuenca de Galicia Costa en el año 2010, Caldas y Forcadas.

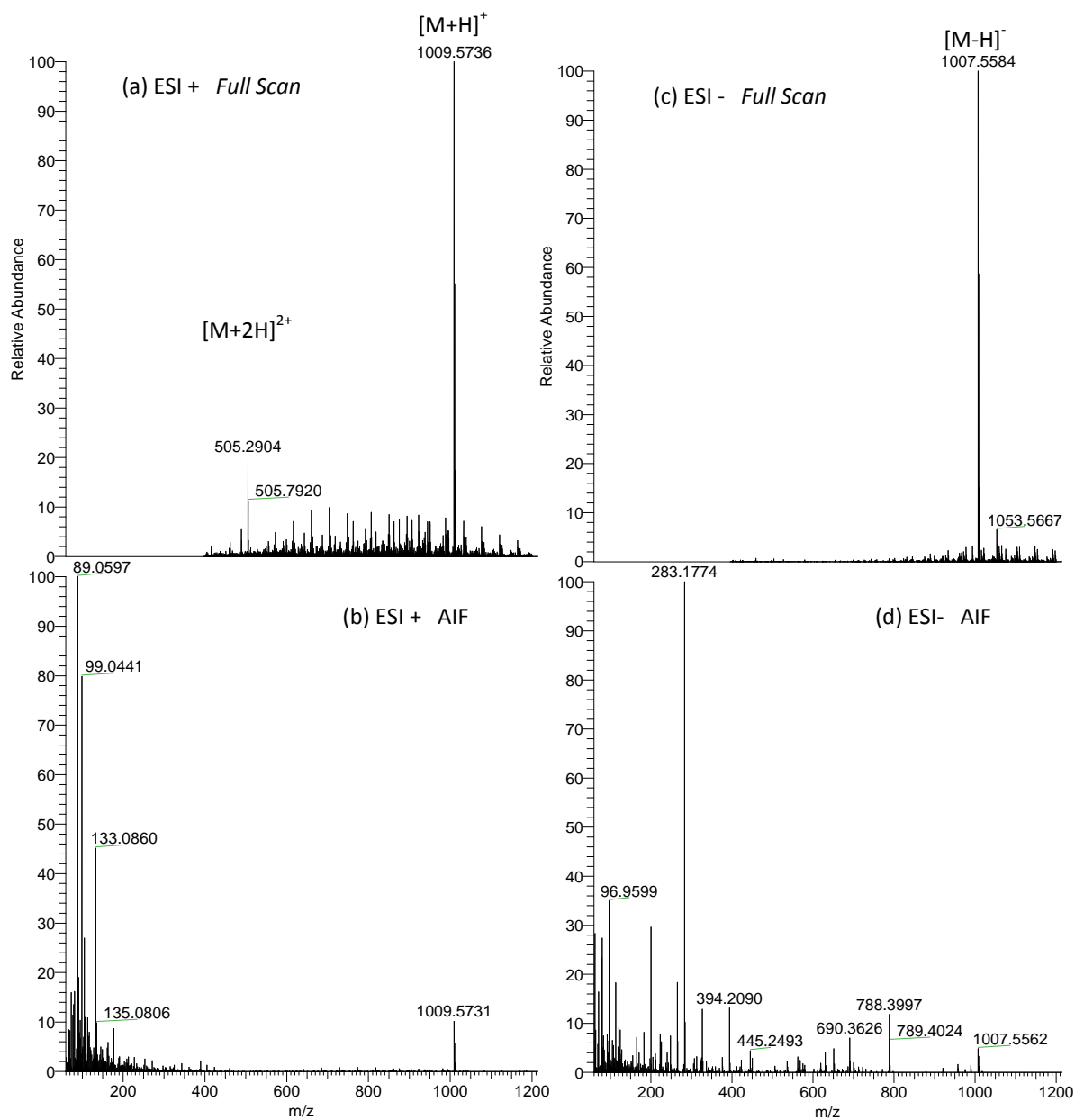
Identificación	<i>m/z</i>	Modo de Ionización	Error AMM (ppm)	Confirmación TOF/TOF <sup>a</sup>	Muestra
Anabaenopeptina B	837,4544	+/-	<b>2,7</b>	<b>SI</b>	Caldas
Anabaenopeptina F	851,4727	+	<b>5,5</b>	<b>SI</b>	Caldas, Forcadas
X	919,5896	-		NO	Caldas
Anabaenopeptina G	907,5099	-	<b>5,7</b>	<b>SI</b>	
X	977,5087	+		NO	Forcadas
X	991,5965	+		NO	
X	1003,5007	+		NO	Caldas
MC-RR	1038,5705 1036,5556	+/-	<b>2,5</b> <b>2,8</b>	<b>SI</b>	
No identificada	1063,5123	-		<b>SI</b>	
No identificada	1077,5346	-		<b>SI</b>	
X	1101,5984	+		NO	Forcadas
X	1118,5873	-		NO	
X	1142,5023	+		NO	
X	1156,5926	+		NO	
X	1172,5989	+		NO	

<sup>a</sup> Confirmación por HRMS (exactitud < 3 ppm) y mediante experimentos de fragmentación TOF/TOF (detección de los fragmentos diagnósticos).

X: identificación descartada, no son MC. No cumplen alguno o todos los criterios de confirmación.

SI: identificación a partir de las medidas de masa exacta y los fragmentos característicos de los compuestos en estudio.

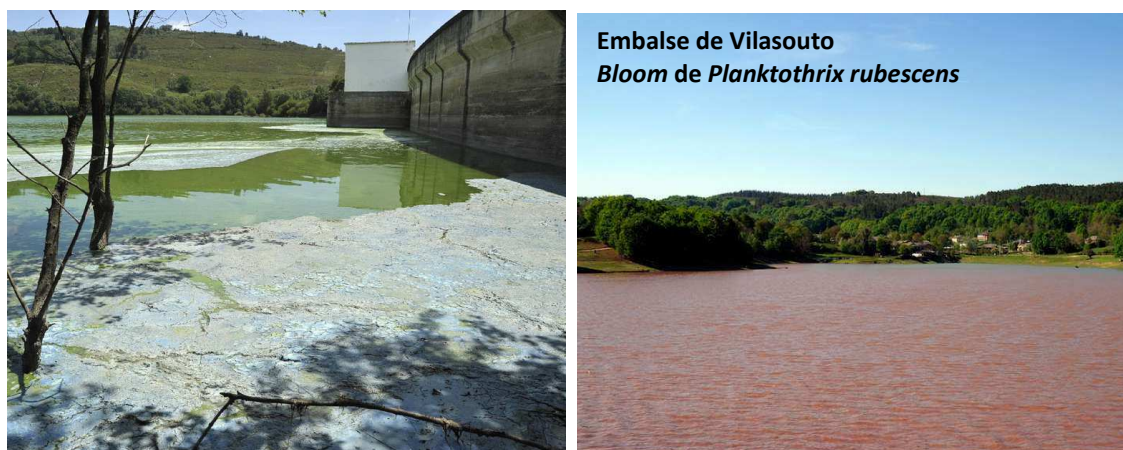
NO: no se observan los fragmentos característicos de los compuestos en estudio en los espectros de MS/MS y/o la exactitud de la medida de masa exacta es > 10 ppm.



**Figura 4.18.** Espectros de masas de la señal identificada como  $[Mdhb^7]MC-LR$  o  $MC MC-HiLR$  en modo de ionización positivo (a y b) y negativo (c y d) registrados por adquisición *Full Scan* (a y c) y *AIF* con fragmentación en la celda HCD (b y d).

*Embalses de la Cuenca Miño-Sil (2011 y 2013)*

De la cuenca Miño-Sil se recibieron dos muestras en el mes de abril del año 2011, de los embalses de Las Conchas y Vilasouto, y cinco muestras de los embalses de Cachamuiña, Castadón, Las Conchas, Los Peares y Vilasouto, en el año 2013 (septiembre y octubre). Las especie dominantes fueron *Microcystis aeruginosa* en los embalses de Las Conchas y Los Peares, junto a *Anabaena crassa* en los embalses de Cachamuiña y Castadón, y *Planktothrix rubescens* junto a *Anabaena planctónica* en el embalse de Vilasouto (ver *Tabla 4.10*). En la *Figura 4.19* se muestra el estado de los embalses de Las Conchas y Vilasouto durante los episodios de *bloom* del año 2011.



**Figura 4.19.** Fotografías de los embalses de Las Conchas y Vilasouto durante las floraciones del año 2011.

El agua se analizó directamente, después de filtrar y añadir el patrón interno, por SPE en línea al sistema LC-ESI-MS/MS y el filtro después de su extracción con metanol acidificado se analizó por LC-ESI-HRMS. La fracción acuosa de las muestras del año 2011 se analizó también por inyección directa al sistema LC-ESI-HRMS. En LC-ESI-MS/MS se ha adquirido en modo SRM monitorizando las MC-LR, -RR, -YR y -dmRR para las muestras recibidas en el año 2011 y para el análisis de las muestras del año 2013 se ha añadido al método las transiciones para la cuantificación de las otras MCs de las que se dispuso de patrón comercial (MC-LA, -LF, -LW, -LY, -WR y -dmLR). En cambio para el *screening* de MCs mediante LC-ESI-HRMS se ha adquirido en modo de *Full Scan*. En las *Tablas 4.20* y *4.21* se muestran los resultados del análisis de las dos fracciones, intra- y extracelular. Además, una alícuota del extracto de la fracción sestónica de la muestra de Vilasouto 2013 también ha sido analizada por derivatización con un grupo tiol y LC-MS según la metodología puesta a punto por Miles y col. (2012), con el fin de obtener evidencia de la presencia de Mdha o Dha y para diferenciar entre los aminoácidos isobáricos Mdha y Dhb en las señales candidatas a ser identificadas como MCs. Hay que destacar que las dos únicas variantes detectadas en esta muestra han sido confirmadas como análogos desmetilados (MC-dmLR y -dmRR) que contenían el

aminoácido Dhb en la posición 7 en lugar de Dha. La *Figura 2.20* muestra, a modo de ejemplo, los cromatogramas LC-ESI-HRMS: TIC en modo de adquisición de *Full Scan* y extrayendo las  $m/z$  de los iones fragmento diagnósticos de  $m/z$  135,0804 y 128,0353 en modo de adquisición AIF de la fracción extracelular de esta muestra de Vilasouto mediante análisis LC-ESI-HRMS en ambos modos de ionización, positivo y negativo. El cromatograma extraído según el fragmento característico, permite de forma rápida confirmar cuáles de las señales del cromatograma en modo de adquisición *Full Scan* se pueden confirmar como MC o péptidos relacionados. La figura, también incluye los cromatogramas de las  $m/z$  extraídas en *Full Scan* y modo de ionización negativo de las cuatro señales detectadas en la muestra (anabaenopeptinas B y F, MC-dmLR y -dmRR).

Las concentraciones de MC total en la fracción extra- e intracelular han oscilado entre 0,01-22 y 0,22-44  $\mu\text{g/L}$ . Normalmente la concentración de la fracción sestónica es mayor que la de la fracción acuosa disuelta porque en el interior de las células se suele encontrar la mayor carga de toxinas. La muestra de Las Conchas del año 2011 curiosamente ha presentado una concentración extracelular más elevada, debido a que seguramente se ha debido producir una lisis de las células y estas han liberado las toxinas al agua. En la muestra de Los Peares no se ha observado biomasa en el filtro y en la fracción sestónica del embalse de Vilasouto no se ha detectado ninguna MC. Respecto a las muestras de los embalses de Cachamuiña, Castadón y Las Conchas en que la concentración en la biomasa se ha cuantificado en  $\mu\text{g/g}$ , los niveles de MC total han oscilado entre pocos nanogramos por gramo en la muestra del embalse de Las Conchas (75 ng/g) hasta 0,6 y 1,8 mg/g de las muestras de los embalses de Castadón y Cachamuiña, respectivamente. Las MC más hidrofóbicas, como la MC-LA, -LF, -LW y -LY no se han detectado en ninguna de las fracciones de las muestras de la cuenca Miño-Sil. Las MCs mayoritarias han sido la MC-RR, -LR, -dmRR y-(H<sub>4</sub>)YR. La Oscillamida Y se ha observado en la biomasa de la muestra del embalse de Cachamuiña. Las anabaenopeptinas A, B y F también se han identificado en algunas muestras (ver *Tablas 4.20* y *4.21*). En las *Figuras 4.20* y *4.21* se muestran los espectros de masas de la MC-(H<sub>4</sub>)YR y la [L-Mser<sup>7</sup>]MC-LR presentes en las muestras de los embalses de Castadón y Cachamuiña obtenidos mediante LC-ESI-HRMS y de sus fragmentaciones en la celda HCD por AIF, a modo de ejemplo. En la *Figura 4.20* se han incluido estos resultados en los dos modos de ionización, positivo y negativo. Se han indicado los ppm's de error en la medida de la masa de la señal más intensa del espectro de masas y de los fragmentos diagnósticos de MC ( $m/z$  135,0804 y 128,0354). Este error ha oscilado con valor absoluto entre 0,01-1 ppm.

**Tabla 4.20.** . Concentración en µg/L de las MCs y péptidos relacionados detectados en las muestras de la cuenca hidrográfica Miño-Sil.

MCs identificadas	2011				2013							
	Las Conchas 2011		Vilasouto 2011		Cachamuiña	Castadón	Los Peares		Las Conchas		Vilasouto	
	Extra	Intra	Extra	Intra	Extra	Extra	Extra	Intra	Extra	Extra	Intra	
Anabaenopeptina B	n.d.	<b>n.c.</b>	<b>n.c.</b>	<b>n.c.</b>	n.a.	n.a.	n.a.	No aplica	n.a.	n.a.	n.d.	
Anabaenopeptina F	n.d.	n.d.	<b>n.c.</b>	<b>n.c.</b>	n.a.	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.	n.d.	
Oscillamida Y	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.a.	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.	n.d.	
MC-dmLR	n.d.	n.d.			<b>0,02</b>	n.d.	n.d.	No aplica	<b>0,27</b>	n.d.	n.d.	
[Asp <sup>3</sup> , Dhb <sup>7</sup> ]MC-LR <sup>a</sup> (-dmLR)	n.d.	n.d.	<b>3,1</b>	<b>2,9</b>	n.d.	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.	n.d.	
MC-LR	<b>1,4</b>	<b>0,13</b>	n.d.	n.d.	<b>0,52</b>	<b>0,02</b>	n.d.		<b>0,47</b>	n.d.	n.d.	
[Asp <sup>3</sup> , Dhb <sup>7</sup> ]MC-RR <sup>a</sup> (-dmRR)	n.d.	n.d.	<b>19</b>	<b>41</b>	n.d.	n.d.	n.d.	No aplica	n.d.	<b>0,02</b>	n.d.	
MC-RR	<b>0,54</b>	<b>0,06</b>	n.d.	n.d.	<b>0,70</b>	<b>0,01<sup>b</sup></b>	<b>0,01<sup>b</sup></b>		<b>0,28</b>	<b>0,01<sup>b</sup></b>	n.d.	
MC-YR	<b>0,11</b>	<b>0,01</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		<b>0,24</b>	n.d.	n.d.	
MC-WR	n.d.	<b>0,02</b>	n.d.	n.d.	<b>0,05</b>	n.d.	n.d.	<b>0,08</b>	n.d.	n.d.		
<b>MCs TOTAL</b>	<b>2,0</b>	<b>0,22</b>	<b>22</b>	<b>44</b>	<b>1,3</b>	<b>0,03</b>	<b>0,01</b>	<b>1,3</b>	<b>0,03</b>	n.d.		

n.a.: no analizado.

n.d.: no detectado (<LOD, S/N<3).

n.c.: no se ha cuantificado por no disponer de patrón o análogo.

LOQ: 0,02 y 0,01 µg/L, para las fracciones extra- e intracelular, respectivamente.

No aplica: no se ha recogido alga en el filtro.

Extra: fracción extracelular o disuelta (agua filtrada).

Intra: fracción intracelular o sestónica (filtro).

Concentraciones intra: µg/L equivalentes, teniendo en cuenta el volumen de agua filtrado para cada muestra.

<sup>a</sup> Identificación confirmada mediante derivatización con grupo tiol y análisis por LC-MS.

<sup>b</sup> Concentración inferior al LOQ estimada por extrapolación de la recta.

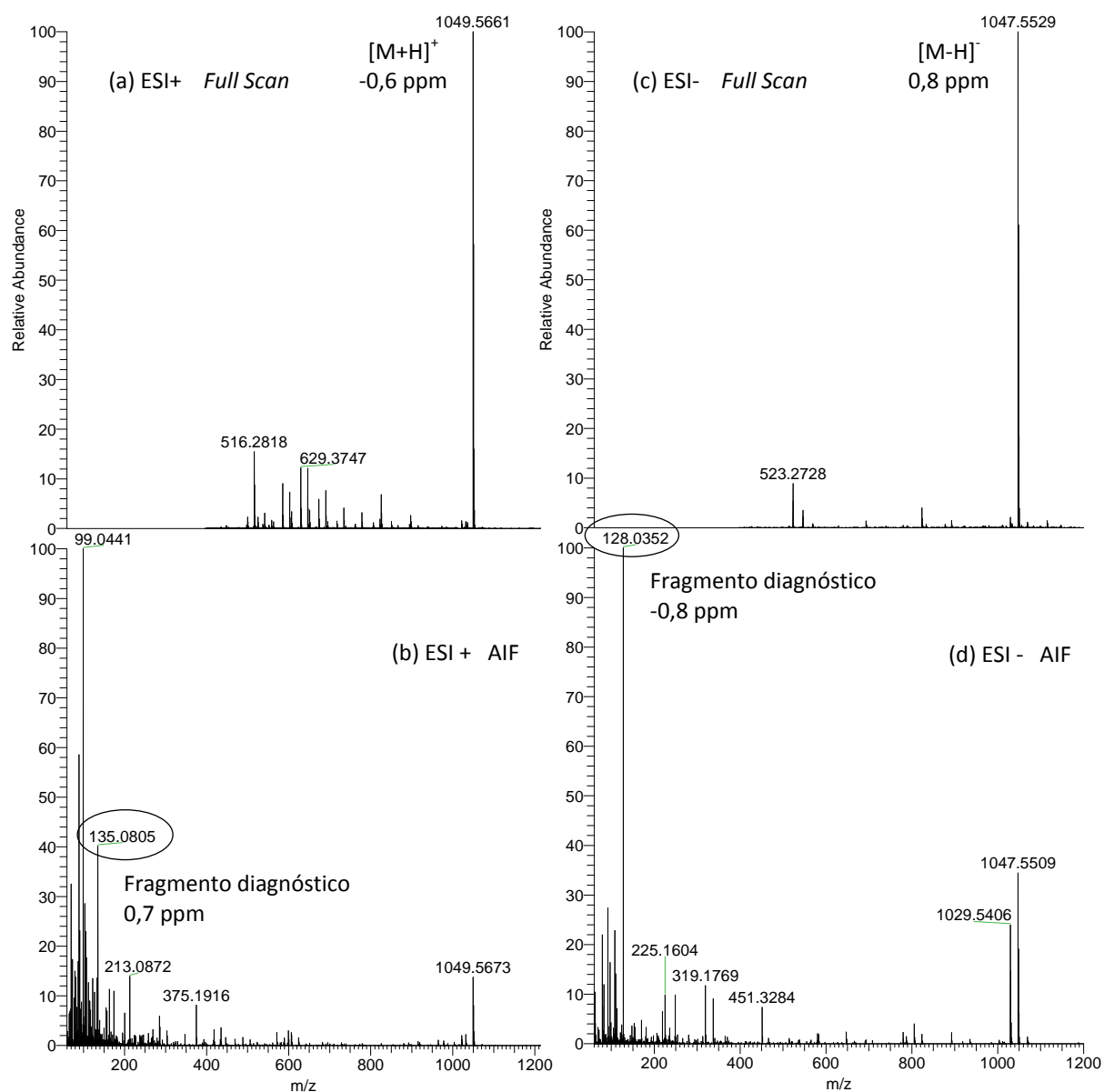


En la *Tabla 4.21* se muestran otras MCs cuantificadas en las muestras como equivalentes de MC-LR de las que no se dispone de estándares.

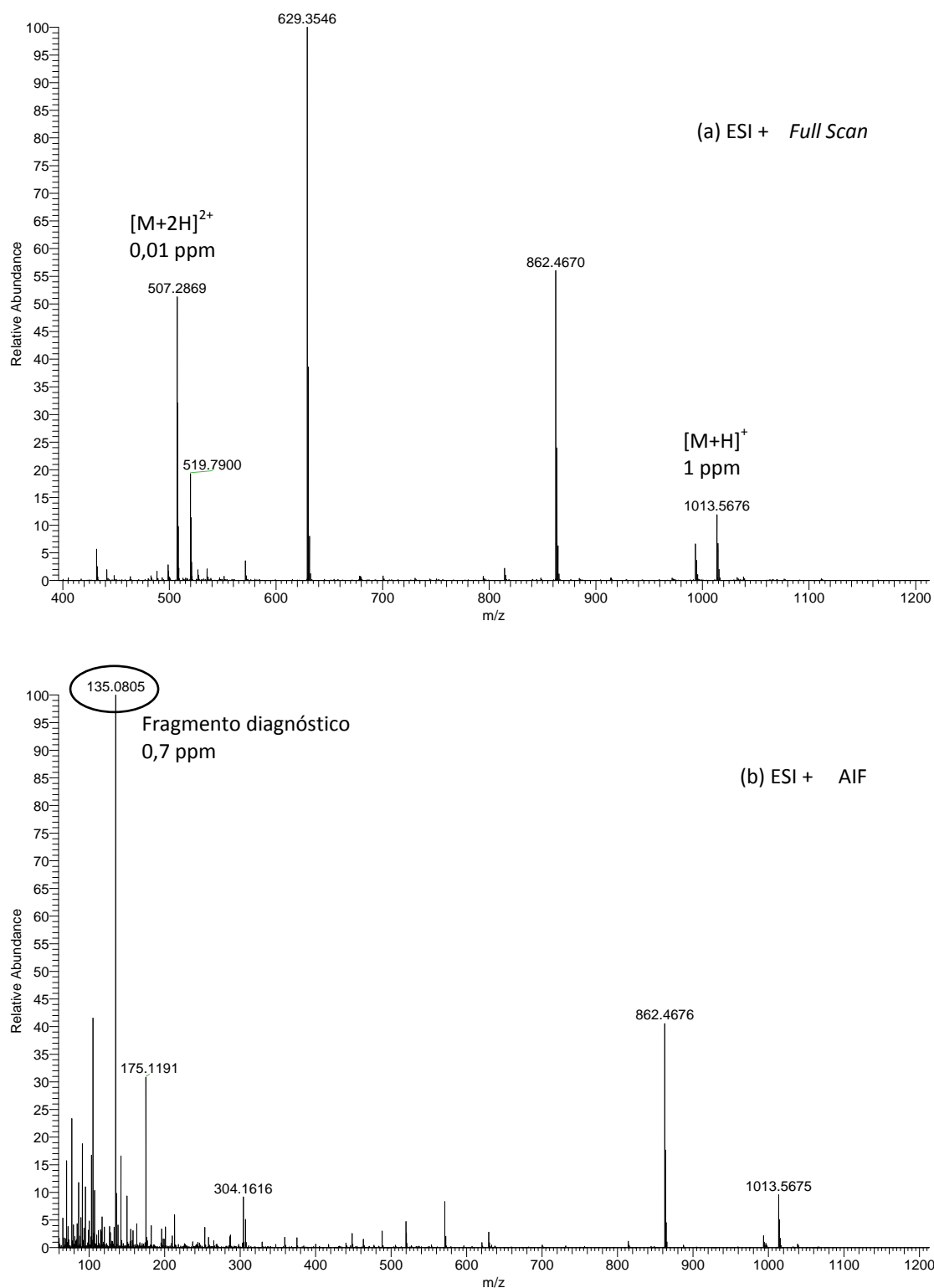
**Tabla 4.21.** Concentración de otras MCs identificadas en las muestras en µg/g equivalentes de MC-LR.

MCs identificadas	20/09/13		
	Cachamuíña	Castadón	Las Conchas
MC-dmLR	25	<b>9,3</b>	n.d.
MC-LR	357	<b>124</b>	<b>0,001</b>
[Asp <sup>3</sup> , Dhb <sup>7</sup> ]MC-RR	55	<b>20</b>	n.d.
MC-RR	929	<b>305</b>	<b>0,066</b>
MC-YR	68	<b>20</b>	<b>0,005</b>
MC-WR	52	<b>17</b>	<b>0,032</b>
Anabaenopeptina A	n.c.	n.c.	n.c.
Anabaenopeptina B	n.c.	n.c.	n.c.
Anabaenopeptina F	n.c.	n.c.	n.d.
Oscillamida Y	n.c.	n.d.	n.d.
[L-Mser <sup>7</sup> ]MC-LR	<b>35</b>	n.d.	n.d.
[D-Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>7</sup> ]MC-LR o [Gly <sup>1</sup> , Asp <sup>3</sup> ]MC-LR	<b>2,5</b>	n.d.	n.d.
MC-(H <sub>4</sub> )YR	<b>173</b>	<b>64</b>	n.d.
[L-Se <sup>r7</sup> ]MC-LR	<b>53</b>	n.d.	n.d.
[Mdhb <sup>7</sup> ]MC-LR o MC-HiIR <sup>a</sup>	<b>27</b>	<b>6,8</b>	n.d.
[Mdhb <sup>7</sup> ]MC-LR o MC-HiIR <sup>a</sup>	<b>16</b>	n.d.	n.d.
MC-LL	<b>38</b>	n.d.	n.d.
[Dha <sup>7</sup> ]MC-HphR o MC-FR	n.d.	<b>2,5</b>	n.d.
<b>TOTAL</b>	<b>1830</b>	<b>568</b>	<b>0,075</b>

<sup>a</sup> Dos señales con tiempo de retención diferente.



**Figura 4.20.** Espectros de masas de la MC-(H<sub>4</sub>)YR en el embalse de Castadón mediante LC-ESI-HRMS (a y c) y de sus fragmentaciones en la celda HCD por AIF (b y d), en los dos modos de ionización, positivo (a y b) y negativo (c y d). Se han indicado los ppm's de error en la medida de la masa de las señales [M+H]<sup>+</sup> y [M-H]<sup>-</sup> y de los fragmentos diagnósticos de MC (m/z 135,0804 y 128,0354).



**Figura 4.21.** Espectros de masas de la [L-Mser<sup>7</sup>]MC-LR en la muestra del embalse de Cachamuiña mediante. (a) LC-ESI-HRMS; y, (b) de su fragmentación en la celda HCD por AIF. Se han indicado los ppm's de error en la medida de la masa de las señales [M+H]<sup>+</sup> y [M+2H]<sup>2+</sup> y del fragmento diagnóstico de las MC de  $m/z$  135,0804.

*Embalse de San Juan (Cuenca del Tajo, 2013)*

En septiembre del año 2013 se recibió por separado el agua filtrada y el filtro de una muestra de un bloom del embalse de San Juan en el río Alberche de Madrid (cuenca del río Tajo). El agua se analizó directamente, después de añadir el patrón interno, por SPE en línea al sistema LC-ESI-MS/MS en modo de adquisición SRM y en gradiente, monitorizando las nueve MCs de las que se disponía de patrón comercial (-dmLR -dmRR, -LA, LF, -LR, LW, -RR, -WR, -YR). El filtro después de su extracción en metanol acidificado se analizó por LC-ESI-HRMS. En las *Tablas 4.22 y 4.23* se muestran los resultados del análisis de las dos fracciones, extra- e intracelular. Además de la concentración en  $\mu\text{g/L}$ , en la tabla de los resultados de la fracción intracelular se incluyen los valores de la exactitud en la medida de la masa exacta del ion molecular ( $[M+H]^+$ ,  $[M+2H]^{2+}$  o  $[M-H]^-$ ) y del fragmento característico utilizado como ion diagnóstico ( $m/z$  135,0804 y 128,0353) en modo de ionización positivo y negativo, respectivamente, expresada en ppm's.

**Tabla 4.22.** Concentración extracelular (en ng/L) de las MCs cuantificadas por LC-ESI-MS/MS en la muestra de agua superficial del embalse San Juan, río Alberche, Madrid (Cuenca del río Tajo), año 2013.

MCs identificadas	Concentración ( $\mu\text{g/L}$ )
MC-dmRR	n.d.
MC-RR	<b>0,12</b>
MC-dmLR	n.d.
MC-YR	<b>0,04</b> <sup>a</sup>
MC-LR	<b>0,09</b>
MC-WR	<b>0,04</b>
MC-LA	n.d.
MC-LY	n.d.
MC-LW	n.d.
MC-LF	n.d.
<b>TOTAL</b>	<b>0,29</b>

n.d.: no detectado.

LOQ: 0,02 ng/L.

<sup>a</sup> No confirmado. No cumple la tolerancia según Decisión 2002/657/CE del criterio de confirmación en la relación entre las dos transiciones que se monitorizan.

**Tabla 4.23.** Concentración intracelular (en µg/L) de las MCs cuantificadas por LC-ESI-HRMS en la muestra de agua superficial del embalse San Juan, río Alberche, Madrid (cuenca del río Tajo), año 2013. Se incluyen los valores de la exactitud de la medida de la masa expresada en ppm's.

MCs identificadas	Error (ppm)				Concentración (µg/L)
	[M+H] <sup>+</sup> /[M+2H] <sup>2+</sup>	Fragmento diagnóstico m/z 135,0804	[M-H] <sup>-</sup>	Fragmento diagnóstico m/z 128,0353	
MC-dmRR	<b>1,2</b>	<b>0,7</b>	<b>2,7</b>	<b>-2,3<sup>a</sup></b>	<b>1,6</b>
MC-RR	<b>1,0</b>	<b>0,7</b>	<b>0,1</b>	<b>-1,6</b>	<b>65</b>
MC-dmLR	<b>1,8</b>	-	<b>1,1</b>	-	<b>0,4</b>
MC-YR	<b>1,9</b>	<b>0,7</b>	<b>-0,2</b>	<b>-1,6</b>	<b>12</b>
MC-LR	<b>1,5</b>	<b>0,7</b>	<b>-0,5</b>	<b>-1,6</b>	<b>14</b>
MC-WR	<b>0,8</b>	<b>0,7</b>	<b>-0,6</b>	-	<b>1,7</b>
MC-LA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MC-LY	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MC-LW	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MC-LF	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MC-WAba	<b>0,1</b>	<b>0,6</b>	n.d.	n.d.	<b>0,21</b>
MC-(H <sub>4</sub> )YR	<b>-0,6</b>	<b>0,6</b>	<b>-0,2</b>	<b>0,8</b>	<b>1,4</b>
MC-HtyR	<b>-0,1</b>	<b>1,5</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>0,79</b>
MC-KynA	<b>-1,1</b>	<b>0,7</b>	n.d.	n.d.	<b>0,54</b>
MC-OiaA	<b>0,2</b>	<b>0,7</b>	<b>-0,5</b>	<b>-3,9<sup>a</sup></b>	<b>9,8</b>
[Gly <sup>1</sup> ,Asp <sup>3</sup> ,ADMAAdda <sup>5</sup> ]MC-LR	<b>3,9</b>	n.d.	<b>1,1</b>	<b>-4,7<sup>a</sup></b>	<b>0,21</b>
MC-OiaAba	n.d.	n.d.	<b>1,1</b>	<b>-4,7<sup>a</sup></b>	<b>0,14</b>
Anabaenopeptina B	2,3	n.d.	<b>3,4</b>	<b>-0,8</b>	n.c.
<b>TOTAL</b>					<b>108</b>

<sup>a</sup> Intensidad de la señal en el espectro de masas muy baja.

n.d.: no detectado; n.c.: no se ha cuantificado por no disponer de patrón o análogo; LOQ: 0,06-0,2 µg/L.

ppm: exactitud en la medida de la masa exacta expresada como partes por millón.

-: no se confirma la presencia del fragmento por interferencias con otras posibles MCs.

En general se detecta la presencia de MC-LR, -RR, -YR, -WR, -dmLR, -dmRR y se observan otras señales susceptibles de ser MCs de las que no se dispone de patrón comercial (ver *Tabla 4.23*). Las variantes mayoritarias son las MC -RR, -LR, -YR, -WR y -OiaA, con concentraciones individuales comprendidas entre 4,0-116 ng/L y 0,14-65 µg/L para cada fracción, acuosa y sestónica, respectivamente. En el filtro, la MC-dmLR y la -WR no se confirman adecuadamente por fragmentación debido a otras señales susceptibles de ser MCs. También se detectan 10 MCs con una identificación no inequívoca, se plantean varias posibles variantes descritas en la bibliografía que tienen la misma fórmula empírica y por lo tanto masa exacta. El espectro de fragmentación no ha permitido diferenciar entre estas análogas con la misma  $m/z$ . Cuando la intensidad de la señal es débil se ha aceptado una exactitud mayor de 3 ppm (MC-OiaA, -OiaAba y [Gly<sup>1</sup>,Asp<sup>3</sup>,ADMAdda<sup>5</sup>]MC-LR), que en todos los casos ha sido menor que 5 ppm. Las MC menos concentradas no se han confirmado en ambos modos de ionización, positivo y negativo, y sólo se han observado las señales formando el ion que les es más afín según su estructura (MC-dmLR, -WR, -Waba, -HtyR, -KynA en ESI positivo y MC-OiaAba en ESI negativo). En el espectro de fragmentación de la [Gly<sup>1</sup>,Asp<sup>3</sup>,ADMAdda<sup>5</sup>]MC-LR no se ha detectado el fragmento característico de  $m/z$  135,0804.

En la cuantificación de la MC-YR en el agua mediante LC-ESI-MS/MS no se cumple la tolerancia permitida del criterio de confirmación en la relación entre cada una de las dos transiciones que se monitorizan en SRM por cada analito de acuerdo con la Decisión 2002/657/CE. Esto indica que posiblemente en esta muestra tenemos una interferencia o un efecto matriz que altera el área de las señales para la cuantificación.

#### 4.2.5. Caracterización de microcistinas en cultivos y materiales de referencia

Este trabajo proporciona las bases para el desarrollo tecnológico y la producción de estándares analíticos de las toxinas presentes en cada cultivo. Además, los cultivos se han caracterizado para su posible utilización en ejercicios de intercomparación y validación de métodos.

Los cultivos y el material de referencia certificado estudiados en esta tesis se detallan en la *Tabla 4.24*.

**Tabla 4.24.** Listado de los cultivos y el material de referencia certificado analizados.

<b>Cultivos</b>	<b>Año</b>
CAAT 2005-3, Pila, Buenos Aires, Argentina	2011
Cultivo PCC 7820, <i>Microcystis aeruginosa</i>	2009
<b>Material de Referencia Certificado</b>	<b>Año</b>
NIES CRM Nº26 Water bloom, <i>Microcystis aeruginosa</i> , 4,5 ± 0,4 mg/g Microcystins	2009

PCC: *Pasteur Culture Collection*.

CRM: material de referencia certificado

### **CAAT 2005-3, Pila, Buenos Aires, Argentina**

El objetivo de este estudio es la caracterización de una cepa nativa de *Microcystis aeruginosa* aislada de un cuerpo de agua dulce eutrofizado de la ciudad de Pila en la provincia de Buenos Aires, Argentina.

La muestra de *bloom* se obtuvo el 17 de septiembre de 2005 desde el canal de drenaje del tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Pila (35 ° 59'49" S, 58 ° 08'11" W), provincia de Buenos Aires, Argentina.

Una cepa de *M. aeruginosa* se separó de la muestra de floración mediante aislamiento capilar y se aclimató a las condiciones de laboratorio. A la cepa de *M. aeruginosa* aislada se la denominó CAAT 2005-3. Se aisló una única célula que se hizo crecer en condiciones estériles en medio BG11, a 20°C y bajo iluminación continua.

La cepa *Microcystis* fue identificada taxonómicamente siguiendo la aproximación al sistema de clasificación de cyanophytes de Komarek y Anagnostidis (1986). Las mediciones se hicieron con un microscopio invertido, siguiendo la metodología Utermöhl (1958).

El análisis de la secuencia mostró un 97% de similitud con las secuencias anteriormente descritas de cepas *M. aeruginosa*. El análisis filogenético mostró que la secuencia se agrupa con otras secuencias de *M. aeruginosa* obtenidas de las bases de datos del *National Center for Biotechnology Information*. Además, esta primera cepa Argentina de *M. aeruginosa* (CAAT 2005-3), desarrollada bajo condiciones de cultivo, mantuvo la arquitectura colonial típica de *M. aeruginosa*, con abundantes mucílagos.

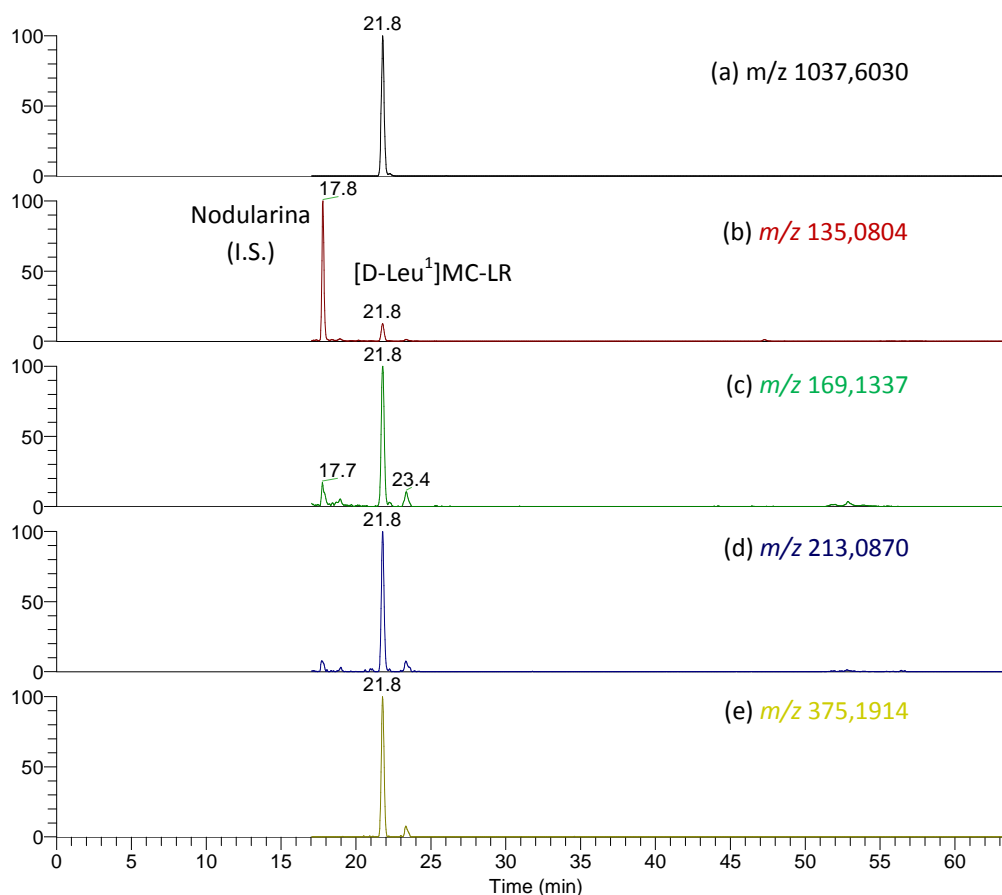
Para el análisis por LC-MS, las muestras fueron extraídas con un 5% de ácido acético y con ultrasonificación durante 30 min, seguidamente se centrifugaron durante 15 min a 5000 r/min. El sobrenadante se pasó por un cartucho de extracción en fase sólida (Sep-Pak C18), después de su acondicionamiento (10 mL de metanol, 50 mL de agua Milli Q). Las toxinas se eluyeron con un 80% de metanol. Los extractos se analizaron mediante LC-ESI-HRMS según las condiciones analíticas descritas en el *Capítulo 2* y resumidas en el *apartado 2.3* y en la *Tabla 2.3*.

El análisis mediante LC-ESI-HRMS de los extractos de esta cepa CAAT 2005-3 reveló la presencia únicamente de una variante de toxina que fue identificada como [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR (C<sub>52</sub>H<sub>80</sub>N<sub>10</sub>O<sub>12</sub>, [M+H]<sup>+</sup> = *m/z* 1037,6030) en base a su tiempo de retención, la medida de masa exacta por HRMS del ion molecular y de los iones producto en la fragmentación HCD (exactitud < 3 ppm) y el perfil isotópico de la señal [M+H]<sup>+</sup>. En la *Figura 4.22* se muestra el cromatograma obtenido del análisis LC-HRMS extrayendo las *m/z* de la [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR y de sus iones fragmento característicos (135,0804; 169,1337; 213,0870; 375,1914). El tiempo de retención fue consistente con la [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR purificada de floraciones naturales recogidas del río de La Plata (Andrinolo y col., 2007)). El espectro de HRMS (*Figura 4.23*) reveló la presencia de un ion molecular ([M+H]<sup>+</sup>) de *m/z* 1037,6025 con una exactitud de la medida de la masa de - 0,5 ppm respecto a la *m/z* 1037,6030 teórica (*Tabla 4.25*). Se descarta su identificación como otras variantes de MC de *m/z* similar como la [ADMAdda<sup>5</sup>]MC-LHar (C<sub>51</sub>H<sub>76</sub>N<sub>10</sub>O<sub>13</sub>, [M+H]<sup>+</sup> = *m/z* 1037,5666), tanto por los errores en la exactitud de la medida de masa (-35 ppm) como por la concordancia del perfil isotópico (*Figura 4.23*).

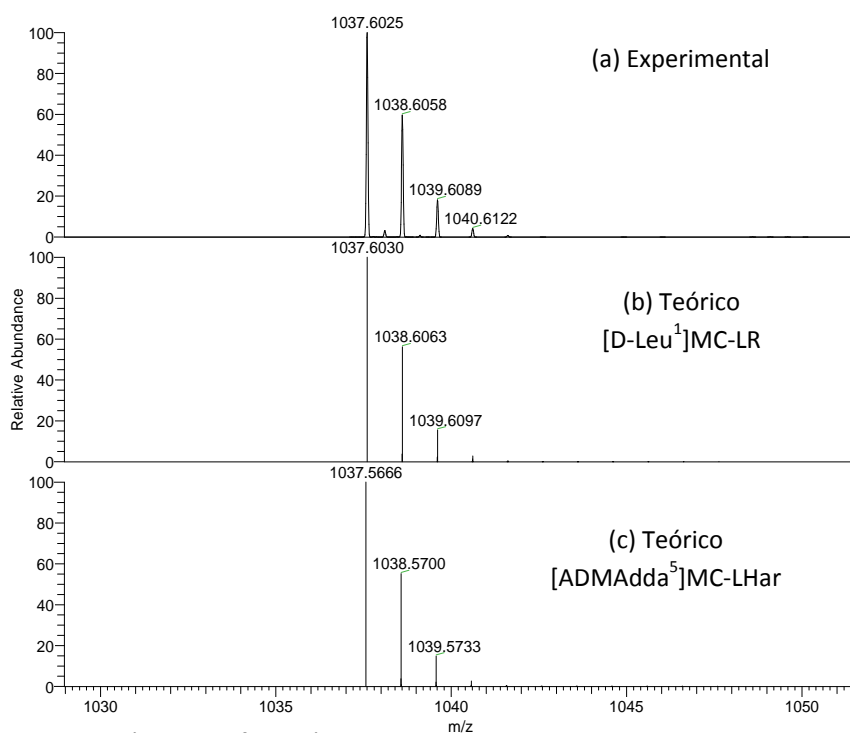
El espectro de los iones producto obtenido por fragmentación HCD (*Figura 4.24*) tiene el perfil de fragmentación característico de la [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR descrito por Park y col. (2001). La asignación de los fragmentos se ha confirmado por HRMS en base a la exactitud en su medida de masa (*Tabla 4.25*), menor a 1,0 ppm para todos los fragmentos, excepto para el menos intenso (*m/z* 728,3993; 2,1 ppm). Se detecta el fragmento típico del aminoácido Adda específico de las MCs ([PhCH<sub>2</sub>CH(OCH<sub>3</sub>)<sup>+</sup>], *m/z* 135,0805) y otros iones producto característicos. Los fragmentos de *m/z* 213,0872 y 169,1337 están descritos en la bibliografía como [Glu-Mdha+H]<sup>+</sup> y [Mdha-Leu-CO+H]<sup>+</sup>, respectivamente. Los iones producto de *m/z* 375,1915, 595,3566 y 728,3993 corresponderían a las siguientes composiciones [C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O-Glu-Mdha+H]<sup>+</sup>, [Mdha-Leu-Leu-MeAsp-Arg+H]<sup>+</sup> y [MeAsp-Arg-Adda-Glu+H]<sup>+</sup>, mostrando una estructura explicada por estas secuencias en la variante detectada. De la presencia de los fragmentos de *m/z* 213,0872 y 375,1915 se dedujo que el séptimo aminoácido de la variante estudiada era el Mdha. La MC observada, [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR (C<sub>52</sub>H<sub>80</sub>N<sub>10</sub>O<sub>12</sub>, [M+H]<sup>+</sup> = *m/z* 1037,6030), es una variante vinculada a la MC-LR (C<sub>49</sub>H<sub>79</sub>N<sub>10</sub>O<sub>12</sub>, [M+H]<sup>+</sup> = *m/z* 995,5560) en que se ha substituido la unidad D-Ala en la posición 1 por Leu, por lo que se diferencia en (-42 uma) y una unidad (-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>) con respecto a la MC-LR.

La producción de [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR fue proporcional al número de células, con una correlación directa lineal (R = 0,94) entre concentración de células y producción de [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR, calculada de acuerdo con una simple ecuación de primer orden (y = a + b). La ordenada en el origen es 1,49 ± 0,90 y la pendiente 8,63 ± 0,80.

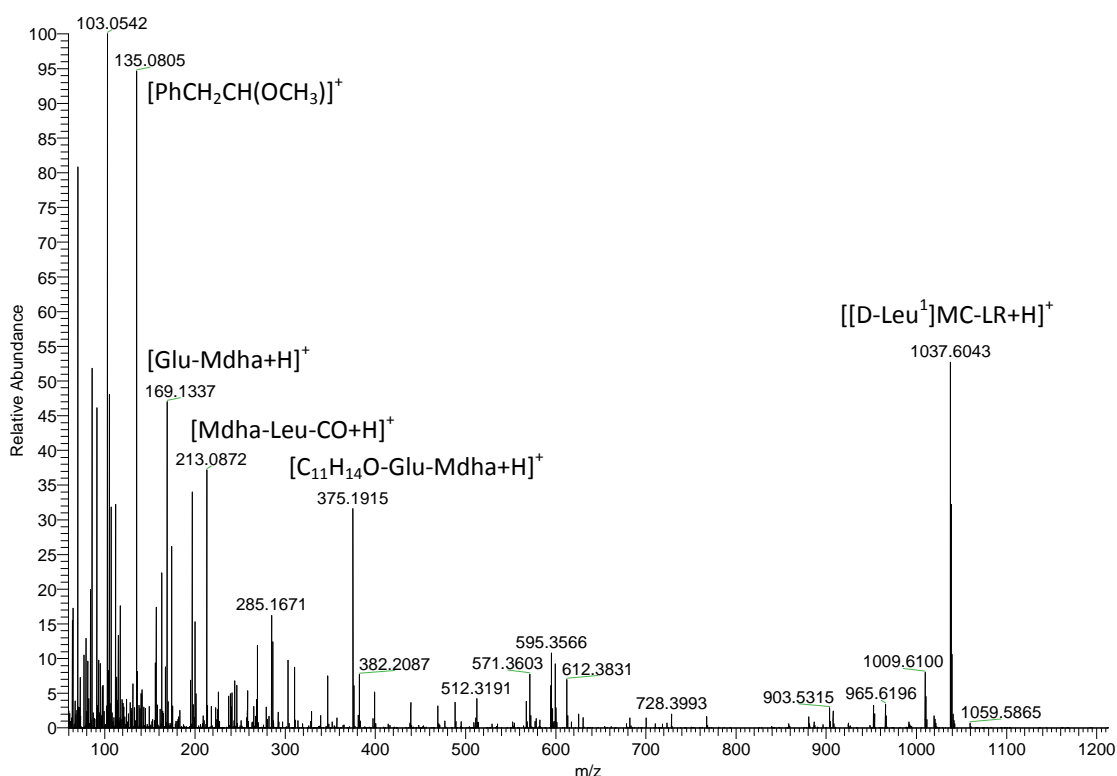




**Figura 4.22.** Cromatograma del análisis LC-HRMS del extracto del cultivo CAAT 2005-3 extrayendo las  $m/z$  de: (a) la  $[D\text{-Leu}^1]MC\text{-LR}$ ; y (b-e) de sus iones fragmento característicos. I.S.: patrón interno.



**Figura 4.23.** Comparación del perfil isotópico experimental obtenido mediante LC-HRMS de la señal de  $m/z$  1037,6025 del extracto del cultivo CAAT 2005-3 (a); con los perfiles isotópicos simulados con el software Xcalibur (teóricos) de la  $[D\text{-Leu}^1]MC\text{-LR}$  (b) y de la  $[ADMAdda^5]MC\text{-LHar}$  (c), variantes con pesos moleculares parecidos, pero diferentes fórmulas empíricas y masas exactas.



**Figura 4.24.** Espectro de masas de fragmentación de la [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR identificada en el cultivo CAAT 2005-3 obtenido por análisis LC-HRMS mediante fragmentación en la celda HCD en modo de adquisición AIF.

**Tabla 4.25.** Composición iónica, *m/z* exacta teórica y medida y exactitud de masa (error en ppm) de las principales señales obtenidas en el espectro de fragmentación ESI-Orbitrap en modo de ionización positivo de la [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR identificada en el cultivo CAAT 2005-3.

Composición	<i>m/z</i> exacta teórica	<i>m/z</i> medida	Error (ppm)
[M+H] <sup>+</sup>	1037,6030	1037,6025	-0,5
[MeAsp-Arg-Adda-Glu+H] <sup>+</sup>	728,3978	728,3993	2,1
[MdhA-Leu-Leu-MeAsp-Arg+H] <sup>+</sup>	595,3562	595,3566	0,6
[C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O-Glu-MdhA+H] <sup>+</sup>	375,1915	375,1915	0,4
[Glu-MdhA+H] <sup>+</sup>	213,0870	213,0872	1,0
[MdhA-Leu -CO+H] <sup>+</sup>	169,1335	169,1337	1,0
<b>[PhCH<sub>2</sub>CH(OCH<sub>3</sub>)]<sup>+</sup> ([C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>O]<sup>+</sup>)</b>	135,0804	135,0805	0,7
Arg cadena lateral ([C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N] <sup>+</sup> )	70,0651	70,0651	-0,4

Se ha marcado en negrita el fragmento utilizado como ion diagnóstico de la presencia de una MC.

Esta variante de MC ha sido anteriormente detectada en muestras de *M. aeruginosa* de Canadá, Brasil y Argentina (Andrinolo y col., 2007; Matthiensen y col., 2000; Park y col., 2001), aunque este estudio es la referencia más austral para *M. aeruginosa* productora de [D-Leu<sup>1</sup>]MC-LR. Fue descrita por primera vez por Park y col. (2001) en una floración observada en el lago Pakowki, Alberta, Canadá y asociada con una mortalidad de pájaros. En Argentina, fue referida la presencia de MC-LR y de una

MC no identificada de  $m/z$  1037,8 ( $[M+H]^+$ ), en una muestra recogida del estuario del Río de La Plata (Andrinolo y col., 2007). Posteriormente, la  $[D\text{-Leu}^1]MC\text{-LR}$  fue identificada como la única toxina producida naturalmente en otro *bloom* de *M. aeruginosa* en el estuario del río de La Plata. También, la  $[D\text{-Leu}^1]MC\text{-LR}$  fue identificada como la MC más abundante producida por una cepa de laboratorio de *Microcystis sp.* aislada de agua salobre del estuario del lago Patos, sud de Brasil, describiendo una toxicidad similar entre esta variante y la MC-LR de acuerdo con el análisis por bioensayo y ensayo de inhibición de la proteína fosfatasa.

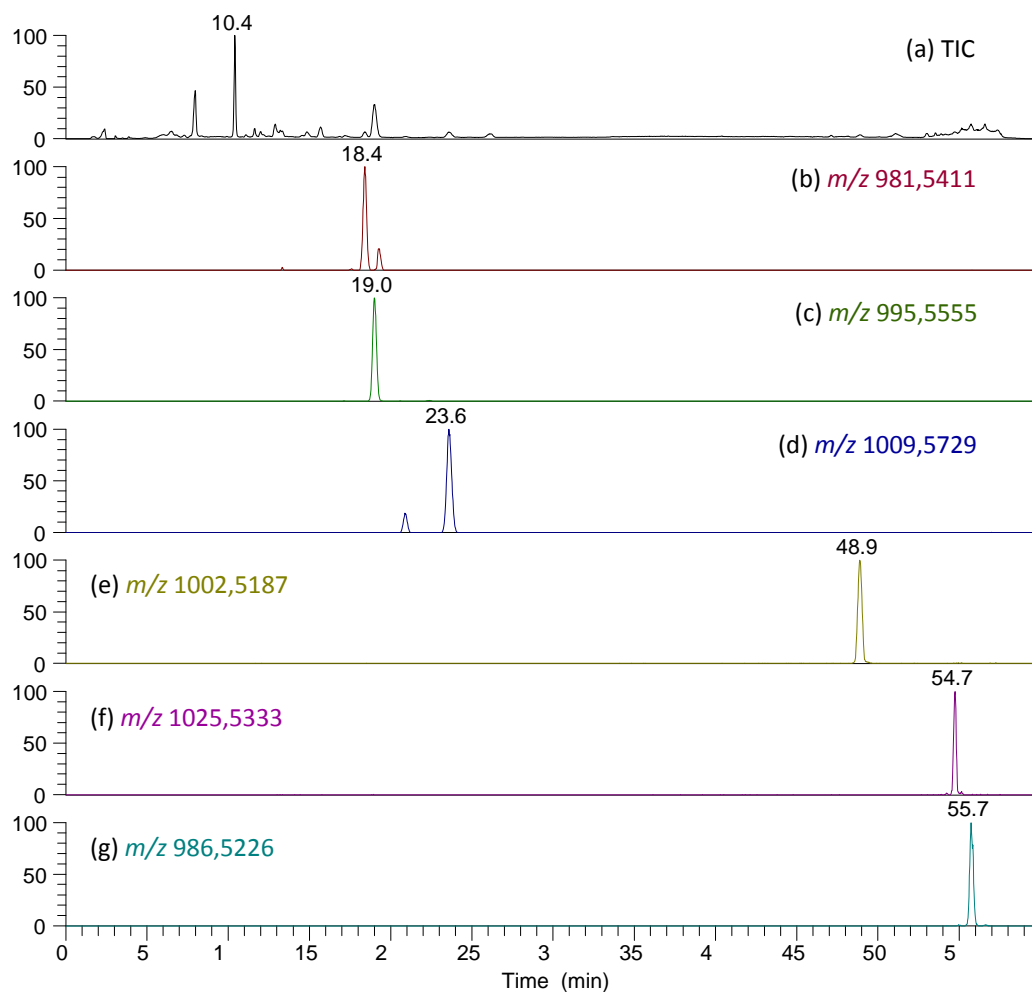
Además de *Microcystis sp.*, otros géneros de cianobacterias son productores de  $[D\text{-Leu}^1]MC\text{-LR}$ : cepa *Phormidium* CENA 270, aislada de una laguna (Paraíba, Brasil); *Nostoc* UK89II, aislada de líquenes; y *Peltigera neopolydactyla*, recogida en Laukaa (Finlandia).

### **PCC 7820**

En el marco de colaboración de la *Red Ibérica de Cianotoxinas* (<http://cianotoxinas.unizar.es/>) se ha procedido a la caracterización de un liofilizado del cultivo PCC 7820, suministrado por el Grupo de la Dra. Cameán de la Universidad de Sevilla, con el objetivo de utilizarlo como material de referencia para la realización de un ejercicio de intercomparación entre diferentes laboratorios integrantes de dicha red. El PCC7820 es un cultivo de *Microcystis aeruginosa* de la colección de cultivos Pasteur (*Pasteur Culture Collection*, Paris, France). Para el crecimiento del cultivo se ha mantenido en medio BG11 (+1M  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  + 5 mM  $NaNO_3$  + 12 mM  $NaHCO_3$ ), a 30 °C, bajo iluminación continua de luz fría blanca mediante tubos fluorescentes y con aire estéril burbujeando a través del medio de cultivo.

En una primera fase se procedió a la extracción y análisis por LC-HRMS del liofilizado según las condiciones descritas en el apartado 2.3 del Capítulo 2 para su caracterización. Como se ha explicado en el mencionado apartado de la presente tesis, la extracción se ha realizado mediante ultrasonidos en metanol acidificado. En la Figura 4.25 se muestra el cromatograma LC-HRMS del extracto del cultivo, en el que se ha incluido el TIC y los cromatogramas de las señales extraídas de las diferentes MCs identificadas.

En la Tabla 4.26 se muestran las MCs identificadas y algunas señales relacionadas. Por el tiempo de retención, espectro de masas y medida de masa exacta de estas señales se han podido identificar unequivocamente las MC-dmLR, -LR, -LW, -LF y -LY. También se ha observado una señal de  $m/z$  1009,5729, que por su masa exacta podría identificarse como  $[Mdhb^7]MC\text{-LR}$  o MC-HiLR, ambas variantes con la misma fórmula empírica. Las otras señales no se han correlacionado con ninguna de las más de 90 variantes de MCs en base a las bases de datos y bibliografía consultadas.



**Figura 4.25.** Cromatograma LC-HRMS del extracto del liofilizado del cultivo PCC7820: (a) TIC; (b) MC-dmLR; (c) MC-LR; (d) [Mdhb<sup>7</sup>]MC-LR o MC-HiLR; (e) MC-LY; (f) MC-LW;  $\gamma$ , (g) MC-LF.

**Tabla 4.26.** MCs y señales relacionadas detectadas en el extracto del liofilizado del cultivo PCC7820.

$t_R$ (min)	$m/z$ medida	$m/z$ exacta teórica	Error (ppm)	Identificación
11,6	453,3438 (905,6791)	-	-	-
13,3	937,4119	-	-	-
15,7	1049,5210	-	-	-
17,3	1013,5685	-	-	-
18,4	981,5411	981,5404	0,7	dmLR
19,0	995,5555	995,5560	0,5	LR
23,6	1009,5729	1009,5717	1,2	MC-HiLR o MC-LHar
48,9	1002,5187	1002,5183	0,4	LY
50,1	1016,5351	-	-	-
54,7	1025,5333	1025,5342	0,9	LW
55,1	1000,5385	-	-	-
55,7	986,5226	986,5233	0,7	LF

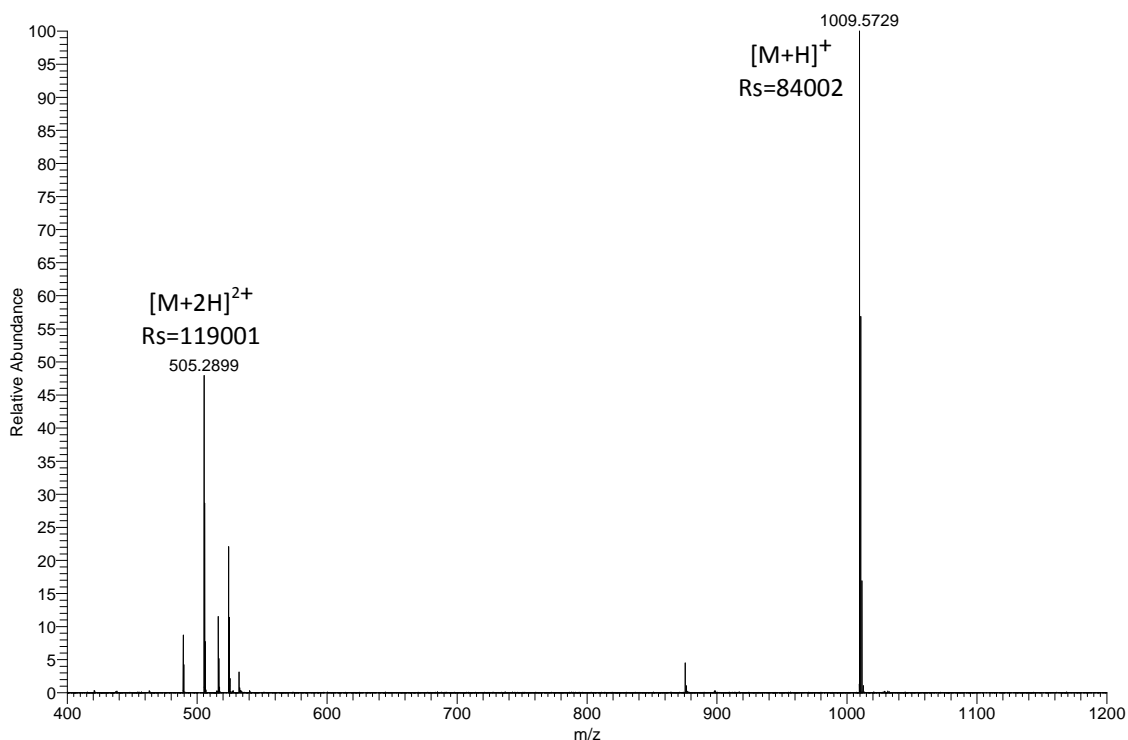
$t_R$ : tiempo de retención.

Entre parentésis se indica la señal minoritaria.

El perfil de MCs que se ha observado ha sido similar pero no idéntico al descrito por otros autores (Akin-Oriola y Lawton, 2005; Bateman y col., 1995; Lawton y col., 1994; Ríos y col., 2014; Robillot y col., 2000). En este sentido, Lawton y col. (1994) han detectado MC-LM ( $m/z$  969,5) que no se ha identificado en nuestro estudio y no observaron la señal de la MC-dmLR. Por otra parte, Bateman y col. (1995) han identificado siete variantes de MC, de entre ellas las predominantes fueron la MC-LR, MC-VF ( $m/z$  972,5) y -AR ( $m/z$  953,5), aunque tampoco detectaron la presencia de la MC-dmLR. Además, Robillot y col., (2000), han descrito la presencia de tres nuevas variantes, la MC-dmLW ( $m/z$  1011,5), -dmLF ( $m/z$  972,5) y -LL ( $m/z$  952,5), que en nuestro análisis no hemos detectado. Más recientemente, Akin-Oriola y Lawton (2005) en su trabajo identificaron y cuantificaron mediante HPLC las mismas MCs que en nuestro estudio (MC-LR, -LY, -LW y -LF) en las células y el medio de crecimiento del cultivo PCC 7820, excepto la MC-dmLR y la señal de  $m/z$  1009,5729. Y, Ríos y col., (2014) han detectado también por LC-MS la [D-Asp<sup>3</sup>]MC-LR y la MC de  $m/z$  1009,5 que ellos identificaron como [D-Glu(OCH<sub>3</sub>)<sup>6</sup>]MC-LR mediante LRMS con un espectrómetro de masas Q-TRAP. La masa exacta de la señal de  $m/z$  1009,5729 por HRMS ha coincidido con la  $m/z$  teórica de la MC-HilR o [Mdhb<sup>7</sup>]MC-LR con una exactitud de 1,2 ppm. El error de 37 ppm para la [D-Glu(OCH<sub>3</sub>)<sup>6</sup>]MC-LR ( $m/z$  teórica de 1009,5353) descarta su identificación. Los diferentes perfiles obtenidos por los autores se deben a los diferentes métodos de extracción, purificación, análisis (HPLC, LC-LRMS, LC-HRMS) y condiciones de cultivo.

A modo de ejemplo, en la *Figura 4.26* se muestran el espectro de masas del análisis LC-HRMS de la MC de  $m/z$  1009,572. Como para esta muestra se ha trabajado sin fragmentación HCD y a una resolución teórica de 100000, la resolución experimental obtenida para la  $m/z$  de las señales monocargadas y dicargadas de las MCs identificadas ha sido superior a 80000 y 100000, respectivamente, como se observa en la *Figura 4.26* y la exactitud en la medida de la masa ha sido  $\leq 1,2$  ppm (ver *Tabla 4.26*).

La MC mayoritaria es la MC-LR, representando el 47% respecto al total de la concentración de MCs. Este tanto por ciento es inferior al descrito por otros autores (Ríos y col., 2014) debido a que en estos trabajos no han informado sobre la presencia de otras señales potencialmente identificadas como MCs que hemos determinado mediante LC-HRMS. Las otras MCs identificadas de forma inequívoca representan el 14% (MC-LF), 7% ([D-Glu(OCH<sub>3</sub>)<sup>6</sup>]MC-LR), 7% (MC-LY), 6% (MC-LW) y 5% (MC-dmLR).



**Figura 4.26.** Espectro de masas de la [Mdhb<sup>7</sup>]MC-LR o MC-HiLR en el cultivo PCC7820 obtenido mediante el análisis LC-HRMS. (Rs: resolución).

En una segunda fase, diferentes alícuotas del liofilizado del cultivo PCC7820 se repartieron a siete laboratorios para su análisis y participación en un ejercicio de intercomparación. Al recabar los resultados obtenidos se detectaron diferencias significativas, por lo que se procedió a un estudio de las diferentes alícuotas en nuestro laboratorio, para eliminar la variabilidad interlaboratorio. En la *Tabla 4.27* se muestran los resultados obtenidos en  $\mu\text{g/g}$  para la cuantificación de la MC-LR en siete alícuotas, repitiéndose el mismo comportamiento y obteniendo resultados muy diferentes. Nos pareció detectar claramente dos tipos de resultados, identificados como muestra 1 y 2. Por lo que todo se atribuyó a un posible problema de homogeneidad entre las alícuotas utilizadas.

**Tabla 4.27.** Concentración en  $\mu\text{g/g}$  de la MC-LR determinada por LC-HRMS en las diferentes alícuotas.

		Muestra 1			Muestra 2		
LR	1,3	0,8	< 2,5	1,1	1550	1650	750

Por último, este cultivo también se ha utilizado, como la muestra natural del *bloom* del embalse de Alcántara (ver *apartado 4.2.3*), para verificar la aplicabilidad de diferentes tipos de bioensayos y contrastar los resultados obtenidos por comparación con el análisis por LC-HRMS como técnica de referencia. Como se ha introducido en el *apartado 4.2.4*, se han aplicado ensayos PPIA, ELISA y ELIPA al análisis de los extractos

de la fracción intracelular de la floración natural estudiada del embalse de Alcántara y del cultivo PCC7820. El contenido de MCs medido como equivalentes de MC-LR en µg/L ha sido comparado con el obtenido mediante el análisis LC-HRMS (ver *Tabla 4.28*). En el cultivo PCC7820, los resultados mediante todos los bioensayos bioquímicos son similares y superiores a las concentraciones de MC-LR determinadas por LC-HRMS, pero parecidos a los contenidos totales de MCs sumando todas las señales identificadas como variantes o MCs potenciales. Lo que indicaría que las otras variantes también están dando respuesta en los bioensayos, aunque a la vez también podría estar apreciando un efecto matriz y respuesta de otros compuestos naturales de la muestra.

**Tabla 4.28.** Contenido en µg/L de equivalentes de MC-LR del extracto del cultivo PCC7820 determinado mediante los métodos enzimáticos, immunoquímicos y LC-HRMS.

Método	PP2A	PP1	PP1-MP	ELISA	ELIPA colorimétrico	ELIPA electroquímico	LC-HRMS <sup>a</sup>
Concentración (µg/L)	34072 ± 562	39310 ±1467	34533 ± 5015	32560 ± 2295	33237 ± 678	33522 ± 1404	37510 (17600)

<sup>a</sup> El primer valor es la suma de todas las MCs observadas.

El valor entre paréntesis es la concentración de MC-LR.

### **NIES CRM Nº26**

Este CRM preparado por el National Institute for Environmental Studies (NIES) ha sido desarrollado para su uso en la calibración y gestión de los instrumentos en el análisis químico de las MCs contenidas en las algas verde-azules, y para el análisis de la composición elemental de las algas. Se ha obtenido de una mezcla de 2 cepas de la cianobacteria *Microcystis aeruginosa*, la cianobacteria principal implicada en la formación de las floraciones de algas azul-verde, aisladas de *blooms* naturales de agua dulce. Las cepas se han cultivado por separado en medio TS-15 (0,2 g NaNO<sub>3</sub>; 0,07 g MgSO<sub>4</sub>; 0,4 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,01 g CaCl<sub>2</sub>; 0,003 g Fe-EDTA; 0,008 g EDTA-Na<sub>2</sub>; 0,005 g Crewat32 en 1 L de agua desionizada) con aeración. Una vez su crecimiento se ha considerado óptimo, las células se han recogido por centrifugación continua y después se han liofilizado. A continuación, las células liofilizadas se han mezclado y se han pasado a través de diferentes tamices de acero inoxidable (malla de 106 y 63-µm). Las células tamizadas se han colocado en botellas (54 mg en cada una). Después del secado al vacío, las botellas se han llenado con un gas inerte (argón), se han encapsulado y sellado en envases de aluminio con desecantes. Las botellas se

mantiene a -20 °C. El material NIES No. 26 producido se ha sometido a estudios de homogeneidad y estabilidad. No se han observado cambios de concentración en los estudios de estabilidad y la homogeneidad ha sido excelente, demostrando que es de hecho un producto adecuado para su uso como un CRM.

El certificado incluye valores de referencia para el total de las MCs (mg/g) y una serie de elementos inorgánicos y orgánicos (C, Ca, Co, Cu, Fe, H, K, Mg, Mn, N, Na, Ni, S, Sr, P, Pb, y Zn) en % o mg/kg, dependiendo del elemento, que se encuentran en la cianobacteria *Microcystis aeruginosa*, (ver *Tablas 4.29-4.31*, del certificado de referencia). Hoy en día se han descrito en cultivos y muestras naturales de todo el mundo más de 90 variantes de MCs diferentes, pero solo se comercializan estándares analíticos de unas diez de estas variantes. Debido a esta dificultad de cuantificar de forma individual las diferentes variantes de MCs por falta de patrones, la concentración total de MC se ha determinado mediante el método del ácido 2-metil-3-metoxi-4-fenilbutírico (MMPB) de acuerdo con el manual para el estudio de sustancias que requieren investigación del Ministerio de Medio Ambiente de Japón (2003). Como se describe en este manual, las MCs se descomponen oxidativamente a MMPB, que es analizado por: (a) LC-MS; o, (b) GC-MS previa esterificación. Los elementos mayoritarios (Ca, Fe, K, Mg, Mn, y Na) se han determinado por espectrometría de emisión de plasma después de una digestión ácida. Todos los métodos analíticos utilizados para la determinación de cada analito están indicados en las *Tabla 4.29*.

**Tabla 4.29.** Ejemplo de los valores certificados para el NIES CRM N°26 (*bloom* acuoso).

MCs	Unidades	Valor certificado	Método analítico
	<b>mg/g</b>	<b>4,5±0,4</b>	<b>a, b</b>
Ca		0,56±0,02	1, 2, 6, 7
Fe		0,086±0,006	2, 5, 6
K	%	0,90±0,05	1, 2, 6, 7
Mg		0,44±0,03	1, 2, 7
Na		0,12±0,02	1, 2, 6
Mn		39±3	2, 3, 4, 6
Sr	mg/Kg	4,5±0,3	2, 3, 5
Zn		13±2	2, 3, 4, 5, 6

Métodos analíticos:

a: LC-MS

b: GC-MS

1: Espectroscopia de absorción atómica (AAS)

2: Espectrometría de emisión atómica acoplada a plasma inductivo (ICP/AES)

3: ICP/MS

4: ICP/MS de alta resolución (HR/ICP/MS)

5: Dilución isotópica ICP/MS (ID/ICP/MS)

6: Análisis instrumental por activación neutrónica (INAA)

7: Fluorescencia de rayos X (XRF)

8: Espectrometría de absorción atómica con horno de grafito (GFAAS)

9: Análisis molibdeno azul por inyección de flujo (*molybdenum blue-FIA*)



**Tabla 4.30.** Ejemplo de los valores de referencia para el NIES CRM N°26 (*bloom* acuoso).

	Unidades	Valor de referencia	Método analítico
S	%	0,82	2, 7
P		0,89	2, 7, 9
Co	mg/Kg	0,75	2, 3, 6
Cu		2,3	2, 3, 5, 6, 7, 8
Ni		2,2	2, 3, 5
Pb		4,3	2, 3, 5

**Tabla 4.31.** Ejemplo del contenido CHN en el NIES CRM N°26 (*bloom* acuoso) por análisis elemental.

Elemento	N	C	H
Contenido (%)	12-13	51-52	7-8

Los valores certificados y los valores de referencia de este CRM se han basado en los resultados analíticos de las siguientes organizaciones participantes: *National Institute for Environmental Studies; Tohoku University Graduate School; Nara Prefectural Institute for Hygiene and Environment; Institute for Environmental Sciences; Tohoku Nuclear Co. Ltd.; Environmental Control Center Co. Ltd.; Environmental Research Center Co. Ltd.; Shimadzu Techno-Research Co. Ltd.; Sumika Chemical Analysis Service, Co. Ltd.; Chikyu Kagaku Kenkyusho Co. Ltd.; Naitoh Environmental Science Co. Ltd.; Japan Chemical Analysis Center; China National Research Center for Environmental Analysis and Measurements; y China Institute of Atomic Energy.* De los valores medidos por las 14 organizaciones, aquellos con las puntuaciones *z scores*  $\geq 2$ , obtenidos mediante el uso de estudios estadísticos robustos, han sido rechazados. Los valores certificados para las MCs, Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, Sr y Zn se han establecido de acuerdo con la guía ISO 35:2006 para materiales de referencia (Principios generales y estadísticos para la certificación). Los valores de referencia para S, P, Co, Cu, Ni y Pb se dan como información adicional. La incertidumbre unida a los valores certificados es la incertidumbre expandida utilizando un factor de cobertura  $k = 2$ , lo que corresponde a un intervalo de confianza del 95%.

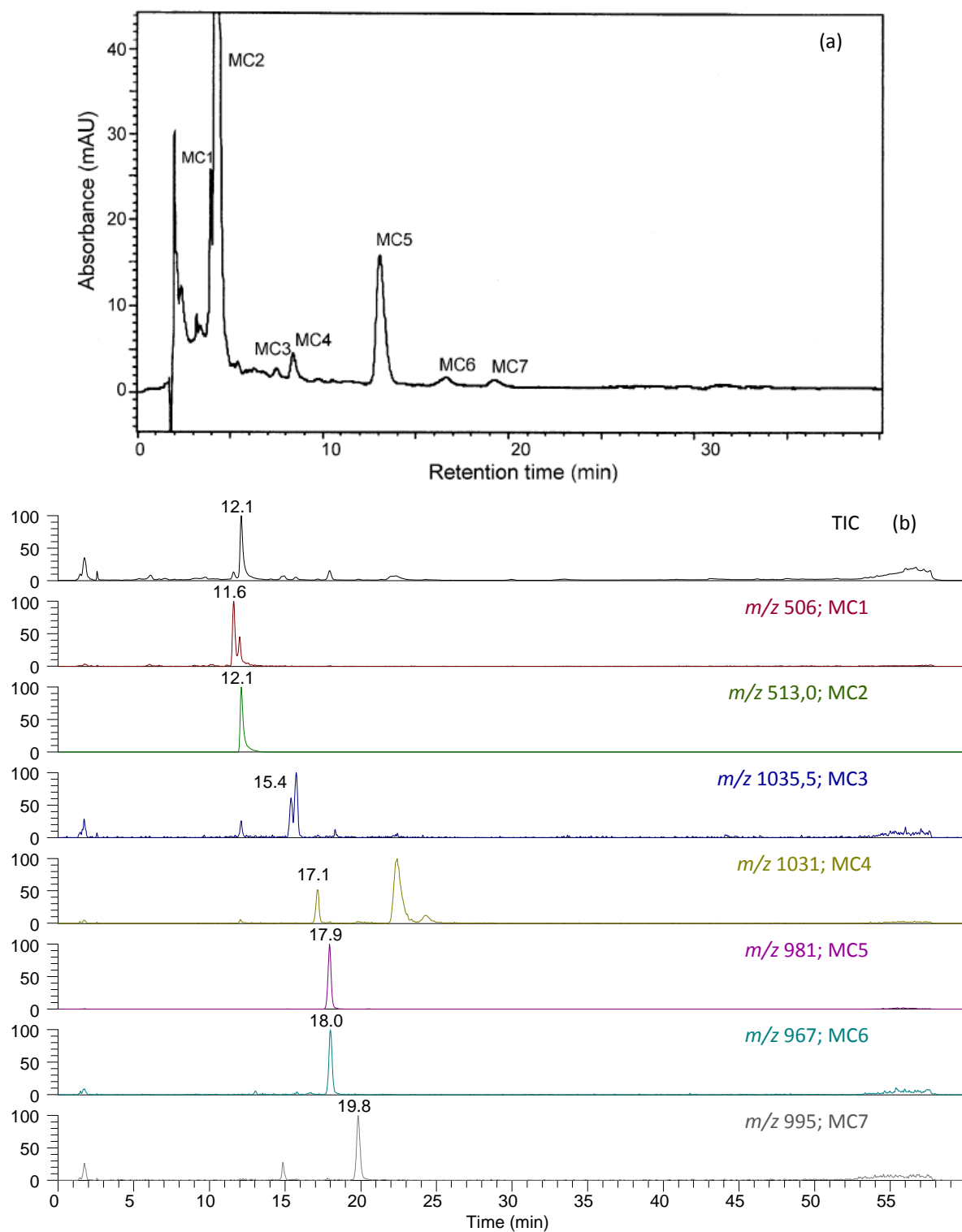
Mediante el análisis por LC-ESI-MS/MS del extracto obtenido por sonicación en metanol acidificado en las condiciones descritas en el *apartado 2.3 del Capítulo 2* se ha confirmado la presencia de las MCs descritas por Sano y col. (2008) e incluidas en el certificado del CRM. En la *Figura 4.27* se muestra el cromatograma resultante de la separación analítica con la columna y el gradiente utilizados (ver *apartado 2.3 y Tabla*

2.3 del *Capítulo 2*) y la comparación con el cromatograma LC-UV de Sano y col. (2008). El análisis LC revela la presencia de al menos siete MCs (MC1-MC7) (ver *Figura 4.27* y *Tabla 4.32*). Por supuesto, los tiempos de retención dependen de la columna, fases móviles, gradiente y flujo utilizado para la separación analítica. El flujo utilizado en ambos casos es el mismo y las columnas son similares, de la misma longitud y diámetro y ambas de C<sub>18</sub>, pero de casas comerciales diferentes. La diferencia más importante radica en el disolvente orgánico utilizado, metanol y acetonitrilo para los análisis LC-UV y LC-MS, respectivamente y el hecho de que en LC-UV se ha trabajado en modo isocrático con una concentración de disolvente orgánico del 55% y en LC-MS con un gradiente lineal que empieza con un 90% de fase acuosa, por lo que los tiempos de retención, especialmente de las MCs más polares se retrasan en el análisis LC-MS. En la *Tabla 4.33* se muestra la comparación de los tiempos de retención de las siete MCs relativos a la MC-LR.

**Tabla 4.32.** MCs identificadas en el NIES CRM No. 26.

	MC	R <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup> [M+2H] <sup>2+</sup>	t <sub>R</sub> (min)
MC1	[D-Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>7</sup> ]MC-RR	Arg (R)	H	H	(1010,5) 505,8	11,6
MC2	[Dha <sup>7</sup> ]MC-RR	Arg (R)	CH <sub>3</sub>	H	(1024,5) 512,8	12,1
MC3	[Dha <sup>7</sup> ]MC-ThTyrR	ThTyr	CH <sub>3</sub>	H	1035,5 (518,3)	15,4
MC4	[Dha <sup>7</sup> ]MC-YR	Tyr (Y)	CH <sub>3</sub>	H	1031,5 (516,3)	17,1
MC5	[Dha <sup>7</sup> ]MC-LR	Leu (L)	CH <sub>3</sub>	H	981,5 (491,3)	17,9
MC6	[D-Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>7</sup> ]MC-LR	Leu (L)	H	H	967,5 (484,3)	18,0
MC7	[Dha <sup>7</sup> ]MC-HiLR	HiL	CH <sub>3</sub>	H	995,6 (498,3)	19,9

R<sub>2</sub>: Arg (R), común a todas las variantes identificadas.  
 t<sub>R</sub>: tiempo de retención.  
 Entre paréntesis se indica la señal minoritaria.



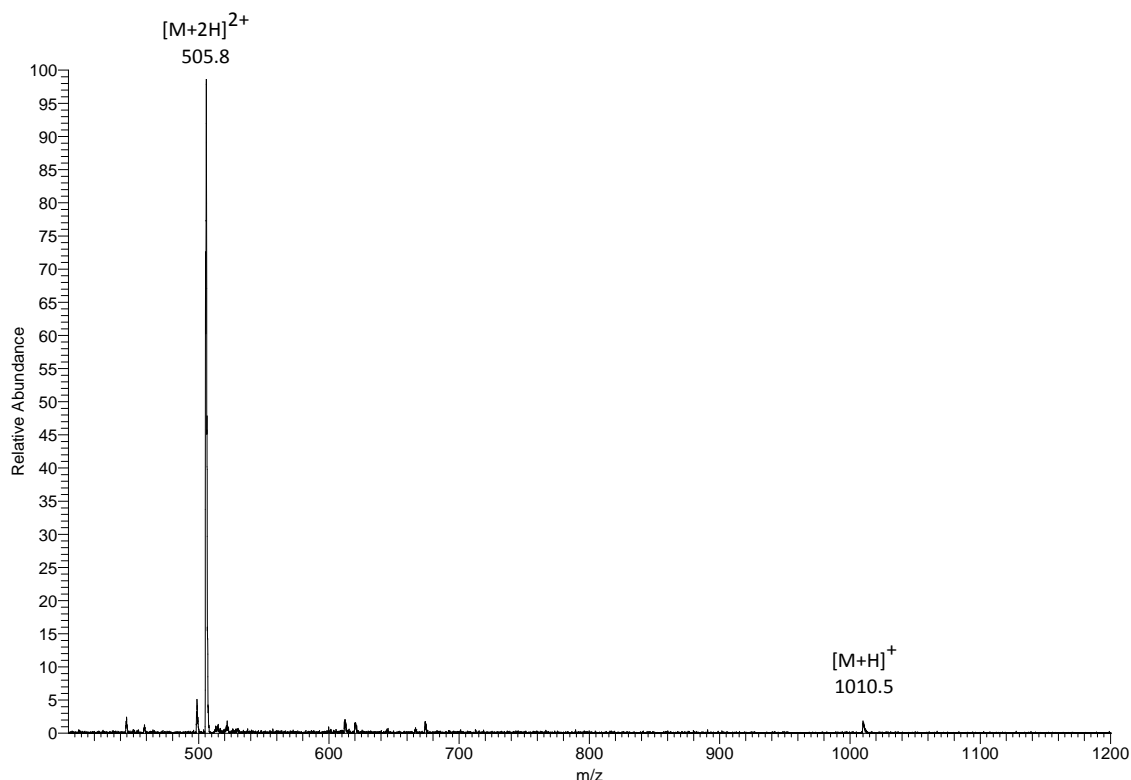
**Figura 4.27.** Cromatogramas de la fracción de MCs extraída del NIES CRM No. 26 mediante: (a) LC-UV (columna Zorbax XDB Eclipse C<sub>18</sub> 150×2,1 mm; fases móviles: 55% MeOH en 0,1% ácido fórmico; a un flujo de 200 µL/min; temperatura de 40 °C; longitud de onda 238 nm); y, (b) LC-MS (Phenomenex Luna C<sub>18</sub>(2) 150×2,0 mm; fases móviles: Gradiente lineal ACN:H<sub>2</sub>O en 0,08% ácido fórmico; a un flujo de 200 µL/min; temperatura ambiente).

**Tabla 4.33.** Tiempos de retención relativos de las MCs en el NIES CRM No. 26 respecto a la MC-LR.

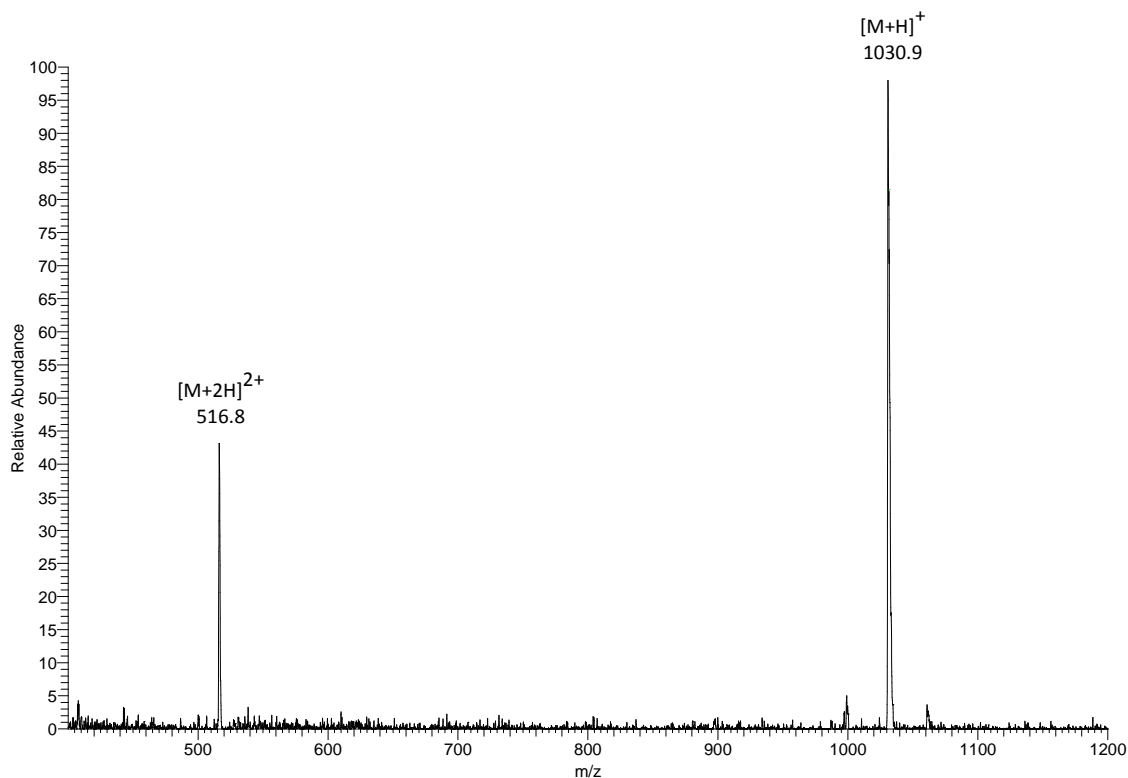
Columna	Análisis	MC1	MC2	MC3	MC4	MC5	MC6	MC7
Zorbax XDB C18	LC-UV	0,23	0,26	0,60	0,70	1,21	1,57	1,88
Luna C18(2)	LC-ESI-MS/MS	0,66	0,69	0,88	0,98	1,02	1,03	1,14

El tiempo de retención relativo se ha calculado como el tiempo de retención particular de cada MC dividido por el tiempo de retención de la MC-LR.

Sano y col. (2008) en su trabajo mediante el análisis MS (FABMS, HRFABMS, MS/MS) y RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , 2D) han confirmado la identificación de cinco de las siete MCs (MC1, 2, 4, 5 y 6) y han identificado por primera vez las MC3 y 7 como  $[\text{Dha}^7]\text{MC-ThTyrR}$  y  $[\text{Dha}^7]\text{MC-HiLR}$ , respectivamente, que no habían sido previamente descritas. Mediante nuestro análisis LC-ESI-MS/MS hemos confirmado esta identificación. En las Figuras 4.28 y 4.29 se muestran los espectros de masas obtenidos mediante el análisis LC-ESI-MS de dos de las MCs detectadas (MC1 y MC4). Las MCs mayoritarias han sido las MC2, 1 y 5. La intensidad de la señal ha seguido el siguiente orden:  $\text{MC2} > \text{MC1} \approx \text{MC5} > \text{MC7} \approx \text{MC4} > \text{MC6} > \text{MC3}$ ; con una intensidad de la MC1 de entre uno y dos ordenes de magnitud destacablemente superior al resto de MCs, como se puede observar claramente en el cromatograma TIC de la Figura 4.27.



**Figura 4.28.** Espectro de masa obtenido por LC-ESI-MS de la  $[\text{D-Asp}^3, \text{Dha}^7]\text{MC-RR}$  (MC1) en el NIES CRM No. 26.



**Figura 4.29.** Espectro de masa obtenido por LC-ESI-MS de la  $[Dha^7]MC-YR$  (MC4) en el NIES CRM No. 26.

Además de las siete MCs descritas por Sano y col., (2008) en la *Tabla 4.34* se muestran otras señales identificadas como potenciales MCs y compuestos relacionados como la Oscillamida Y (ver su espectro de masas en la *Figura 4.30*) y una señal de  $m/z$  862,6. De las señales identificadas como posibles MCs se han observado señales dicargadas ( $m/z$  519,9; 563,9; y, 558,2), monocargadas ( $m/z$  955,4; 1158,9 y 1192,1) y compuestos que presentan ambos tipos de señales mono- y dicargadas (ver *Tabla 4.34*). Por su tiempo de retención, espectro de masas y de acuerdo a las bases de datos consultadas de MCs y a la bibliografía, de estas señales se han podido identificar inequívocamente dos MCs (-KynAba y  $[L-MeLan^7]MC-LR$ ) y en cambio otras seis señales de  $m/z$  563,9; 1158,9; 1043,0; 1192,1; 493,0 y 955,4 no se han podido identificar. Además la identificación de cinco posibles MCs ( $m/z$  519,9; 987,4; 1015,3; 1029,4 y 955,4) no se ha podido confirmar por presentar la misma fórmula empírica y espectros de masas similares. En la *Figura 4.31* se muestra el espectro de masas de la señal de  $m/z$  987,4, a modo de ejemplo. Aunque las posibles MCs identificadas de forma tentativa para la señal de  $m/z$  519,9 no confirmada tienen la misma fórmula empírica y por tanto presentan la misma señal en MS que la MC-RR, este compuesto tiene un tiempo de retención diferente a la MC-RR, se retiene menos en la columna cromatográfica. Como se dispone de estándar comercial de la MC-RR, se ha podido diferenciar por su tiempo de retención.

**Tabla 4.34.** Otras posibles MCs identificadas por LC-ESI-MS en el NIES CRM No. 26.

$t_R$ (min)	$m/z$	Identificación tentativa
6,7	519,9	[(6Z)-Adda <sup>5</sup> ]MC-RR, [Gly <sup>1</sup> ,Asp <sup>3</sup> ,ADMAdda <sup>5</sup> ]MC-RR o [Asp <sup>3</sup> ,Glu(OMe) <sup>6</sup> ]MC-RR
7,2	563,9	-
14,7	987,4 (494,4)	[D-Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>7</sup> ]MC-EE(OMe) o MC-LM
15,0	1001,5 (501,4)	MC-KynAba
15,7	858,3	Oscillamida Y
21,3	862,6	-
22,0	1015,3 (508,5)	MC-NfkA, [D-Asp <sup>3</sup> ]MC-FR, [D-Asp <sup>3</sup> ]MC-RF o [Dha <sup>7</sup> ]MC-FR
22,4	1029,4 (515,5)	MC-FR, MC-RF, MC-NfkAba, MC-M(O)R o [Dha <sup>7</sup> ]MC-HphR
24,3	1158,9	-
24,8	1043,0 (522,4)	-
30,0	1192,1	-
40,8	558,2	[L-MeLan <sup>7</sup> ]MC-LR
56,0	493,0 (985,0)	-
56,4	955,4	[D-Asp <sup>3</sup> ]MC-LL o MC-LV

$t_R$ : tiempo de retención.

-: no identificadas.

Entre paréntesis se indica la señal minoritaria.

Algunas de las MCs determinadas en el NIES CRM No. 26 no están disponibles comercialmente, por lo que este CRM es muy útil no solo como material estándar para la cuantificación del total de MCs sino también para la identificación individual de variantes [Dha<sup>7</sup>] de MCs.

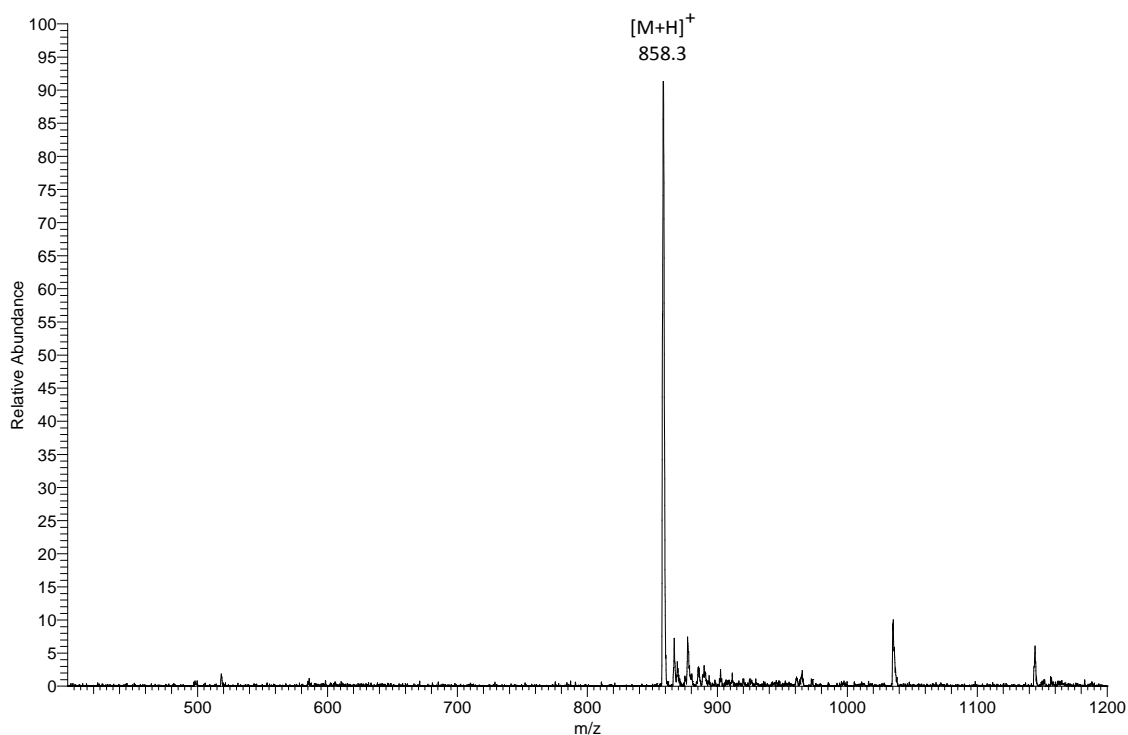


Figura 4.30. Espectro de masa obtenido por LC-ESI-MS de la Oscillamida Y en el NIES CRM No. 26.

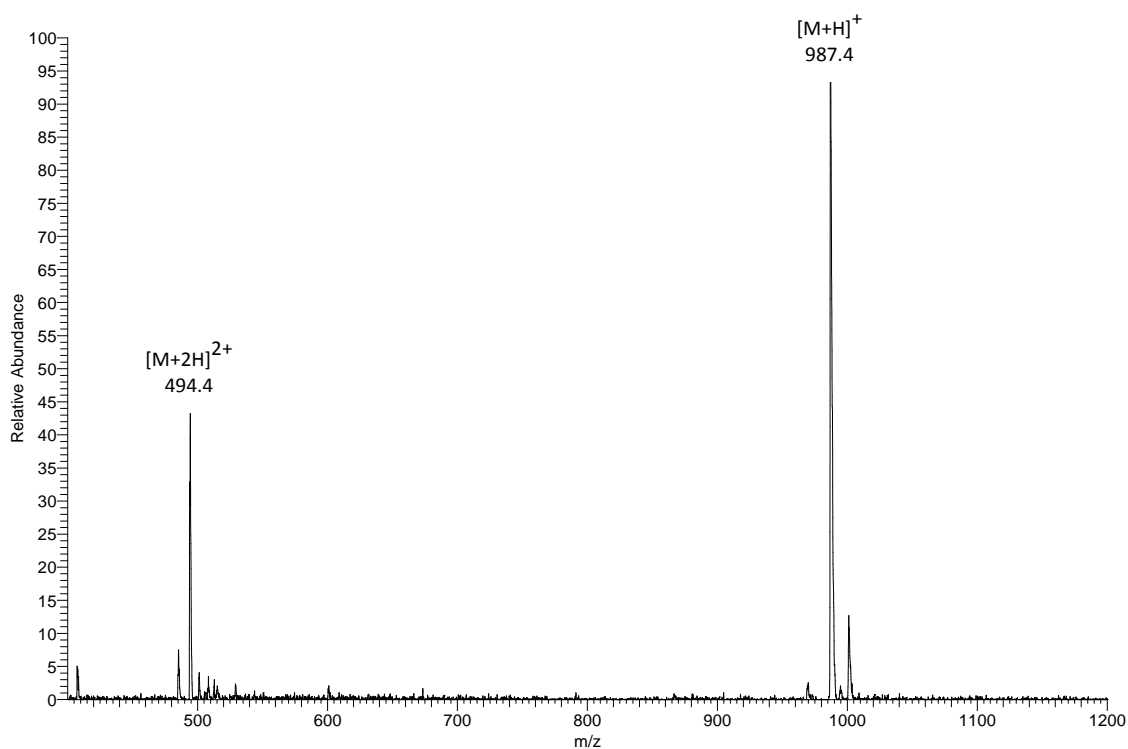


Figura 4.31. Espectro de masa obtenido por LC-ESI-MS de la  $[D-Asp^3, Dha^7]MC-EE(OMe)$  o MC-LM en el NIES CRM No. 26

### 4.3. Conclusiones

- ◆ Se ha demostrado que las metodologías desarrolladas componen una estrategia integrada para la determinación de MCs en muestras naturales (fracción intra- y extracelular). Esta estrategia que combina de forma rápida capacidades de HRMS y AMM con la información proporcionada por los estudios de fragmentación (MS/MS y HCD) mediante SPE en línea a LC/ESI-MS/MS(QqQ), MALDI-TOF/TOF e inyección directa al sistema LC/ESI-HRMS(Orbitrap). Las técnicas MS/MS y HRMS confieren una elevada selectividad y sensibilidad y han permitido confirmar o descartar señales susceptibles de ser identificadas como MCs.
- ◆ La monitorización de los niveles de MCs a la entrada (agua superficial del sistema de embalse Sau-Susqueda-Pasteral) y a la salida de la ETAP durante los 8 años en que se ha efectuado el control, en ausencia de *bloom*, ha permitido observar que el tratamiento realizado (pre- y post-cloración, decantación-coagulación, filtración con arena y carbón activado) ha sido efectivo en la eliminación de las MCs a niveles traza (< 1 µg/L).
- ◆ Se ha controlado el nivel de MCs en la entrada (agua superficial del sistema de embalse Sau-Susqueda-Pasteral) y a la salida de su ETAP con un proceso de tratamiento compuesto por una etapa de, respectivamente. Durante los años en que se ha realizado la monitorización no se ha observado la presencia de proliferación masiva de cianobacterias.
- ◆ Se han analizado un total de 71 muestras de aguas superficiales de 32 embalses diferentes de la geografía española de las vertientes españolas Atlántica y Mediterránea (cuencas hidrográficas de Cataluña interna, Duero, Ebro, Galicia Costa, Guadalquivir, Guadiana, Miño-Sil y Tajo). De acuerdo con otros trabajos de países del Sud de Europa, el 58% de los embalses muestreados han contenido cianobacterias capaces de producir MCs. Las especies más comunes en las muestras estudiadas han sido la *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena planctónica*, *Anabaena crassa* y *Planktothrix rubescens*, que pertenecen a géneros identificados como potencialmente tóxicos en diversas muestras ambientales y que han sido detectados en otros estudios de la península ibérica. Se ha detectado la presencia de alguna MC o compuestos relacionados como las anabaenopeptinas y la oscillamida Y en el 69 % de los embalses.
- ◆ En general, las MC más frecuentes en las muestras analizadas son la MC-RR, -LR, -YR y -dmRR. La MC-RR, -LR y -YR son variantes típicas en la especie *Microcystis aeruginosa* y la MC-dmRR se ha descrito frecuentemente en *blooms* de *Planktothrix rubescens*. De acuerdo con otros autores, se ha observado con elevada frecuencia la presencia de Oscillamida Y y anabaenopeptinas (B, F y G) en un 38% de los embalses en estudio (Alcántara, As Forcadas, Cachamuña, Caldas, Castadón, Foix, El Vicario, La Vega de Jabalón, Rosarito, San Juan, Santa Teresa y Vilasouto).



- ◆ Se han descrito diversas señales, que en base a nuestro conocimiento no han sido descritos hasta el momento en la bibliografía, como potenciales nuevas variantes de MC, otras toxinas y péptidos relacionados utilizando métodos de *screening* en *Full Scan* mediante HRMS y experimentos de fragmentación. Para la identificación estructural inequívoca y la confirmación de estas señales sería útil la aplicación de técnicas complementarias como la RMN, la derivatización, el análisis quiral de aminoácidos, la espectroscopia ultravioleta-visible, o experimentos de intercambio de deuterio.
- ◆ Los intervalos de concentración total de MC extra- e intracelular oscilaron entre 0,030-36,9 de las muestras de los embalses de Castadón y Las Conchas (2011) y 0,020-5222  $\mu\text{g/L}$  de las muestras de Aguilar de Campoo y Alcántara, respectivamente. Para las muestras en que la concentración en la biomasa se ha cuantificado en  $\mu\text{g/g}$ , los niveles de MC total han oscilado entre 75 ng/g hasta 1,8 mg/g de las muestras de los embalses de Las Conchas, Castadón y Cachamuiña. Como la producción de las toxinas por parte de las cianobacterias tiene lugar en el interior de las células, normalmente se ha encontrado una mayor variedad de toxinas y niveles de concentración mayores en la fracción sestónica.
- ◆ En la mayoría de las muestras de agua (71%) no se detectaron MCs. Por su parte, la fracción acuosa normalmente contiene las MCs más hidrofílicas. El 7% de las muestras de agua (Alcántara, Las Conchas 2011 y 2013, Vilasouto 2011 y Cachamuiña) superaron el límite para "MC" (variantes no precisadas) de 1  $\mu\text{g/L}$  del RD 140/2003 que establece los criterios sanitarios de la calidad del agua para consumo humano en la legislación española. En cambio, los niveles intracelulares significativamente más altos han superado el valor legislado en más del 20% de las muestras, destacando la muestra del extenso bloom del embalse de Alcántara con un nivel sestónico que alcanzó concentraciones de mg/L.
- ◆ La presencia de las distintas floraciones y el potencial de las cianobacterias tóxicas en los embalses estudiados indican la necesidad de programas de vigilancia para evitar el riesgo para la salud humana y de los animales. La mayoría de los embalses estudiados están destinados a riego, agua potable y recreo. Además, sería conveniente utilizar *a priori* mecanismos de prevención como la reducción al mínimo de la eutrofización y, como resultado, impedir la proliferación de cianobacterias en los embalses.
- ◆ Se ha demostrado como la caracterización de cultivos de cianobacterias es útil para establecer las bases del desarrollo tecnológico y la producción de estándares analíticos de toxinas y materiales de referencia para la cuantificación e identificación individual de variantes de MCs y su utilización en estudios de validación y ejercicios de intercomparación.





## CONCLUSIONES GENERALES

En la presente tesis se han alcanzado los objetivos propuestos, lo cual ha permitido obtener conclusiones en los diferentes campos tratados: el estudio de la potencialidad de técnicas de MS/MS y HRMS en el análisis de contaminantes orgánicos emergentes, el desarrollo de metodologías analíticas de alto rendimiento para la determinación de PFAAs y MCs en muestras acuosas, la presencia de PFAAs en aguas superficiales y su comportamiento en diferentes tratamientos de potabilización y la monitorización de MCs en aguas superficiales y tratadas y su caracterización en cultivos y materiales de referencia. En cada capítulo se han aportado las conclusiones específicas. A continuación se presentan las conclusiones generales del trabajo global.

- ◆ Se han puesto a punto, optimizado y validado metodologías analíticas de alto rendimiento, sensibles, selectivas y específicas basadas en métodos de SPE en línea a HPLC/ESI-MS/MS, MALDI-TOF/TOF e inyección directa al sistema LC-ESI-HRMS (Orbitrap) para el análisis de PFAAs y MCs en muestras acuosas. En este trabajo, por tanto se han combinado métodos de extracción rápidos con técnicas de espectrometría de masas en tándem y de alta resolución.
- ◆ La espectrometría de masas en tándem y de alta resolución han demostrado ser técnicas con un amplio potencial para la caracterización y cuantificación de compuestos orgánicos emergentes. En cada caso se ha puesto de manifiesto la conveniencia de utilizar una técnica u otra, sus ventajas y desventajas y la complementariedad entre ellas. Por un lado la espectrometría de masas en tándem permite obtener una importante información estructural y es una técnica *pre-target* que proporciona resultados cuantitativos fiables con un amplio intervalo de linealidad, una adecuada precisión, muy alta sensibilidad, especificidad y selectividad. Por otro lado, la HRMS ha sido capaz de identificar compuestos orgánicos *target* y nuevos compuestos *non-target* que están siendo introducidos en el medio ambiente, metabolitos y productos de degradación sin una selección previa permitiendo realizar *untargeted screening*. Por lo tanto, se ha podido utilizar para una búsqueda retrospectiva *post-targeted* y cuantificación simultánea multi-análisis de diferentes familias de nuevos contaminantes orgánicos emergentes *non-target* en las muestras. Se ha demostrado la eficiencia del uso de los analizadores de HRMS con acoplamiento LC en el seguimiento de rutina para la determinación de contaminantes orgánicos emergentes.
- ◆ Dar respuesta a una creciente demanda del control y seguimiento de los contaminantes orgánicos emergentes en el medio ambiente para cumplir la legislación y las recomendaciones a nivel mundial (R.D. 140/2003, R.D.

1341/2007, Directiva marco del agua, Convenio de Estocolmo, etc...), incentiva el desarrollo de métodos de alto rendimiento que ofrezcan una adecuada sensibilidad y productividad para el análisis de un número elevado de muestras. Las técnicas de análisis directo por inyección y MALDI y de SPE en línea son tratamientos simples, rápidos y fáciles de utilizar, que necesitan una mínima cantidad de muestra y, han permitido detectar trazas de los compuestos en estudio y mejorar la fiabilidad y la eficiencia económica de las metodologías, mediante la automatización del proceso (no operador dependiente) y la reducción del tiempo de ejecución y la cantidad de disolventes utilizados. Además han demostrado una elevada robustez y productividad y han logrado el manejo de un elevado número de muestras sin manipulación, reduciendo significativamente el riesgo de contaminación.

◆ En el análisis de PFAAs en muestras de agua superficial, subterráneas y tratadas, prácticamente todas las muestras analizadas han presentado al menos uno de los compuestos en estudio.

◆ Con el paso de los años se ha observado una tendencia a la baja de los niveles de PFOA y PFOS en el agua superficial del río Llobregat, probablemente como resultado de las reducciones de sus emisiones y su producción debido a la vigilancia y a las regulaciones implementadas en 2006 (European Commission, 2006) que limitan la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos (PFOS).

◆ En los pozos, el proceso de *stripping* y cloración no ha tenido ningún efecto en los niveles de PFAAs de las diferentes aguas subterráneas.

◆ La ETAP en estudio ha permitido estudiar simultáneamente una línea de tratamiento convencional y otra de tratamiento avanzado. La filtración con GAC y principalmente la RO han resultado efectivos en el tratamiento de los PFAAs en estudio a muy bajas concentraciones (niveles de ppt). En cambio, los tratamientos convencionales como la pre-oxidación, sedimentación, filtración con arena y ozonización han tenido un impacto irrelevante en la eliminación de los PFAAs investigados. Pero, el filtro GAC ha presentado un comportamiento variable en función de su estado de saturación. La utilización de filtros GAC en aplicaciones destinadas específicamente a PFASs debe ser cuidadosamente diseñada y optimizada para reducir la frecuencia de activado del carbón en la regeneración. El reemplazo o regeneración encarece su utilización y limita en el tiempo su eficiente aplicación. Por lo tanto, el tratamiento avanzado ha minimizado de forma significativa los niveles traza de PFAAs detectados en el agua tratada, especialmente, de PFOS y PFOA. A pesar de ello, los resultados muestran que no se ha obtenido agua tratada completamente libre de PFAAs, y

por lo tanto minimizar sus niveles en las aguas superficiales de entrada a las ETAPs, evitando los vertidos o contribuyendo a la mejora de los tratamientos de aguas residuales es esencial. Sin embargo, los valores máximos encontrados en el agua tratada han sido considerablemente menores que los niveles guía individuales más restrictivos. Por lo tanto, no se espera que supongan un riesgo inmediato para la salud de los consumidores.

◆ Se ha demostrado que la estrategia de análisis mediante SPE en línea al sistema LC-ESI-MS/MS puesta a punto para el control del nivel de MCs a la entrada y salida de la ETAP ha sido efectiva y capaz de dar una respuesta rápida para cumplir la legislación española. El tratamiento realizado en la ETAP ha sido efectivo en la eliminación de las MCs a los niveles detectados.

◆ En el estudio de aguas superficiales de diferentes embalses de la geografía española, el 58% de los embalses muestreados han contenido cianobacterias capaces de producir MCs. Este porcentaje es similar al encontrado en estudios de países del Mediterráneo. Las especies más comunes en las muestras estudiadas son la *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena planctónica*, *Anabaena crassa* y *Planktothrix rubescens*, como en estudios anteriores de embalses de la península ibérica.

◆ Se ha detectado la presencia de alguna MC y de anabaenopeptinas (B, F y G) y oscillamida Y en el 69 y 38% de los embalses en estudio, respectivamente. En general, las MC más frecuentes en las muestras analizadas han sido la MC-RR, -LR, -YR y -dmRR. Destacar la presencia de variantes desmetiladas en las floraciones de *Planktothrix* y *Microcystis*.

◆ La presencia de las distintas floraciones y el potencial de las cianobacterias tóxicas en los embalses estudiados indican la necesidad de programas de vigilancia para evitar el riesgo para la salud humana y de los animales. El 7% de las muestras han superado el límite para MC de 1 µg/L del RD 140/2003 que establece los criterios sanitarios de la calidad del agua para consumo humano en la legislación española. Los niveles intracelulares significativamente más altos han superado el valor legislado en más del 20% de las muestras, incluso llegando a concentraciones de mg/L. Por lo que es crucial hacer el seguimiento de estas toxinas en el agua potable y en las aguas de baño. Además, sería conveniente reducir al mínimo la eutrofización para minimizar la proliferación de cianobacterias en los embalses.

◆ La caracterización de cultivos de cianobacterias ha establecido las bases para el desarrollo tecnológico y la producción de estándares analíticos de toxinas y materiales de referencia para la cuantificación e identificación individual de variantes de MCs y su utilización en estudios de validación y ejercicios de intercomparación.









## REFERENCIAS

- Abe T, Baba H, Soloshonok I, Tanaka K. Novel way of separating polyfluorocarboxylic acids by ion-exclusion chromatography. *J. Chromatogr. A* (2000) 884: 93–103.
- Abe T, Baba H, Itoh E, Tanaka K. Separation of perfluoroalkylsulfonic acids and perfluoroalkylsulfonic acids by ion-exclusion chromatography. *J. Chromatogr. A* (2001) 920: 173–180.
- Abe T, Lawson T, Weyers JDB, Codd GA. Microcystin-LR inhibits photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* primary leaves: implications for current spray irrigation practice. *New Phytol.* (1996) 133: 651–658.
- Aboal M, aPuig M-A. Intracellular and dissolved microcystin in reservoirs of the river Segura basin, Murcia, SE Spain. *Toxicon* (2005) 45: 509–518.
- Ahrens L. Polyfluoroalkyl compounds in the aquatic environment: a review of their occurrence and fate. *J. Environ. Monitor.* (2011) 13 (1): 20–31.
- Ahrens L, Gerwinski G, Theobald N, Ebinghaus R. Sources of polyfluoroalkyl compounds in the North Sea, Baltic Sea and Norwegian Sea: evidence from their spatial distribution in surface water. *Mar Pollut Bull* (2010a) 60: 255–60.
- Ahrens L, Taniyasu S, Yeung LWY, Yamashita N, Lam PKS, Ebinghaus R. Distribution of polyfluoroalkyl compounds in water, suspended particulate matter and sediment from Tokyo Bay, Japan. *Chemosphere* (2010b) 79: 266–272.
- Ahrens L, Vorkamp K, Lepom P, Bersuder P, Theobald N, ebinghaus R, Bossi R, Barber JL, McGovern E. Determination of perfluoroalkyl compounds in water, sediment, and biota. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences.* (2010c) No 48. International Council for the Exploration of the Sea.
- Ahrens L, Yamashita N, Yeung LWY, Taniyasu S, Horii Y, Lam PKS, Ebinghaus R. Partitioning behaviour of per- and polyfluoroalkyl compounds between pore water and sediment in two sediment cores from Tokyo Bay, Japan. *Environ. Sci. Technol.* (2009) 43: 6969–6975.
- Akin-Oriola, Lawton. Detection and quantification of toxins in cultures of *Microcystis aeruginosa* (PCC 7820) by HPLC and protein phosphatase inhibition assay effect of blending various collectors at bulk. *Afr. J. Environ. Sci. Technol.* (2005) 6: 1-10.
- Alsmeyer YW, Childs WV, Flynn RM, Moore GGI, Smeltzer JC. Electrochemical fluorination and its applications. En: Banks RE, Smart BE, Tatlow JC (Eds) .*Organofluorine chemistry: Principles and commercial applications.* Plenum, New York (NY), 1994, 121–144.
- Alvarez-Cohen L, Sedlak DL. Emerging Contaminants in Water. *Environ. Eng. Sci.* (2003) 20 (5): 387–388.
- Alzaga R, Bayona JM. Determination of perfluorocarboxylic acids in aqueous matrices by ion-pair solid-phase microextraction-in-port-derivatization-gas chromatography negative ion chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* (2004) 1042: 155–162.
- Amber F. Roegner, Beatriz Brena, Gualberto González-Sapienza and Birgit Puschner. Microcystins in potable surface waters: toxic effects and removal strategies. *J. Appl. Toxicol.* (2013) 34 (5): 441–457.

- Ame MV, Diaz MD, Wunderlin DA. Occurrence of toxic cyano-bacterial blooms in San Roque Reservoir (Cordoba, Argentina): a field and chemometric study. *Environ. Toxicol.* (2003) 18 (3): 192–201.
- Amorin A, Vasconcelos V. Dynamics of microcystins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* (1999) 37: 1041–1052.
- An J, Carmichael WW. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. *Toxicon* (1994) 32: 1495–1507.
- Anderson DM, Sullivan JJ, Reguera B. Paralytic shellfish poisoning in northwest Spain: the toxicity of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Toxicon* (1989) 27 (6): 665–674.
- Andrinolo D, Pereira P, Giannuzzi L, Aura C, Massera S, Caneo M, et al. Occurrence of *Microcystis aeruginosa* and *Microcystis sp.* in Río de la Plata. *Acta Toxicol. Argent.* (2007) 15: 13–18.
- Appleman TD, Higgins CP, Quiñones O, Vanderford BJ, Kolstad C, Zeigler-Holady JC, Dickenson ERV. Treatment of poly- and perfluoroalkyl substances in U.S. full-scale water treatment systems. *Water Res.* (2014) 51: 246–255.
- Appleman TD, Dickenson ERV, Bellona Ch, Higgins C. Nanofiltration and granular activated carbón treatment of perfluoroalkyl acid. *J. of Hazard. Mat.*(2013) 260: 740–746.
- Aranda-Rodriguez R, Kubwabo C, Benoit Frank M. Extraction of 15 microcystins and nodularin using immunoaffinity columns. *Toxicon* (2003) 42: 587–599.
- Armitage JM, Macleod M, Cousins IT. Comparative assessment of the global fate and transport pathways of long-chain perfluorocarboxylic acids (PFCAs) and perfluorocarboxylates (PFCs) emitted from direct sources. *Environ. Sci. Technol.* (2009) 43: 5830–5836.
- Arvaniti OS, Stasinakis AS. Review on the occurrence, fate and removal of perfluorinated compounds during wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* (2015) 524–525: 81–92.
- ATSDR, 2009. Agency for Toxics Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Perfluoroalkyls. Draft for Public Comment. May 2009. [/http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp200.pdf](http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp200.pdf)
- Azevedo SMFO, Evans WR, Carmichael WW, Namikoshi M. First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J. Appl. Phycol.* (1994) 6: 261–265.
- Babica P, Bláha L, Maršálek B. Exploring the natural role of microcystins—a review of effects on photoautotrophic organisms. *J. Phycol.*(2006) 42: 9–20.
- Barco M. Metodología analítica para la determinación de microcistinas en aguas: MS, HPLC y LC/MS. *Tesis Doctoral* (2006).
- Barco M, Flores C, Rivera J, Caixach J. Determination of microcystin variants and related peptides present in a water bloom of *Planktothrix (Oscillatoria) rubescens* in a Spanish drinking water reservoir by LC/ESI-MS. *Toxicon* (2004) 4: 881–886.
- Barco M, Lawton LA, Rivera J, Caixach J. Optimization of intracellular microcystin extraction for their subsequent analysis by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* (2005) 1074: 23–30.

- Barco M, Planas C, Palacios O, Ventura F, Rivera J, Caixach J. Simultaneous quantitative analysis of anionic, cationic, and nonionic surfactants in water by electrospray ionization mass spectrometry with flow injection analysis. *Anal. Chem.* (2003) 75: 5129–36.
- Barco M, Rivera J, Caixach J. Analysis of cyanobacterial hepatotoxins in water samples by microbore reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* (2002) 959: 103–111.
- Bartell SM, Calafat AM, Lyu C, Kato K, Ryan PB, Steenland K. Rate of decline in serum PFOA concentrations after granular activated carbon filtration at two public water systems in Ohio and West Virginia. *Environ. Health Perspect.* (2010) 118: 222–228.
- Barton CA, Butler LE, Zarzecki CJ, Flaherty J, Kaiser M. Characterizing perfluorooctanoate in ambient air near the fence line of a manufacturing facility: Comparing modeled and monitored values. *J. Air Waste Manag. Assoc.* (2006) 56: 48–55.
- Bateman KP, Thibault P, Douglas DJ, White RL. Mass spectral analyses of microcystins from toxic cyanobacteria using on-line chromatographic and electrophoretic separations. *J. Chromatogr. A* (1995) 712: 253–268.
- Bates HA, Kostriken R, Rapoport H. The occurrence of saxitoxin and other toxins in various dinoflagellates. *Toxicon* (1978) 16 (6): 595–601.
- Beattie KA, Kaya K, Sano T, Codd GA. Three dehydrobutyrine-containing microcystins from *Nostoc*. *Phytochemistry* (1998) 47: 1289–1292.
- Begley TH, Hsu W, Noonan G, Diachenko G. Migration of fluorochemical paper additives from food-contact paper into foods and food simulants. *Food Addit. Contam.* (2008) 25(3): 384–390.
- Belisle J, Hagen DF. A method for the determination of perfluorooctanoic acid in blood and other biological samples. *Anal. Biochem.* (1980) 101: 369–376.
- Bell SG, Codd GA. Cyanobacterial toxins and human health. *Rev. Med. Microbiol.* (1994) 5: 256–264.
- Beltrán E, Ibáñez M, Sancho JV, Hernández F. Determination of six microcystins and nodularin in surface and drinking waters by on-line solid phase extraction-ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* (2012) 1266: 61–68.
- Benskin JP, Bataineh M, Martin JW. Simultaneous characterization of perfluoroalkyl carboxylate, sulfonate, and sulfonamide isomers by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* (2007) 79 (17): 6455–64.
- Benskin JP, De Silva AO, Martin LJ, Arsenault G, McCrindle R, Riddell N, Mabury SA, Martin JW. Disposition of perfluorinated acid isomers in sprague-dawley rats: part 1: single dose. *Environ. Toxicol. Chem.* (2009) 28: 542–554.
- Berg K, Skulberg OM, Skulberg R, Underdal B, Willen T. Observations of toxic blue-green-algae (cyanobacteria) in some Scandinavian lakes. *T. Acta Vet. Scand.* (1986) 27: 440–452.
- Berger U, Langlois I, Oehme M, Kallenborn R. Comparison of three types of mass spectrometers for HPLC/MS analysis of perfluoroalkylated substances and fluorotelomer alcohols. *Eur. J. Mass Spectrom.* (2004) 10:579–588

- Berger U, Glynn A, Holmström KE, Berglund M, Ankarberg EH, Törnkvist A. Fish consumption as a source of human exposure to perfluorinated alkyl substances in Sweden - analysis of edible fish from Lake Vättern and the Baltic Sea. *Chemosphere* (2009) 76: 799–804.
- Berlin R. Haff disease in Sweden, *Acta Med. Scand.* (1948) 129: 560–572.
- BfR, 2006. High levels of perfluorinated organic surfactants in fish are likely to be harmful to human health. [http://www.bfr.bund.de/en/press\\_information/2006/21/high\\_levels\\_of\\_perfluorinated\\_organic\\_surfactants\\_in\\_fish\\_are\\_likely\\_to\\_be\\_harmful\\_to\\_human\\_health-8172.html](http://www.bfr.bund.de/en/press_information/2006/21/high_levels_of_perfluorinated_organic_surfactants_in_fish_are_likely_to_be_harmful_to_human_health-8172.html).
- Bhatarai B, Gramatica P. Prediction of aqueous solubility, vapor pressure and critical micelle concentration for aquatic partitioning of perfluorinated chemicals. *Environ. Sci. Technol.* (2011) 45(19): 8120-8.
- Bishop CT, Anet EFL, Gorham PR. Isolation and identification of the fast-death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. *Can J. Biochem. Physiol.* (1959) 37(3): 453.
- Blay P., Hui J. P. M., Chang J., Melanson J. E.: Screening for multiple classes of marine biotoxins by liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* (2011) 400: 577–585.
- Blom K. Estimating the precision of exact mass measurement on an orthogonal time-of-flight mass spectrometer. *Anal. Chem.* (2001) 73 (3): 715–719.
- Bloom MS, Kannan K, Spliethoff HM, Tao L, Aldous KM, Vena JE. A preliminary study of temporal differences in serum concentrations of perfluoroalkyl acids, among New York anglers, in the absence of known changes in manufacturing practices. *Toxicol. Environ. Chem.* (2009) 91: 1387–1397.
- Boiteux V, Dauchy X, Rosin C, Munoz JF. National screening study on 10 perfluorinated compounds in raw and treated tap water in France. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* (2012) 63: 1–12.
- Boone JS, Guan B, Vigo C, Boone T, Byrne C, Ferrario J. A method for the analysis of perfluorinated compounds in environmental and drinking waters and the determination of their lowest concentration minimal reporting levels. *J Chromatogr A.* (2014) 1345: 68–77.
- Bortoli S, Volmer DA. Account: Characterization and identification of microcystins by mass spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom.* (2014) 20(1): 1–19.
- Bossi R, Strand J, Sortkjær O, Larsen MM. Perfluoroalkyl compounds in Danish wastewater treatment plants and aquatic environments. *Environ Int.* (2008) 34: 443–450.
- Botes DP, Kruger H, Viljoen CC. Isolation and characterization of 4 toxins from the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon* (1982) 20(6): 945–954.
- Botes DP, Tuinman AA, Wessels PL, Viljoen CC, Kruger H, Williams DH, Santikarn S, Smith RJ, Hammond SJ. The structure of cyanoginosin-LA, a cyclic heptapeptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* (1984) 1: 2311–2318.
- Botes DP, Wessels PL, Kruger H, Runnegar MTC, Santikarn S, Smith RJ, Barna JJC, Williams DH. Structural studies of cyanoginosin-LR, cyanoginosin-YR, cyanoginosin-YA and cyanoginosin-YM, peptide toxins from *Microcystis aeruginosa*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* (1985) 1: 2747–2748.

- Botha N, Gehringer MM, Downing TG, van de Venter M, Shephard EG. The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCo2 cells. *Toxicon* (2004) 43: 85–92.
- Bouaïcha N, Maatouk I. Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. *Toxicol. Lett.* (2004) 148: 53–63.
- Boulanger B, Vargo J, Schnoor J, Hornbuckle K. Detection of perfluorooctane surfactants in Great Lakes water. *Environ. Sci. Technol.* (2004) 38: 4064–4070 Bourne DG, Jones GJ, Blakeley RL, Jones A, Negri AP, Riddles P. Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. *Appl. Environ. Microb.* (1996) 62: 4086–4094.
- Bradt S, Villena MJ. Detection of microcystins in the coastal lagoon La Albufera de Valencia, Spain by an enzyme-linked immunosorbent assay (E.L.I.S.A.). *Limnetica* (2002) 20(2): 187–196.
- Briand JF, Leboulanger C, Humbert JF, Bernard C, Dufour P. *Cylindropsema raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: Selection, wide physiological tolerance or global warming? *J. Phycol.* (2004) 40: 231–238.
- Brittain S, Mohamed ZA, Wang J, Lehmann VKB, Carmichael WW, Rinehart KL. Isolation and characterization of microcystins from River Nile strain of *Oscillatoria tenuis* Agardh ex Gomont. *Toxicon* (2000) 38(12): 1759–1771.
- Brooke D, Footit A, Nwaogu TA. Environmental risk evaluation report: perfluorooctanesulphonate. Environment Agency, UK, 2004.
- Buck RC, Franklin J, Berger U, Conder JM, Cousins IT, de Voogt P, Jensen AA, Kannan K, Mabury SA, van Leeuwen SPJ. Perfluoroalkyl and Polyfluoroalkyl Substances in the Environment: Terminology, Classification, and Origins. *Integr. Environ. Assess. Manag.* (2011) 7(4): 513–541.
- Busetti F, Backe WJ, Bendixen N, Maier U, Place B, Field W, Giger JA. Trace analysis of environmental matrices by large-volume injection and liquid chromatography–mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* (2012) 402: 175–186.
- Campas M, Marty JL. Highly sensitive amperometric immunosensors for microcystin detection in algae. *Biosens. Bioelectron.* (2007a) 22: 1034–1040.
- Campas M, Olteanu MG, Marty JL. Enzymatic recycling for signal amplification: improving microcystin detection with biosensors. *Sens. Actuators B* (2008) 129: 263–267.
- Campas M, Szydłowska D, Trojanowicz M, Marty JL. Enzyme inhibition-based biosensor for the electrochemical detection of microcystins in natural blooms of cyanobacteria. *Talanta* (2007b) 72: 179–186.
- Campbell DL, Lawtin LA, Beattie KA, Codd GA. Comparative assessment of the specificity of the brine shrimp and Microtox assays to hepatotoxic (microcystin-LR-containing) cyanobacteria. *Environ Toxicol. Water Qual.* (1994) 9: 71–77.
- Campo J, Pérez F, Masiá A, Picó Y, Farré M, Barceló D. Perfluoroalkyl substance contamination of the Llobregat River ecosystem (Mediterranean area, NE Spain). *Sci. Total Environ.* (2015) 503–504: 48–57.

- Cao D, Wang ZD, Han C, Cui L, Hu M, Wu J, Liu Y, Cai Y, Wang H, Kang Y. Quantitative detection of trace perfluorinated compounds in environmental water samples by matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry with 1,8-bis(tetramethylguanidino)-naphthalene as matrix. *Talanta* (2011) 85: 345–352.
- Carrasco D, Moreno E, Paniagua T, De Hoyos C, Wormer L, Sanchis D, Cirés S, Martín-del-Pozo D, Codd GA, Quesada A. Anatoxin-a occurrence and potential cyanobacterial anatoxin-a producers in Spanish reservoirs. *J. Phycol.* (2007), 43(6): 1120–1125.
- Carrasco D, Moreno E, Sanchos E, Wörmer L, Paniagua T, Del Cueto A, Quesada A. Cyanobacterial abundance and microcystin occurrence in Mediterranean water reservoirs in Central Spain: microcystins in the Madrid area. *Eur. J. of Phycol.* (2006) 41: 281–291.
- Carmichael WW. Blue-green algae: an overlooked health threat. *Health Environ.* (1991) 5: 1–4.
- Clara M, Gans O, Weiss S, Sanz-Escribano D, Scharf S, Scheffknecht. Perfluorinated alkylated substances in the aquatic environment: An Austrian case study. *Water Res.* (2009) 43: 4760–4768.
- Castiglioni S, Valsecchi S, Polesello S, Rusconi M, Melis M, Palmiotto M, Manenti A, Davoli E, Zuccato E. Sources and fate of perfluorinated compounds in the aqueous environment and in drinking water of a highly urbanized and industrialized area in Italy. *J Hazard Mater.* (2015) 282: 51–60.
- Cirés S, Quesada A. Catálogo de cianobacterias planctónicas potencialmente tóxicas de las aguas continentales españolas. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Secretaría General Técnica, Centro de Publicaciones, 2011.
- Cirés S, Wörmer L, Ballot A, Agha R, Wiedner C, Velázquez D, Casero MC, Quesada A. Phylogeography of Cylindrospermopsin and Paralytic Shellfish Toxin-Producing Nostocales Cyanobacteria from Mediterranean Europe (Spain). *Appl. Environ. Microbiol.* (2014) 80(4): 1359–1370.
- Codd GA, Bell SG, Kaya K, Ward CJ, Beattie KA, Metcalf JS. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. *Eur. J. Phycol.* (1999) 34: 405–415.
- Codd GA. Cyanobacterial toxins: Occurrence, properties and biological significance. *Water Sci. Technol.* (1995) 32: 149–156.
- Codd GA, Bell SG, Brooks WP. Cyanobacterial toxins in water. *Water Sci. Technol.* (1989) 21: 1–13.
- Codd GA, Carmichael WW. Toxicity of a clonal isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* from Great Britain. *FEMS Microbiol. Lett.* (1982) 13: 409–411.
- Codd GA, Metcalf JS, Beattie K. Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon* (1999b) 37: 1181–1185.
- Comerton AM, Andrews RC, Bagely DM. The influence of natural organic matter and cations on the rejection of endocrine disrupting and pharmaceutically active compounds by nanofiltration. *Water Res.* (2009) 43(3): 613–622.
- Cook CM, Vardaka E, Lanaras T. Toxic cyanobacteria in Greek freshwaters, 1987–2000. Occurrence, toxicity, and impacts in the Mediterranean region. *Acta Hydroch. Hydrob.* (2004) 32: 107–124.

- Chang YC, Chen, WL, Bai FY, Chen PC, Wang GS, Chen CY. Determination of perfluorinated chemicals in food and drinking water using high-flow solid-phase extraction and ultrahigh-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* (2012) 402: 1315–1325.
- Chen DZX, Boland MP, Smillie MA, Klix H, Ptak C, Andersen RJ, Holmes CFB. Identification of protein phosphatase inhibitors of the microcystin class in the marine environment. *Toxicon* (1993) 31: 1407–1414.
- Chen J, Yan T, Xu J, He S, Zhao P, Yan X. Simultaneous determination of toxins in algae and water samples by high-performance liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* (2012) 35: 1094–1101.
- Chen W, Song L, Peng L, Wan N, Zhang X, Gan N. Reduction in microcystin concentrations in large and shallow lakes: water and sediment-interface contributions. *Water Res.* (2008) 42: 763–773.
- Chianella I, Piletsky SA, Tothill IE, Chen B, Turner APF. MIP-based solid phase extraction cartridges combined with MIP-based sensors for the detection of microcystin-LR. *Biosens. Bioelectron.* (2003) 18: 119–127.
- Chorus I. Current approaches to Cyanotoxin Risk assesment, risk management and regulations in different countries. Federal Environment Agency (Umweltbundesamt). Section II Drinking Water and Swimming Pool Water Hygiene, 2012.
- Chorus I, Bartram J, (Eds). Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon, London, UK, 1999.
- Christiansen G, Yoshida WY, Blom JF, Potmann C, Gademann K, Hemscheidt T, Kurmayer R. Isolation and structure determination of two microcystins and sequence comparison of the MCYABC adenylation domains in *Planktothrix* species. *J. Nat. Prod.* (2008) 71(11): 1881–1886.
- Cohen P. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* (1989) 58: 453–508.
- Cohen SA. Analytical techniques for the detection of  $\alpha$ -amino- $\beta$ -methylaminopropionic acid. *Analyst* (2012) 137: 1991–2005.
- Corbel S, Mougin C, Bouaïcha N. Cyanobacterial toxins: Modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. *Chemosphere* (2014) 96: 1–15.
- Cortés-Francisco N, Flores C, Moyano E, Caixach J. Accurate mass measurements and ultrahigh-resolution: evaluation of different mass spectrometers for daily routine analysis of small molecules in negative electrospray ionization mode. *Anal. Bioanal. Chem.* (2011) 400: 3595–3606.
- COT, 2006. COT statement on the tolerable daily intake for perfluorooctane sulfonate. <http://cot.food.gov.uk/pdfs/cotstatementpfos200609.pdf>
- COT, 2009. Committees on toxicity, mutagenicity, carcinogenicity of chemicals in food, consumer products and the environment. <http://cot.food.gov.uk/pdfs/cotcomcocreport2009.pdf>



- Craig M, McCready TL, Luu HA, Smillie MA, Dubord P, Holmes CFB. Identification and characterization of hydrophobic microcystins in Canadian freshwater cyanobacteria. *Toxicon* (1993) 31: 1541–1549.
- Cremer J, Henning K. Application of reversed-phase medium-pressure liquid chromatography to the isolation, separation and amino acid analysis of two closely related peptide toxins of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *J. Chromatogr.* (1991) 587: 71–80.
- Croes K, Colles A, Koppen G, Govarts E, Bruckers L, van de Mierop E, Nelen V, Covaci A, Dirtu AC, Thomsen C, Haug LS, Becher G, Mampaey M, Schoeters G, van Larebeke N, Baeyens W. Persistent organic pollutants (POPs) in human milk: A biomonitoring study in rural areas of Flanders (Belgium). *Chemosphere* (2012) 89: 988–994.
- Dahlmann J, Budakowski WR, Luckas B. Liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry based method for the simultaneous determination of algal and cyanobacterial toxins in phytoplankton from marine waters and lakes followed by tentative structural elucidation of microcystins. *J. Chromatogr. A* (2003) 994: 45–57.
- Dawson RM. The toxicology of microcystins. *Toxicon* (1998) 36: 953–62.
- Decisión 2002/657/CE por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de resultados. Diario Oficial de la Unión Europea, 2002; L221/8.
- Decisión 2015/495/CE por la que se establece una lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión en el ámbito de la política de aguas, de conformidad con la Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea, 2015; L78/40.
- Decisión 2015/633/CE relativa a la presentación, en nombre de la Unión Europea, de una propuesta de inclusión de nuevos productos químicos en el anexo A del Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes. Diario Oficial de la Unión Europea, 2015; L104/14.
- De Hoyos C, Negro A. I. and Aldasoro J. J. Cyanobacteria distribution and abundance in the Spanish water reservoirs during thermal stratification. *Limnetica* (2004) 23(1–2): 119–132.
- De la Cruz AA, Antoniou M., Pelaez M, Hiskia A, Song W, O’Shea KE, He X, Dionysiou DD. Can we effectively degrade microcystins? – implications for impact on human health status. *Anti-Cancer Agents Med. Chem* (2011) 11(1): 19–37.
- De la Cruz AA, Meyer MT, Echols K, Furey A, Hungerford JM, Lawton L, Mandeville R, Meriluoto JAO, Rublee P, Sivonen K, Stelma G, Wilhelm SW, Zimba PV. Chapter 20: Analytical methods workgroup report. Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs Advances in Experimental Medicine and Biology. (2008) 619: 469–481.
- Delaney JM, Wilkins RM. Toxicity of microcystin-LR, isolated from *Microcystis aeruginosa*, against various insect species. *Toxicon* (1995) 33: 771–778.
- Del Campo FF, Ouahid Y. Identification of microcystins from three collection strains of *Microcystis aeruginosa*. *Environ. Pollut.* (2010) 158(9): 2906–2914.

- Deleuze C, De Pauw E, Quinton L. Selective reduction of C=C double bonds in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of microcystins. *Eur. J. Mass Spectrom.* (2010) 16(9): 91–99.
- Dell'Aversano C, Eaglesham GK, Quilliam MA. Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* (2004) 1028: 155–164.
- D'Eon JC, Crozier PW; Furdui VI; Reiner EJ, Libelo EL, Mabury SA. Perfluorinated phosphonic acids in canadian surface waters and wastewater treatment plant effluent: discovery of a new class of perfluorinated acids. *Environ. Toxicol. Chem.* (2009) 28(10): 2101–2107.
- D'Eon JC, Mabury SA. Exploring indirect sources of human exposure to perfluoroalkyl carboxylates (PFCAs): evaluating uptake, elimination, and biotransformation of polyfluoroalkylphosphate esters (PAPs) in the rat. *Environ. Health Perspect.* (2011) 119: 344–350.
- De Maagd PG-J, Hendriks AJ, Seinen W, Sijm DTHM. pH-Dependent hydrophobicity of the cyanobacteria toxin microcystin-LR. *Water Res.* (1998) 33: 677–680.
- De Silva O, Benskin JP, Martin LJ, Arsenault G, McCrindle R, Riddell N, Mabury SA, Martin JW. Disposition of perfluorinated acid isomers in sprague-dawley rats: part 2: subchronic dose. *Environ. Toxicol. Chem.* (2009) 28: 555–567.
- De Silva AO, Mabury SA. Isolating isomers of perfluorocarboxylates in polar bears (*Ursus maritimus*) from two geographical locations. *Environ. Sci. Technol.* (2004) 38: 6538–6545.
- De Silva AO, Mabury SA. Isomer distribution of perfluorocarboxylates in human blood: potential correlation to source. *Environ. Sci. Technol.* (2006) 40: 2903–2909.
- De Voogt P, Sáez M. Analytical chemistry of perfluoroalkylated substances. *Trends Anal. Chem.* (2006) 25: 326–342.
- Diehnelt CW, Dugan NR, Peterman SM, Budde WL. Identification of micro-cystin toxins from a strain of *Microcystis aeruginosa* by liquid chromatography introduction into a hybrid linear ion trap-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer. *Anal. Chem.* (2006) 78: 501–512.
- Diehnelt CW, Peterman SM, Budde WL. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry and accurate m/z measurements of cyclic peptide cyanobacteria toxins. *Trends Anal. Chem.* (2005) 24: 622–634.
- Dinglasan M J, Ye Y, Edwards EA, Mabury SA. Fluorotelomer alcohol biodegradation yields poly- and perfluorinated acids. *Environ. Sci. Technol.* (2004) 38: 2857–2864.
- Dimitrakopoulos IK, Kaloudis TS, Hiskia AE, Thomaidis NS, Koupparis MA. Development of a fast and selective method for the sensitive determination of anatoxin-a in lake waters using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and phenylalanine-d(5) as internal standard. *Anal. Bioanal. Chem.* (2010) 397: 2245–2252.
- Ding H, Peng H, Yang M, Hu J. Simultaneous determination of mono- and disubstituted polyfluoroalkyl phosphates in drinking water by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* (2012) 1227: 245–252.
- Directiva 76/160/CEE relativa a la calidad de las aguas de baño. DOCE 31/L, de 05-02-1976.

- Directiva 91/271/CEE relativa al tratamiento de las aguas residuales urbanas. Diario Oficial de la Unión Europea **1991**, L135/40.
- Directiva. 2006/122/ECOF que modifica la Directiva 76/769/CEE relativa a la aproximación de las disposiciones administrativas de los Estados miembros que limitan la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos (sulfonatos de perfluorooctano). Diario Oficial de la Unión Europea **2006**, L 372/32.
- Directiva 2013/39/EU por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas. Diario Oficial de la Unión Europea **2013**; L226/1.
- Dolman AM, Rücker J, Pick FR, Fastner J, Rohrlack T, Mischke U, Wiedner C. Cyanobacteria and cyanotoxins: The influence of nitrogen versus phosphorus. *PLoS ONE* (**2012**) 7(6): e38757.
- Dongré AR, Jonesn JL, Somogyi A, Wysocki VH. Influence of peptide com-position, gas-phase basicity, and chemical modification on fragmentation efficiency: evidence for the mobile proton model. *J. Am. Chem. Soc.* (**1996**) 118: 8365–8374.
- Dörr FA, Oliveira-Silva D, Lopes NP, Iglesias J, Volmer DA, Pinto E. Dissociation of deprotonated microcystin variants by collision-induced dissociation following electrospray ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (**2011**) 25: 1981–1992.
- Drogui P, Daghrrir R, Simard MC, Sauvageau C, Blais JF. Removal of microcystin-LR from spiked water using either activated carbon or anthracite as filter material. *Environ. Technol.* (**2012**) 33(4–6): 381–391.
- Dufkova V, Cabala R, Moradova D, Sticha M A fast derivatization procedure for gas chromatographic analysis of perfluorinated organic acids. *J. Chromatogr. A* (**2009**) 1216: 8659–8664
- Du Pont de Nemours El and Company. DuPont global strategy, comprehensive source reduction. Presentation to USEPA (**2005**) USEPA Administrative record AR226-1914.
- DWI (Drinking Water Inspectorate), **2007**. Guidance on the water supply (water quality) regulations 2000–2001 specific to PFOS (perfluorooctane sulphonate) and PFOA (perfluorooctanoic acid) concentrations in drinking water. London: The Stationery Office; <http://dwi.defra.gov.uk/stakeholders/guidance-and-codes-ofpractice/PFOS%20&%20PFOA%20in%20drinking%20water.pdf>
- Echlin P. The blue-green algae. *Sci. Am.* (**1966**) 214: 75–81.
- Edwards C, Graham D, Fowler N, Lawton LA. Biodegradation of microcystins and nodularin in freshwaters. *Chemosphere* (**2008**) 73: 1315–1321.
- Edwards C, Lawton LA, Beattie KA, Codd GA, Pleasnace S, Dear GJ. Analysis of microcystins from cyanobacteria by liquid chromatography with mass spectrometry using atmospheric-pressure ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (**1993**) 7: 714–721.
- Edwards C, Lawton LA, Coyle SM, Ross P. Laboratory-scale purification of microcystins using flash chromatography and reversed high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* (**1996**) 734: 163–173.
- EFSA. Perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts, scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *EFSA J* (**2008**) 653: 1–131.

- EHP. (Focus) Perfluoroalkyl acids. What is the evidence telling us? *Environ. Health Perspect.* (2007) 115: A250–A256.
- Elleman TC, Falconer IR, Jackson ARB, Runnegar MT. Isolation, characterization, and pathology of the toxin from a *Microcystis aeruginosa* (= *Anacystis cyanea*) bloom, Aust. *J. Biol. Sci.* (1978) 31: 209–218.
- Ellis DA, Mabury SA, Martin JW, Muir DCG. Thermolysis of fluoropolymers as a potential source of halogenated organic acids in the environment. *Nature* (2001) 412: 321–324.
- Ellis DA, Martin JW, Mabury SA, De Silva AO, Hurley MD, Sulbaek MD Anderson, Wallington TJ. Degradation of fluorotelomer alcohols: a likely atmospheric source of perfluorinated carboxylic acids. *Environ. Sci. Technol.* (2004) 38: 3316–3321.
- Ellis DA, Martin JW, Mabury SA, Hurley MD, Andersen MPS, Wallington TJ. Atmospheric Lifetime of Fluorotelomer Alcohols. *Environ. Sci. Technol.* (2003) 37: 3816–3820.
- Emmett EA, Shofer FS, Zhang H, Freeman D, Desai C, Shaw LM. Community exposure to perfluorooctanoate: Relationships between serum concentrations and exposure sources. *J. Occ. Environ. Med.* (2006) 48: 759–770.
- Erhard M, von Döhren H, Jungblut P. Rapid identification of the new anabaenopeptin G from *Planktothrix agardhii* HUB 011 using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* (1999) 13: 337–343.
- Erhard M, von Döhren H, Jungblut P. Rapid typing and elucidation of new secondary metabolites of intact cyanobacteria using MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* (1997) 15: 906–909.
- Ericson I, Domingo JL, Nadal M, Bigas E, Llebaria X, van Bavel B, et al. Levels of perfluorinated chemicals in municipal drinking water from Catalonia, Spain: public health implications. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* (2009) 57: 631–638.
- Ericson I, Nadal M, van Bavel B, Lindström G, Domingo JL. Levels of perfluorochemicals in water samples from Catalonia, Spain: is drinking water a significant contribution to human exposure? *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* (2008) 15:614–619.
- Eriksson JE, Toivola D, Meriluoto JAO, Karaki H, Han Y-G, Hartshorne D. Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases. *Biochem. Biophys. Res. Co.* (1990) 173: 1347–1353.
- Eriksson JE, Goldman RD. Protein phosphatase inhibitors alter cytoskeletal structure and cellular morphology. *Adv. Protein Phosphatases* (1993) 7: 335–357.
- Eriksson JE, Paatero GIL, Meriluoto JAO, Codd GA, Kass GEN, Nicotera P, Orrenius S. Rapid microfilament reorganization induced in isolated rat hepatocytes by microcystin-LR, a cyclic peptide toxin. *Exp. Cell. Res.* (1989) 185: 86–100.
- Eschauzier C, Beerendonk E, Scholte-Veenendaal P, de Voogt P. Impact of treatment processes on the removal of perfluoroalkyl acids from the drinking water production chain. *Environ. Sci. Technol.* (2012) 46: 1708–1715.

- Eschauzier C, de Voogt P, Brauch HJ, Lange FT. Fluorinated surfactants in European surface waters, ground and drinking waters. En: Knepper TP, Lange FT (Eds.). *The Handbook of Environmental Chemistry: Fluorinated Surfactants and Transformation Products*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **2011**, 73-102.
- Eschauzier C, Haftka J, Stuyfzand PJ, de Voogt P. Perfluorinated compounds in infiltrated River Rhine water and infiltrated rainwater in coastal dunes. *Environ. Sci. Technol.* (**2010**) 44: 7450–7455.
- European Commission, **2005**. European Commission under the Fifth Framework Programme and Contributing to the Implementation of the Key Action “Sustainable Management and Quality of Water”: Best Practice Guidance for Management of Cyanotoxins in Water Supplies (Annex 1), p. 143.
- Faassen EJ, Gillissen F, Lüring M. A comparative study on three analytical methods for the determination of the neurotoxin BMAA in cyanobacteria. *PLoS ONE* (**2012**) 7(5): e36667.
- Falconer IR. Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Environ. Toxicol. Water Qual.* (**1991**) 6: 177–84.
- Falconer, I. (Ed.). *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Academic Press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, **1993**.
- Falconer IR, *Cyanobacterial toxins of drinking water supplies: Cylindrospermopsins and microcystins*. **2005a**, Boca Raton, FL: CRC Press.
- Falconer IR. Is there a human health hazard from microcystins in the drinking water supply? *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* (**2005b**) 33: 64–71.
- Falconer IR, Bartram J, Chorus I, Kuiper-Goodman T, Utkilen H, Burch M, Codd GA. Safe levels and safe practices, en Chorus I, Bartram J (Eds), *Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E&FN Spon, London, **1999**, 155–178.
- Falconer IR, Burch MD, Steffensen DA, Choice M, Coverdale OR. Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. *Environ. Toxicol. Water Qual.* (**1994**) 9: 131–139.
- Falconer IR, Choice A, Hosja W. Toxicity of edible mussels (*Mytilus edulis*) growing naturally in an estuary during water bloom of the blue-green algae *Nodularia spumigea*. *Environ. Toxicol. Water Qual.* (**1992**) 7: 119–123.
- Falconer IR, Humpage, AR. Cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water supplies: cylindrospermopsins. *Environ. Toxicol.* (**2006**) 21: 299–304.
- Falandysz J, Taniyasu S, Gulkowska A, Yamashita N, Schulte-Oehlmann U. Is fish a major source of fluorinated surfactants and repellents in humans living on the Baltic Coast? *Environ. Sci. Technol.* (**2006**) 40: 748-51.
- Fastner J, Codd GA, Metcalf JS, Woitke P, Wiedner C, Utkilen H. An international intercomparison exercise for the determination of purified microcystin-LR and microcystins in cyanobacterial field material. *Anal. Bioanal. Chem.* (**2002**) 374: 437–444.

- Fastner J, Erhard M, Carmichael WW, Sun F, Rinehart KL, Röncke H, Chorus I. Characterization and diversity of microcystins in natural blooms and strains of the genera *Microcystis* and *Planktothrix* from German freshwaters. *Arch. Hydrobiol.* (1999) 145: 147–216.
- Fastner J, Neumann U, Wirsing B, Weckesser J, Wiedner C, Nixdorf B, Chorus I. Microcystins (hepatotoxic heptapeptides) in German fresh water bodies. *Environ. Toxicol.* (1999) 14: 13–22.
- Fawell JK, Mitchell RE, Everett DJ, Hill RE. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I microcystin-LR. *Hum. Exp. Toxicol.* (1999) 18: 162–167.
- Ferranti P, Fabbrocino S, Nasi A, Caira S, Bruno M, Serpe L, Gallo P. Liquid chromatography coupled to quadruple time-of-flight tandem mass spectrometry for microcystin analysis in freshwaters: method performances and characterisation of a novel variant of MC-RR. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (2009) 23: 1328–1336.
- Ferranti P, Nasi A, Bruno M, Basile A, Serpe L, Gallo P. A peptidomic approach for monitoring and characterizing peptide cyanotoxins produced in Italian lakes by matrix-assisted laser desorption/ionisation and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (2011) 25: 1173–1183.
- Fischer WJ, Altheimer S, Cattori V, Meier PJ, Dietrich DR, Hagenbuch B. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (2005) 203: 257–263.
- Fischer WJ, Hitzfeld BC, Tencalla F, Eriksson JE, Mikhailov A, Dietrich DR. Microcystin-LR toxicodynamics, induced pathology, and immunohistochemical localization in livers of blue-green algae exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol. Sci.* (2000) 54: 365–73.
- Fitzgeorge R, Clark S, Keevil C. Routes of intoxication. En: Codd GA, Fastner J, Neumann U, Wirsing B, Weckesser J, Wiedner C, Chorus I. (Eds), 1994, 69–74.
- Fitzgerald DJ, Cunliffe DA, Burch MD. Development of health alerts for cyanobacteria and related toxins in drinking water in South Australia. *Environ. Toxicol.* (1999) 12: 203–209.
- Forcisi S, Moritz F, Kanawati B, Tziotis D, Lehmann R, Scmitt-Kopplin P. Liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics research: Mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling. *J. Chromatogr. A* (2013) 1292: 51–56.
- Francis G. Poisonous Australian Lake. *Nature* (1878) 18: 11–12.
- Frias HV, Mendes MA, Cardozo KHM, Carvalho VM, Yomazela D, Colepicolo P, Pinto E. Use of electrospray tandem mass spectrometry for identification of microcystins during a cyanobacterial bloom event. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2006) 344(3): 741–746.
- Fristachi A, Sinclair JL. Occurrence of cyanobacterial harmful algal blooms workgroup report. En: Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs. Hudnell KH (Ed.). Springer; New York, USA, 2008, 45–103.
- Fritsche U, Hüttenhain SH. A method for analysis of fluorotensides. *Chemosphere* (1994) 29: 1797–1802.
- Fromme H, Schlummer M, Moller A, Gruber L, Wolz G, Ungewiss J, Bohmer S, Dekant W, Mayer R, Liebl B, Twardella D. Exposure of an adult population to perfluorinated substances using duplicate diet portions and biomonitoring data. *Environ. Sci. Technol.* (2007) 41: 7928–7933.

- Fromme H, Tittlemier SA, Vökel W, Wilhelm M, Twardella D. Perfluorinated compounds — Exposure assessment for the general population in western countries. *Int. J. Hyg. Environ. Heal.* (2009) 212(3): 239–270.
- Furey A, Allis O, Ortea PM, Lehane M, James KJ. En Seafood and freshwater toxins. Botana LM (Ed). CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 2008.
- Gallart-Ayala H, Nuñez O, Moyano E, Galceran MT, Martins CPB. Preventing false negatives with high-resolution mass spectrometry: the benzophenone case. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (2011) 25: 3161–3166.
- Gambaro A, Barbaro E, Zangrando R, Barbante C. Simultaneous quantification of microcystins and nodularin in aerosol samples using high-performance liquid chromatography/negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (2012) 26: 1497–1506.
- Gannon JT, Hoke RA, Kaiser MA, Mueller T. Review II: Perfluorooctanoic acid (PFOA) in the environment. White paper by DuPont Wilmington, DE. Report Number: DuPont–19567. May 23, 2006. USEPA Administrative Record, AR-226-3679.
- Gathercole PS, Thiel PG. Liquid chromatographic determination of the cyanoginosins, toxins produced by cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J. Chromatogr.* (1987) 408: 435–440.
- Geissen V, Mol H, Klumpp E, Umlauf G, Nadal M, van der Ploeg M, van de Zee S E.A.T.M, Ritsema CJ. Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. *Int. Soil and Water Conserv. Res.* (2015) 3: 57–65.
- Gellrich V, Brunn H, Stahl T. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in mineral and tap water. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* (2013) 48(2): 129–135.
- Gesner-Apter S, Carmeli S. Three novel metabolites from a bloom of the cyanobacterium *Microcystis sp. Tetrahedron* (2008) 64: 6628–6634.
- Giesy JP, Kannan K. Peer reviewed: perfluorochemical surfactants in the environment. *Environ. Sci. Technol.* (2002) 36: 146A–152A.
- Goldberg J, Huang H-B, Kwon Y-G, Greengard P, Nairn AC, Kuriyan J. Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature* (1995) 376: 745–753.
- Gómez C, Vicente J, Echavarri-Erasun B, Porte C, Lacorte S. Occurrence of perfluorinated compounds in water, sediment and mussels from the Cantabric Sea (North Spain). *Mar Pollut. Bull.* (2011) 62: 948–955.
- González-Barreiro C, Martínez-Carballo E, Sitka A, Scharf S, Gans O. Method optimization for determination of selected perfluorinated alkylated substances in water samples. *Anal. Bioanal. Chem.* (2006) 386: 2123–2132.
- Grach-Pogrebinsky O, Sedmak B, Carmeli S. Seco[D-Asp<sup>3</sup>]microcystin-RR and [D-Asp<sup>3</sup>,D-Glu(OMe)<sup>6</sup>]microcystin-RR, two new microcystins from a toxic water bloom of the cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. *J Nat Prod.* (2004) 67(3):337–342.
- Gross JH. Mass Spectrometry. A Text Book, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2004.

- Grützmacher G, Böttcher G, Chorus I, Bartel H. Removal of microcystins by slow sand filtration. *Environ. Toxicol.* (2002) 17: 386–394.
- Guerra P, Kim M, Kinsman L, Ng T, Alae M, Smyth SA. Parameters affecting the formation of perfluoroalkyl acids during wastewater treatment. *J. of Hazard. Mat.* (2014) 272: 148–154.
- Guerranti C, Perra G, Corsolini S, Focardi SE. Pilot study on levels of perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in selected foodstuffs and human milk from Italy. *Food Chem.* (2013) 140: 197–203.
- Gulkowska A, Jiang Q, So MK, Taniyasu S, Lam PK, Yamashita N. Persistent perfluorinated acids in seafood collected from two cities of China. *Environ. Sci. Technol.* (2006) 40: 3736–3741.
- Gunn GJ, Rafferty AG, Rafferty GC, Cockburn N, Edwards C, Beattie KA, Codd GA. Fatal canine neurotoxicosis attributed to blue-green algae (cyanobacteria). *Vet. Rec.* (1992) 130(14): 301–302.
- Guo C, Zhang Y, Zhao X, Du P, Liu S, Lv J, Xu F, Meng W, Xu J. Distribution, source characterization and inventory of perfluoroalkyl substances in Taihu Lake, China. *Chemosphere* (2015) 127: 201–207.
- Gupta N, Bhaskar ASB, Dangi RS, Prasad GBKS, Rao PVL. Toxin production in batch cultures of freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* (2001) 67: 339–346.
- Gupta N, Pant SC, Vijayaraghavan R, Rao PVL. Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice. *Toxicology* (2003) 188: 285–96.
- Guruge KS, Taniyasu S, Yamashita N, Wijeratna S, Mohotti KM, Seneviratne HR, Kannan K, Yamanaka N, Miyazaki S. Perfluorinated organic compounds in human blood serum and seminal plasma: A study of urban and rural tea worker populations in Sri Lanka. *J. Environ. Monitor.* (2005) 7: 371–377.
- Hagen DF, Belisle J, Johnson JD, Venkateswarlu P. Characterization of fluorinated metabolites by a gas chromatographichelium microwave plasma detector—the biotransformation of 1H,1H,2H,2H-perfluorodecanol to perfluorooctanoate. *Anal. Biochem.* (1981) 118: 336–343.
- Halstvedt CB, Rohrlack T, Andersen T, Skulberg O, Edvardsen B. Seasonal dynamics and depth distribution of *Planktothrix* spp. In Lake Steinsfjorden (Norway) related to environmental factors. *J. Plankton Res.* (2007) 29(5): 471–482.
- Ham BM. Even Electron Mass Spectrometry with Biomolecule Applications. Wiley, 2008.
- Hansen KJ, Clemen LA, Ellefson ME, Johnson HO. Compound-Specific, Quantitative Characterization of Organic Fluorochemicals in Biological Matrices. *Environ. Sci. Technol.* (2001) 35: 766–770.
- Hansen KJ, Johnson HO, Eldridge JS, Butenhoff JL, Dick LA. Quantitative characterization of trace levels of PFOS and PFOA in the Tennessee River. *Environ. Sci. Technol.* (2002) 36: 1681–1685.
- Harada K, Fujii K, Shimada T, Suzuki M, Sano H, Adachi K, Carmichael WW. 2 cyclic-peptides, anabaenopeptins, a 3rd group of bioactive compounds from the cyanobacterium *Anabaena-Flos-Aquae* NRC-525-17. *Tetrahedron Lett.* (1995) 36: 1511–1514.
- Harada K-I, Kondo F, Lawton L. Laboratory analysis of cyanotoxins. En: Chorus I, Bartram J (Eds.). Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon, London, UK; 1999, 369–405.



- Harada K-I, Matsuura K, Suzuki M, Watanabe MF, Oishi S, Dahlem AM, Beasley VR, Carmichael WW. Isolation and characterization of minor components associated with microcystin LR and RR in the cyanobacterium (blue-green algae). *Toxicon* (1990b) 28: 55–64.
- Harada K, Nakasanishi S, Sasaki K, Furuyama K, Nakayama S, Saito N, Yamakawa K, Koizumi A. Particle size distribution and respiratory deposition estimates of airborne perfluorooctanoate and perfluorooctanesulfonate in Kyoto area, Japan. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* (2006) 76: 306–310.
- Harada K-I, Ogawa K, Matsuura K, Murata H, Suzuki M, Watanabe MF, Iteazono Y, Nakayama N. Structural determination of geometrical isomers of microcystin LR and RR from cyanobacteria by two-dimensional NMR spectroscopic techniques. *Chem. Res. Toxicol.* (1990a) 3(5): 473–481.
- Harada K-I, Ogawa K, Matsuura K, Nagai H, Murata H, Suzuki M, Iteazono Y, Nakayama N, Shirai M, Nakano M. Isolation of two toxic heptapeptide microcystin from an axenic strain *Microcystis aeruginosa*, K-139. *Toxicon* (1991b) 29: 479–489.
- Harada K-I, Ogawa K, Kimura Y, Murata H, Suzuki M, Thorn PM, Evans WR, Carmichael WW. Microcystins from *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. *Chem. Res. Toxicol.* (1991a) 4: 535–540.
- Harada K-I, Oshikata M, Shimada T, Nagata A, Ishikawa N, Suzuki M, Kondo F, Shimizu M, Yamada S. High performance liquid separation of microcystins derivatized with a highly fluorescent dienophile. *Nat. Toxins* (1997) 5: 201–207.
- Harada K, Tsuji K, Watanabe MF, Kondo F. Stability of microcystins from cyanobacteria—III. Effect of pH and temperature. *Phycologia* (1996) 35: 83–88.
- Hashimoto K, Noguchi T. Recent studies on paralytic shellfish poison in Japan. *Pure Appl. Chem.* (1989) 61: 7–8.
- Haug LS, Huber S, Becher G, Thomsen C. Characterisation of human exposure pathways to perfluorinated compounds—comparing exposure estimates with biomarkers of exposure. *Environ. Int.* (2011) 37: 687–693.
- Haug LS, Salihovic S, Jogsten IE, Thomsen C, van Bavel B, Lindstrom G, Bechera G. Levels in food and beverages and daily intake of perfluorinated compounds in Norway. *Chemosphere* (2010a) 80: 1137–1143.
- Haug LS, Thomsen C, Brantsaeter AL, Kvaalem HE, Haugen M, Becher G, Alexander J, Meltzer HM, Knutsen HK. Diet and particularly seafood are major sources of perfluorinated compounds in humans. *Environ. Int.* (2010b) 36: 772–778.
- Hawkins PR, Runnegar MTC, Jackson ARB, Falconer IR. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green algae) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Appl. Environ. Microb.* (1985) 50: 1292–1295.
- Hayes KP, Burch MD. Odorous compounds associated with algal blooms in South Australian Waters. *Water Res.* (1989) 23: 115–121.
- Health Canada, 2002. Cyanobacterial toxins – Microcystin-LR (Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: supporting documentation). Ottawa (ON): Health Canada, Federal-Provincial-Territorial Committee on Drinking Water. [http://hc-sc.gc.ca/ewh-semt/alt\\_formats/hecs-sesc/pdf/pubs/water-eau/cyanobacterial\\_toxins/cyanobacterial\\_toxins-eng.pdf](http://hc-sc.gc.ca/ewh-semt/alt_formats/hecs-sesc/pdf/pubs/water-eau/cyanobacterial_toxins/cyanobacterial_toxins-eng.pdf)

- Hebert GN, Odom MA, SC Bowman, Strauss SH. Attenuated Total Reflectance FTIR Detection and Quantification of Low Concentrations of Aqueous Polyatomic Anions. *Anal. Chem.* (2004) 76: 781–787.
- Henriksen P, Moestrup O. Seasonal variations in microcystis contents of Danish cyanobacteria. *J. Nat. Toxins* (1997) 5: 99–106.
- Heresztyn T, Nicholson BC. Nodularin concentrations in Lakes Alexandrina and Albert, South Australia, during a bloom of the cyanobacterium (blue-green alga) *Nodularia spumigena* and degradation of the toxin. *Environ. Toxic. Water* (1997) 12: 273–282.
- Herrmann A, Rosén J, Jansson D, Hellenäs K-E. Evaluation of a generic multi-analyte method for detection of >100 representative compounds correlated to emergency events in 19 food types by ultrahigh-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* (2012) 1235: 115–124.
- Hernández F, Ibáñez M, Sancho JV, Pozo OJ. Comparison of different mass spectrometric techniques combined with liquid chromatography for confirmation of pesticides in environmental water based on the use of identification points. *Anal. Chem.* (2004) 76: 4349–4357.
- Hernández F, Sancho JV, Ibáñez M, Abad E, Portolés T, Mattioli L. Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences. *Anal. Bioanal. Chem.* (2012) 403: 1251–1264.
- Herniman JM, Langley GJ, Bristow WT, O'Connor G. The Validation of Exact Mass Measurements for Small Molecules Using FT-ICRMS for Improved Confidence in the Selection of Elemental Formulas. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* (2005) 16: 1100–1108.
- Herranz S, Bockova M, Marazuela MD, Homola J, Moreno-Bondi MC. An SPR biosensor for the detection of microcystins in drinking water. *Anal. Bioanal. Chem.* (2010) 398: 2625–2634.
- Higgins CP, Field JA, Criddle CS, Luthy RG. Quantitative determination of perfluorochemicals in sediments and domestic sludge. *Environ. Sci. Technol.* (2005) 39: 3946–3956.
- Higgins CP, Luthy RG. Sorption of perfluorinated surfactants on sediments. *Environ. Sci. Technol.* (2006) 40(23): 7251–7256.
- Hitzfeld BC, Hoger SJ, Dietrich DR. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environ. Health Perspect.* (2000) 108: 113–122.
- Ho L, Onstad G, von Gunten U, Rinck-Pfeiffer S, Craig K, Newcombe G. Chlorination of four microcystin analogues. *Water Res.* (2006) 40(6): 1200–1209.
- Ho L, Tang T, Monis PT, Hoefel D. Biodegradation of multiple cyanobacterial metabolites in drinking water supplies. *Chemosphere* (2012) 87: 1149–1154.
- Holcapek M, Jirásko R, Lída M. Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques. *J. Chromatogr. A* (2012) 1259: 3–15.
- Holmes CFB. Liquid chromatography-linked protein phosphatase bioassay; a highly sensitive marine bioscreen for okadaic acid and related diarrhetic shellfish toxins. *Toxicon* (1991) 29: 469–477.
- Holtcamp W. Obesogens: an environmental link to obesity. *Environ. Health Perspect.* (2012) 120: A62–A68.

- Hölzer J, Göen T, Just P, Reupert R, Rauchfuss K, Kraft M, Müller J, Wilhelm M. Perfluorinated compounds in fish and blood of anglers at Lake M hne, Sauerland area, Germany. *Environ. Sci. Technol.* (2011) 45: 8046–8052.
- Honkanen RE, Dukelow M, Zwiller J, Moore RE, Khatra BS, Boynton AL. Cyanobacterial nodularin is a potent inhibitor of type 1 and 2A protein phosphatases. *Mol. Pharmacol.* (1991) 40: 577–583.
- Honkanen RE, Zwiller J, Moore RE, Daily SL, Khatra BS, Dukelow M, Boynton AL. Characterization of microcystin-LR, a protein inhibitor type 1 and 2A protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* (1990) 265: 19401–19404.
- Hori H, Hayakawa E, Yamashita N, Taniyasu S, Nakata F, Kobayashi Y. High-performance liquid chromatography with conductimetric detection of perfluorocarboxylic acids and perfluorosulfonates. *Chemosphere* (2004) 57: 273–282.
- Houtz EF, Higgins CP, Field JA, Sedlak DL. Persistence of perfluoroalkyl acid precursors in AFFF-impacted groundwater and soil. *Environ. Sci. Technol.* (2013) 47: 8187–8195.
- Howard KL, Boyer GL. Quantitative analysis of cyanobacterial toxins by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* (2007) 79: 5980–5986.
- Huang WJ, Cheng BL, Cheng YL. Adsorption of microcystin-LR by three types of activated carbon. *J. Hazard. Mater.* (2007) 141: 115–122.
- Humpage AR, Froschio SM, Lau HM, Murphy D, Blackbeard J. Evaluation of the Abraxis Strip Test for Microcystins™ for use with wastewater effluent and reservoir water. *Water Res.* (2012) 46: 1556–1565.
- Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* (1995) 80: 225–236.
- Huset CA, Chiaia AC, Barfosky DF, Jonkers N, Kohler H-PE, Ort C, Giger W, Field JA. Occurrence and mass flows of fluorochemicals in the Glatt Valley watershed, Switzerland. *Environ. Sci. Technol.* (2008) 42: 6369–6377.
- ISO 20179:2005. Water quality - Determination of microcystins - Method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection.
- ISO 25101:2009. Water quality - Determination of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) - Method for unfiltered samples using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry.
- James KJ, Crowley J, Hamilton B, Lehane M, Skulberg O, Furey A. Anatoxins and degradation products, determined using hybrid quadrupole time-of-flight and quadrupole ion-trap mass spectrometry: forensic investigations of cyanobacterial neurotoxin poisoning. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (2005) 19: 1167-1175.
- James H, Fawell JK. En: Water Research Centre (Ed.). Detection and Removal of Cyanobacterial Toxins from Freshwaters. Foundation for Water Research Publisher, Great Britain, 1991, 1–38.
- Jahnke A, Berger U. Trace analysis of per- and polyfluorinated alkyl substances in various matrices-How do current methods perform? *J. Chromatogr. A* (2009) 1216: 410–421.

- Janesick A, Blumberg B. Endocrine disrupting chemicals and the developmental programming of adipogenesis and obesity. *Birth Defects Res. C. Embryo Today*. (2011) 93(1): 34–50.
- Jennifer AF, Johnson CA, Rose JB. What is “emerging”? *Environ. Sci. Technol.* (2006) 40 (23): 7105.
- Jiang L, Johnston E, Åberg KM, Nilsson U, Ilag LL. Strategy for quantifying trace levels of BMAA in cyanobacteria by LC/MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* (2013) 405: 1283–1292
- Jiwan JLH, Wallemacq P, Herent MF. HPLC – high resolution mass spectrometry in clinical laboratory? *Clin. Biochem.* (2011) 44: 136–147.
- Jochimsen y col. 1998: ISO 10260 1992(E): Water quality- Measurement of biochemical parameters - Spectrometric determination of the chlorophyll-a concentration.
- Jones GJ, Falconer F, Wilkins RM. Persistence of cyclic peptide toxins in dried cyanobacterial crusts from Lake Mokoan, Australia. *Environ. Toxicol. Water Quality* (1995) 10: 19-24.
- Jones GJ, Orr PT. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. *Water Res.* (1994) 28: 871–876.
- Jurczak T, Tarczynska M, Izydorczyk K, Mankiewicz J, Zalewski M, Meriluoto J. Elimination of microcystins by water treatment processes-examples from Sulejow Reservoir, Poland. *Water Res.* (2005) 39: 2394–2406.
- Kadar H, Veyrand B, Antignac JP, Durand S, Monteau F, Le Bizec B. Comparative study of low- versus high-resolution liquid chromatography–mass spectrometric strategies for measuring perfluorinated contaminants in fish. *Food Addit. Contam. A* (2011) 28: 1261–1273.
- Kaiser MA, Barton CA, Botelho M, Buck RC, Buxton LW, Gannon J, Kao CPC, Larsen BS, Russell MH, Wang N, Waterland RL. Understanding the transport of anthropogenic fluorinated compounds in the environment. *Organohalogen Compd.* (2006) 68: 675–678.
- Kankaanpää HT, Holliday J, Schröder H, Goddard T, von Fister E, Carmichale WW. Cyanobacteria and prawn farming in northern New South Wales, Australia – a case study on cyanobacteria diversity and hepatotoxin bioaccumulation. *Toxicol. Appl. Pharm.* (2005) 784: 243–256.
- Kannan K, Corsolini S, Falandysz J, Fillmann G, Kumar KS, Loganathan BG, Mohd MA, Olivero J, van Wouwe N, Yang JH, Aldoust KM. Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in human blood from several countries. *Environ. Sci. Technol.* (2004) 38: 4489–4495.
- Karlsson K, Sipilä V, Kankaanpää H, Meriluoto J. Mass spectrometric detection of nodularin and desmethylnodularin in mussels and flounders. *J. Chromatogr. B* (2003) 784: 243–253.
- Karlsson KM, Spoo LE, Meriluoto JA. Quantitative LC-ESI-MS analyses of microcystins and nodularin-R in animal tissue–matrix effects and method validation. *Environ. Toxicol.* (2005) 20: 381–389.
- Kärman A, Harada KH, Inoue K, Takasuga T, Ohi E, Koizumi A. Relationship between dietary exposure and serum perfluorochemical (PFC) levels—a case study. *Environ. Int.* (2009) 35: 712–717.
- Kato K, Calafat AM, Wong LY, Wanigatunga AA, Caudill SP, Needham LL. Polyfluoroalkyl compounds in pooled sera from children participating in the National Health and Nutrition Examination Survey 2001–2002. *Environ. Sci. Technol.* (2009) 43: 2641–2647.

- Kaufmann A, Butcher P. Strategies to avoid false negative findings in residue analysis using liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (2006) 20: 3566–3572.
- Kaufmann A, Butcher P, Maden K, Walker S, Widmer M. Comprehensive comparison of liquid chromatography selectivity as provided by two types of liquid chromatography detectors (high resolution mass spectrometry and tandem mass spectrometry): “Where is the crossover point?” *Anal. Chim. Acta* (2010) 673: 60–72.
- Kaushik R, Balasubramanian R. Methods and approaches used for detection of cyanotoxins in environmental samples: a review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* (2013) 43: 1349–1383.
- Kawasaki H, Shimomae Y, Watanabe T, Arakawa R. Desorption/ionization on porous silicon mass spectrometry (DIOS-MS) of perfluorooctane sulfonate (PFOS), *Colloids Surf. A* (2009) 347: 220–224.
- Kaya K, Mahakhant A, Keovara L. Trabajo presentado en el 9<sup>th</sup> *International Conference on Harmful Algal Blooms*, Hobart, Tasmania, Australia, 2000.
- Kaya K, Watanabe MM. Microcystin composition of an axenic clonal strain of *Microcystis viridis* and *Microcystis viridis*-containing water blooms in Japanese freshwaters. *J. Appl. Phycol.* (1990) 2: 173–178.
- Keleti G, Sykora JL, Lippy EC, Shapiro MA. Composition and biological properties of lypopolysaccharides isolated from *Schizothrix calcicola* (Ag.) Gomont (cyanobacteria). *Appl. Environ. Microbiol.* (1979) 38: 471–477.
- Keller JM, Calafat A M, Kato K, Ellefson ME, Reagen WK, Strynar M, O’Connell S, Butt CM, Mabury SA, Small J, Muir DCG, Leigh SD, Schantz MM. Determination of perfluorinated alkyl acid concentrations in human serum and milk standard reference materials. *Anal. Bioanal. Chem.* (2010) 397 (2): 439–451.
- Kellmann R, Mihali TK, Jeon YJ, Pickford R, Pomati F, Neilan BA. Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* (2008) 74: 4044–53.
- Kellmann R, Mills T, Neilan BA. Functional modeling and phylogenetic distribution of putative cylindrospermopsin biosynthesis enzymes. *J. Mol. Evol.* (2006) 62: 267–280.
- Kemper RA, Jepson GW. Pharmacokinetics of perfluorooctanoic acid in male and female rats. *Toxicol. Sci.* (2003) 72: 716.
- Kikuchi S, Kubo T, Kaya K. Cylindrospermopsin determination using 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (HEPES) as the internal standard. *Anal. Chim. Acta* (2007) 583: 124–127.
- Kim SK, Im J-K, Kang Y-M, Jung S-Y, Kho YL, Zoh K-D. Wastewater treatment plants (WWTPs)-derived national discharge loads of perfluorinated compounds (PFCs). *J. Hazard. Mater.* (2012) 201–202: 82–91.
- Kim SK, Kho YL, Shoeib M, Kim KS, Kim KR, Park JE, Shin YS. Occurrence of perfluorooctanoate and perfluorooctanesulfonate in the Korean water system: implication to water intake exposure. *Environ. Pollut.* (2011) 159(5): 1167–1173.

- Kind T, Fiehn O. Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. *BMC Bioinformatics* (2007) 8: 105.
- Kissa E. Determination of organofluorine in air. *Environ. Sci. Technol.* (1986) 20: 1254–1257.
- Kissa E. Fluorinated surfactants and repellents. 2<sup>nd</sup> ed. Marcel Dekker, New York, 2001.
- Kiviranta J, Abdel-Hameed A, Sivonen K, Niemellä SI, Carlberg G. Toxicity of cyanobacteria to mosquito larvae-screening of active compounds. *Environ. Toxicol. Water Qual.* (1993) 8: 63–71.
- Kiviranta J, Namikoshi M, Sivonen K, Evans WR, Carmichael WW, Rinehart KL. Structure determination and toxicity of a new microcystin from *Microcystis aeruginosa* strain 205. *Toxicon* (1992) 30: 1093–1098.
- Kiviranta J, Sivonen K, Niemellä SI, Huovinen K. Detection of toxicity of cyanobacteria by *Artemia salina* bioassay. *Environ. Toxicol. Water Qual.* (1991) 6: 423–436.
- Knob R, Maier V, Petr J, Ranc V, Sevcik J. On-line preconcentration of perfluorooctanoic acid and perfluorooctanesulfonic acid by nonaqueous capillary electrophoresis. *Electrophoresis* (2012) 33: 2159–2166.
- Komarek J, Anagnostidis K. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 2. Chroococcales. *Algol. Stud.* (1986) 43: 157–226.
- Kós P, Gorzó G, Surányi G, Borbély G. Simple and efficient method for isolation and measurement of cyanobacterial hepatotoxins by plant tests (*Sinapsis alba* L.). *Anal. Biochem.* (1995) 225: 49–53.
- Kosol S, Schmidt J, Kurmayer R. Variation in peptide net production and growth among strains of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. *Eur. J. Phycol.* (2009) 44: 49–62.
- Kotak BG, Lam AKY, Prepas EE, Kenefick SL, Hruday SE. Variability of the hepatotoxin microcystin-LR in hypereutrophic drinking-water lakes. *J. Phycol.* (1995) 31: 248–263.
- Krishnamurthy T, Carmichael WW, Sarver EW. Toxic peptides from freshwater cyanobacteria (blue-green algae). I Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae*. *Toxicon* (1986) 24: 865–873.
- Krishnamurthy T, Szafraniec L, Hunt DF, Shabanowitz J, Yates III JR, Hauer CR, Carmichael WW, Skulberg O, Codd GA, Missler S. Structural characterization of toxic cyclic peptides from blue-green algae by tandem mass spectrometry. *P. Natl. Acad. Sci. USA* (1989) 86: 770–774.
- Krüger T, Christian B, Luckas B. Development of an analytical method for unambiguous structure elucidation of cyclic peptides with special appliance for hepatotoxic desmethylated microcystins. *Toxicon* (2009) 54: 302–312.
- Kubwabo C, Kosarac I, Lalonde K. Determination of selected perfluorinated compounds and polyfluoroalkyl phosphate surfactants in human milk. *Chemosphere* (2013) 91: 771–777.
- Kudo N, Bandai N, Kawashima Y. Determination of perfluorocarboxylic acids by gas-liquid chromatography in rat tissues. *Toxicol. Lett.* (1998) 99: 183–190.
- Kuiper-Goodman T, Falconer I, Fitzgerald J. Human health aspects, en Chorus I, Bartram J (Eds). Toxic Cyanobacteria in Water; a Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management. E&FN Spon, London, 1999, 113–153.

- Kuklenyik Z, Needham LL, Calafat AM. Measurement of 18 perfluorinated organic acids and amides in human serum using on-line solid-phase extraction. *Anal. Chem.* (2015) 77: 6085–6091.
- Kurmayer R, Christiansen G. The genetic basis of toxin production in cyanobacteria. *Freshw. Rev.* (2009) 2: 31–50.
- Kurmayer R, Juttner F. Strategies for the co-existence of zooplankton with the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in Lake Zurich. *J. Plankton Res.* (1999) 21: 659–683.
- Kusumi T, Ooi T, Watanabe MM, Takahashi H, Kakisawa H. Cyanoviridin RR, a toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis viridis*. *Tetrahedron Lett.* (1987) 28: 4695–4698.
- Kwok KY, Taniyasu S, Yeung LWY, Murphy MB, Lam PKS, Horii Y, Kannan K, Petrick G, Sinha RK, Yamashita N. Flux of Perfluorinated Chemicals through Wet Deposition in Japan, the United States, and Several Other Countries. *Environ. Sci. Technol.* (2010) 44: 7043–7049.
- Lahti K, Kilponen J, Kivimaeki A, Removal of cyanobacteria and their hepatotoxins from raw water in soil and sediment columns. Trabajo presentado en el *International Symposium on Artificial Recharge of Groundwater*, Helsinki (Finlandia), 1996, 187–195.
- Lange CC. Biodegradation screen study for telomere-type alcohols. 3M Project ID No. E01-0684. USEPA Administrative Record (2002) AR-226-0555.
- Lau C, Anitole K, Hodes C, Lai D, Pfahles-Hutchens A, Seed J. Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings. *Toxicol. Sci.* (2007) 99(2): 366–394.
- Lau C, Butenhoff JL, Rogers JM. The developmental toxicity of perfluoroalkyl acids and their derivatives. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (2004) 198: 231–241.
- Lau C, Strynar M, Lindstrom AB, Hanson RG, Thibodeaux JR, Barton HA. Pharmacokinetic evaluation of perfluorooctanoic acid in the mouse. *Toxicologist* (2005) 84: 252.
- Lau C, Thibodeaux JR, Hanson RG, Narotsky MG, Rogers JM, Lindstrom AB, Strynar MJ. Effects of perfluorooctanoic acid exposure during pregnancy in the mouse. *Toxicol. Sci.* (2006) 90: 510–518.
- Laub J, Henriksen P, Brittain SM, Wang J, Carmichael WW, Rinehart KL, Moestrup O. [ADMAAdda5]-microcystins in *Planktothrix agardhii* strain PH-123 (cyanobacteria)—importance for monitoring of microcystins in the environment. *Environ. Toxicol.* (2002) 17(4): 351–357.
- Lawton LA, Edwards C. Purification of microcystins. *J. Chromatogr. A.* (2001) 912: 191–209.
- Lawton LA., Edwards C. Conventional laboratory methods for cyanotoxins. En: Hudnell KH, (Ed). *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. Springer, New York, USA, 2008, 513–537.
- Lawton LA, Edwards C, Codd GA. Extraction and high-performance liquid-chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst* (1994) 119(7): 1525–1530.
- Lawton LA, Edwards C, Beattie KA, Pleasance S, Dear GJ, Codd GA. Isolation and characterization of microcystins from laboratory cultures and environmental samples of *Microcystis aeruginosa* and from an associated animal toxicosis. *Nat. Toxins* (1995) 3(1): 50–57.
- Lee T-H, Chen Y-M, Chou H-N. First report of microcystins in Taiwan. *Toxicon* (1998) 36(2): 247–255.

- Lee T-H, Chou H-N. Isolation and identification of seven microcystins from a cultured M. TN-2 strain of *Microcystis aeruginosa*. *Bot. Bull. Acad. Sinica* (2000) 41: 197–202.
- Lee HS, Jeong CK, Lee HM, Choi SJ, Do KS, Kim K, Kim YH. On-line trace enrichment for the simultaneous determination of microcystins in aqueous samples using high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *J. Chromatogr. A* (1999) 848: 179–184.
- Leeuwangh P, Kappers FI, Dekke, M, Koerselman W. Toxicity of cyanobacteria in Dutch lakes and reservoirs. *Aquat. Toxicol.* (1983) 4: 63–72.
- Lehane L. Update on histamine fish poisoning. *Med. J. Aust.* (2000) 173: 149–152.
- Levine AD, Libelo EL, Bugna G, Shelley T, Mayfield H, Stauffer TB. Biogeochemical assessment of natural attenuation of JP-4-contaminated ground water in the presence of fluorinated surfactants. *Sci. Total Environ.* (1997) 208: 179–195.
- Li J, Guo F, Wang Y, Liu J, Cai Z, Zhang J, Zhao Y, Wu Y. Development of extraction methods for the analysis of perfluorinated compounds in human hair and nail by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* (2012) 1219: 54–60.
- Li Z, Li M, Liu X, Ma Y, Wu M. Identification of priority organic compounds in groundwater recharge of China. *Sci. Total Environ.* (2014) 493: 481–486.
- Lien NPH, Fujii S, Tanaka S, Nozoe M, Wirojanagud W, Anton A, Lindstrom G. Perfluorinated substances in tap water of Japan and several countries and their relationship to surface contamination. *Environ. Eng. Res.* (2006) 43: 611–618.
- Lindstrom G, Karrman A, van Bavel B. Accuracy and precision in the determination of perfluorinated chemicals in human blood verified by interlaboratory comparisons. *J. Chromatogr. A* (2009) 1216 (3): 394–400.
- Lindstrom AB, Strynar MJ, Libelo EL. Polyfluorinated compounds: past, present and future. *Environ. Sci. Technol.* (2011) 45: 7954–7961.
- Lipp P, Sacher F, Baldauf G. Removal of organic micropollutants during drinking water treatment by nanofiltration and reverse osmosis. *Desalination Water Treat.* (2010) 13: 226–237.
- Liu B, Zhang H, Xie L, Li J, Wang X, Zhao L, Wang Y, Yang B. Spatial distribution and partition of perfluoroalkyl acids (PFAAs) in rivers of the Pearl River Delta, southern China. *Sci. Total Environ.* (2015) 524–525: 1–7.
- Liu W-X, He W, Qin N, Kong X-Z, He Q-S, Yang B, Yang C, Jorgensen SE, Xu F-L. Temporal-spatial distributions and ecological risks of perfluoroalkyl acids (PFAAs) in the surface water from the fifth-largest freshwater lake in China (Lake Chaohu). *Environ. Pollut.* (2015) 200: 24–34.
- Liu Y, Dos Santos Pereira A, Martin JW. Discovery of C5-C17 Poly- and Perfluoroalkyl substances in water by in-line SPE-HPLC-Orbitrap with in-source fragmentation flagging. *Anal. Chem.* (2015) 87(8): 4260–4268.
- Liou JSC, Szostek B, DeRito CM, Madsen EL. Investigating the biodegradability of perfluorooctanoic acid. *Chemosphere* (2010) 80: 176–183.
- Llorca M, Farré M, Picó Y, Barceló D. Analysis of perfluorinated compounds in sewage sludge by pressurized solvent extraction followed by liquid chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A* (2011) 1218(30): 4840–4846.



- Llorca M, Farré M, Picó Y, Müller J, Knepper TP, Barceló D. Analysis of perfluoroalkyl substances in waters from Germany and Spain. *Sci Total Environ.* (2012a) 431: 139–150.
- Llorca M, Pérez F, Farré M, Picó Y, Barceló D. Perfluorinated compounds' analysis, environmental fate and occurrence: the Llobregat River as case study. En: Sabater S, Ginebreda A, Barceló D (Eds.). *The Llobregat. The story of a polluted Mediterranean River.* Hdb Env ChemGermany, Springer-Verlag, 2012b, 193–237.
- Lloyd AS, Bailey VA, Hird SJ, Routledge A, Clarke DB. Mass spectral studies towards more reliable measurement of perfluorooctanesulfonic acid and other perfluorinated chemicals (PFCs) in food matrices using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* (2009) 23: 2923–2938.
- Loganathan BG, Sajwan KS, Sinclair E, Senthil Kumar K, Kannan K. Perfluoroalkyl sulfonate and perfluoroalkyl carboxylates in two wastewater treatment plant facilities in Kentucky and Georgia. *Water Res.* (2007) 41: 4611–4620.
- Loi-Brugger A, Panglisch S, Hoffmann G, Buchta P, Gimbel R, Nacke CJ. Removal of trace organic substances from river bank filtrate-performance study of RO and NF membranes. *Water Sci. Technol. Water Supply* (2008) 8: 85–92.
- Loos R, Locoro G, Huber T, Wollgast J, Christop EH, de Jager A, Manfred Gawlik B, Hanke G, Umlauf G, Zaldívar JM. Analysis of perfluorooctanoate (PFOA) and other perfluorinated compounds in the River Po watershed in N-Italy. *Chemosphere* (2008) 71: 306–313.
- Loos R, Gawlik BM, Locoro G, Rimaviciute E, Contini S, Bidoglio G. EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environ. Pollut.* (2009) 157: 561–568.
- Loos R, Locoro G, Comero S, Contini S, Schwesig D, Werres F, Balsaa P, Gans O, Weiss S, Blaha L, Bolchi M, Gawlik BM. Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in groundwater. *Water Res.* (2010) 44: 4115–4126.
- Loos R, Wollgast J, Huber T, Hanke G. Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in Northern Italy. *Anal. Bioanal. Chem.* (2007) 387: 469–478.
- Lopez B, Ollivier P, Togola A, Baran N, Ghestem J-P. Screening of French groundwater for regulated and emerging contaminants. *Sci. Total Environ.* (2015) 518–519: 562–573.
- Loyprasert S, Thavarungkul P, Asawatreratanakul P, Wongkittisuksa B, Limsakul C, Kanatharana P. Label-free capacitive immunosensor for microcystin-LR using self-assembled thiourea monolayer incorporated with Ag nanoparticles on gold electrode. *Biosens. Bioelectron* (2008) 24: 78–86.
- Lutze H, Panglisch S, Bergmann A, Schmidt TC. Treatment options for the removal and degradation of polyfluorinated chemicals. En: Knepper TP, Lange FT (Eds.). *The Handbook of Environmental Chemistry: Fluorinated Surfactants and Transformation Products.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2011, 103-126.
- Luukkainen R, Namikoshi M, Sivonen K, Rinehart KL, Niemelä SI. Isolation and identification of 12 microcystins from four strains and two bloom samples of *Microcystis spp.*: structure of a new hepatotoxin. *Toxicon* (1994) 32: 133–139.

- Luukkainen R, Sivonen K, Namikoshi M, Färdig M, Rinehart KL, Niemelä SI. Isolation and identification of eight microcystins from thirteen *Oscillatoria agardhii* strains and structure of a new microcystin. *Appl. Environ. Microb.* (1993) 59: 2204–2209.
- Ma J, Liu W, Effectiveness and mechanism of potassium ferrate (VI) preoxidation for algae removal by coagulation. *Water Res.* (2002) 26: 871–878.
- MacKintosh C, Beattie KA, Klumpp S, Cohen P, Codd GA. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2a from both mammals and higher plants. *FEBS Lett.* (1990) 264: 187–192.
- Mackintosh C, Mackintosh RW. The inhibition of protein phosphatases by toxins: implications for health and an extremely sensitive and rapid bioassay for toxin detection. En Codd GA, Jefferies TM, Keevil CW, Potter E (Eds). Detection methods for cyanobacterial toxins. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1994, 90–94.
- Magalhães VF, Soares RM, Azevedo SMFO. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon* (2001) 39: 1077–1085.
- Magalhães VF, Marinho MM, Domingos P, Oliveira AC, Costa SM, Azevedo LO, Azevedo SMFO. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon* (2003) 42: 289–295.
- Maizels M, Budde WL. A LC/MS method for determination of cyanobacteria toxins in water. *Anal. Chem.* (2004) 76: 1342-1351.
- McLachlan MS, Holmstrom KE, Reth M, Berger U. Riverine discharge of perfluorinated carboxylates from the European continent. *Environ. Sci. Technol.* (2007) 41: 7260–7265.
- Mak YL, Taniyasu S, Yeung LWY, Lu G, Jin L, Yang Y, Lam PKS, Kannan K, Yamashita N. Perfluorinated compounds in tap water from China and several other countries. *Environ. Sci. Technol.* (2009) 43: 4824–4829.
- Makarov A, Scigelova M. Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* (2010) 1217: 3938-3945.
- Manhakhant A, Sano T, Ratanachot P, Tong-a-ram T, Srivastava VC, Watanabe MM, Kaya K. Detection of microcystins from cyanobacterial blooms in Thailand fresh water. *Phycol. Res.* (1998) 46: 25–29.
- Marsall AG, Hendrickson CL. High-Resolution Mass Spectrometer. *Annu. Rev. Anal. Chem.* (2008) 1: 579-599.
- Martin JW, Asher BJ, Beeson S, Benskin JP, Ross MS. PFOS or PreFOS? Are perfluorooctane sulfonate precursors (PreFOS) important determinants of human and environmental perfluorooctane sulfonate PFOS exposure? *J. Environ. Monit.* (2010) 12(11):1979–2004.
- Martin JW, Ellis DA, Mabury SA, Hurley MD, Wallington TJ. Atmospheric chemistry of perfluoroalkanesulfonamides: kinetic and product studies of the OH radical and Cl atom initiated oxidation of n-ethyl perfluorobutanesulfonamide. *Environ. Sci. Technol.* (2006) 40: 864–872.

- Martin JW, Kannan K, Berger U, de Voogt P, Field J, Franklin J, Giesy JP, Harner T, Muir DCG, Scott B, Kaiser M, Järnberg U, Jones KC, Mabury SA, Schroeder H, Simcik M, Sottani C, van Babel B, Kärrman A, Lindström G, van Leeuwen S. Peer Reviewed: Analytical Challenges Hamper Perfluoroalkyl Research. *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 248A–255A.
- Martin JW, Muir DCG, Moody CA, Ellis D, Kwan WC, Solomon KR, Mabury SA. Collection of airborne fluorinated organics and analysis by gas chromatography/chemical ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* (2002) 74: 584–590.
- Martin JW, Smithwick MM, Braune BM, Hoekstra PF, Muir DCG, Mabury SA. Identification of long-chain perfluorinated acids in biota from the Canadian Arctic. *Environ. Sci. Technol.* (2004) 38: 373–380.
- Maras M, Vanparys C, Muylle F, Robbens J, Berger U, Barber JL, Blust R, De Coen W. Estrogen-like properties of fluorotelomer alcohols as revealed by MCF-7 breast cancer cell proliferation. *Environ. Health Perspect.* (2006) 114: 100–105.
- Masar M, Wójcik L, Kaniansky D, Trojanowicz M. Zone electrophoresis separation of perfluorocarboxylic acids on a chip with conductivity detection. *J. Sep. Sci.* (2005) 28: 1271–1277.
- Matthiensen A, Beattie KA, Yunes JS, Kaya K, Codd GA. [D-Leu<sup>1</sup>]microcystin-LR, from the cyanobacterium *Microcystis* RST 9501 and from a *Microcystis* bloom in the Patos Lagoon estuary, Brazil. *Phytochemistry* (2000) 55: 383–387.
- McElhiney J, Lawton LA. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (2005) 203(3): 219–30.
- McMurdo CJ, Ellis DA, Webster E, Butler J, Christensen RD, Reid LK. Aerosol enrichment of the surfactant PFO and mediation of the water–air transport of gaseous PFOA. *Environ. Sci. Technol.* (2008) 42: 3969–3974.
- MDH, 2008. Perfluorochemical contamination in Lake Elmo and Oakdale, Washington county, Minnesota. <http://www.health.state.mn.us/divs/eh/hazardous/sites/washington/lakeelmo/phaelmoakdale.pdf>
- Meesters RJW, Schroder HF. Perfluorooctane sulfonate - a quite mobile anionic anthropogenic surfactant, ubiquitously found in the environment. *Water Sci. Technol.* (2004) 50(5): 235–242.
- Merel S, LeBot B, Clément M, Seux R, Thomas O. MS identification of microcystin-LR chlorination by-products. *Chemosphere* (2009) 74: 832–839.
- Merel S, Clément M, Mourot A, Fessard V, Thomas O. Characterization of cylindrospermopsin chlorination. *Sci. Total Environ.* (2010) 408: 3433–3442.
- Merel S, Clément M, Thomas O. State of the art on cyanotoxins in water and their behaviour towards chlorine. *Toxicon* (2010) 55: 677–691.
- Merel S, Walker D, Chicana R, Snyder S, Baurès E, Thomas O. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environ. Int.* (2013) 59: 303–327.
- Meriluoto JAO. Chromatography of microcystins. *Anal. Chim. Acta* (1997) 352: 277–298.

- Meriluoto J, Codd GA, (Eds.). TOXIC - Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. Abo Akademi University Press, **2005**.
- Meriluoto JAO, Kincaid B, Smyth MR, Wasberg M. Electrochemical detection of microcystins, cyanobacterial peptide hepatotoxins, following high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* (**1998**) 810: 226–230.
- Meriluoto JAO, Sadström A, Eriksson JE, Remaud G, Craig AG, Chattopadhyaya J. Structure and toxicity of a peptide hepatotoxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. *Toxicon* (**1989**) 27: 1021–1034.
- Messineo V, Bogianni S, Melchiorre S, Sechi N, Lugliè A, Casiddu P, Mariani MA, Padedda BM, Corcia AD, Mazza R, Carloni E, Bruno M. Cyanobacterial toxins in Italian freshwaters. *Limnologica* (**2009**) 39: 95–106
- Metcalf JS, Bell SG, Codd GA. Colorimetric immune-protein phosphatase inhibition assay for specific detection of microcystins and nodularins of cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* (**2001**) 67: 904–909.
- Miao HF, Lu X, Yan Q, Xie LJ, Ruan WQ. Degradation of microcystinLR by ozonation process. *Huan Jing Ke Xue* (**2009**) 30(11): 3288–3292.
- Miao HF, Qin F, Tao GJ, Tao WY, Ruan WQ. Detoxification and degradation of microcystin-LR and -RR by ozonation. *Chemosphere* (**2010**) 79(4): 355–361.
- Miles CO, Sandvik M, Nonga HE, Rundberget T, Wilkins AL, Rise F, Ballot A. Thiol derivatization for LC-MS identification of microcystins in complex matrices. *Environ. Sci. Technol.* (**2012**) 46: 8937-8944.
- Mil'man BL, Russkikh YV, Nekrasova LV, Zhakovs ZA. An approach to the mass spectrometry identification of cyanobacterial peptides. The case of demethylmicrocystin-LR. *J. Anal. Chem.* (**2011**) 66: 1423–1431.
- Minnesota Department of Health, **2008**. Public Health Assessment: Perfluorochemical Contamination in Lake Elmo and Oakdale, Washington County, Minnesota. <http://www.health.state.mn.us/divs/eh/hazardous/topics/pfcs/pha/lakeelmoakdale/>
- Minnesota Department of Health, **2011**. Health Guidelines for Perfluorinated Chemicals (PFCs) in Drinking Water. <http://www.health.state.mn.us/divs/eh/hazardous/topics/pfcs/drinkingwater.html>
- Miyake Y, Yamashita N, So MK, Rostkowski P, Taniyasu S, Lam PKS, Kannan K. Trace analysis of total fluorine in human blood using combustion ion chromatography for fluorine: a mass balance approach for the determination of known and unknown organofluorine compounds. *J. Chromatogr. A* (**2007**) 1154: 214–221.
- Moffitt MC, Neilan BA. Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* (**2004**) 70: 6353–62.
- Mohamed ZA, Carmichael WW, Hussein AA. Estimation of microcystin in the freshwater fish *Oreochromis niloticus* in a Egyptian fish farm containing a *Microcystis* bloom. *Environ. Toxicol.* (**2003**) 18: 137–141.

- Möller A, Ahrens L, Sturm R, Westerveld J, van der Wielen F, Ebinghaus R, de Voogt P. Distribution and sources of polyfluoroalkyl substances (PFAS) in the River Rhine watershed. *Environ. Pollut.* (2010) 158: 3243–3250.
- Moody CA, Field JA. Determination of perfluorocarboxylates in groundwater impacted by fire-fighting activity. *Environ. Sci. Technol.* (1999) 33: 2800–2806.
- Moody CA, Field JA. Perfluorinated surfactants and the environmental implications of their use in fire-fighting foams. *Environ. Sci. Technol.* (2000) 34: 3864–3870.
- Moody CA, Hebert GN, Strauss SH, Field JA. Occurrence and persistence of perfluorooctane sulfonate and other fluorinated surfactants in groundwater at a fire-training area at Wurtsmith Air Force Base, Michigan USA. *J. Environ. Monit.* (2003) 5: 341–345.
- Moody CA, Kwan WC, Martin JW, Muir DC, Mabury SA. Determination of perfluorinated surfactants in surface water samples by two independent analytical techniques: liquid chromatography/tandem mass spectrometry and <sup>19</sup>F NMR. *Anal. Chem.* (2001) 73(10): 2200–2206.
- Moody CA, Martin JW, Kwan WC, Muir DCG, Mabury SA. Monitoring perfluorinated surfactants in biota and surface water samples following an accidental release of firefighting foam into Etobicoke Creek. *Environ. Sci. Technol.* (2002) 36: 545–551.
- Moore RE, Corbett TH, Patterson GML, Valeriote FA. The search for new antitumor drugs from blue-green algae. *Curr. Pharm. Design* (1996) 2: 317–330.
- M sagati TAM, Siame BA, Shushu DD. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquat. Toxicol.* (2006) 78: 382–397.
- Munoz G, Vo Duy S, Budzinski H, Labadie P, Liu J, Sauvé S. Quantitative analysis of poly- and perfluoroalkyl compounds in water matrices using high resolution mass spectrometry: optimization for a laser diode thermal desorption method. *Anal. Chim. Acta* (2015) 881: 98–106
- Munoz G, Giraudel J-L, Botta F, Lestremau F, Dévier M-H, Budzinski H, Labadie P. Spatial distribution and partitioning behavior of selected poly- and perfluoroalkyl substances in freshwater ecosystems: A French nationwide survey. *Sci. Total Environ.* (2015) 517: 48–56.
- Murakami M, Shinohara H, Takada H. Evaluation of wastewater and street runoff as sources of perfluorinated surfactants (PFSs). *Chemosphere* (2009) 74: 487–493.
- Musijowski J, Szostek B, Koc M, Trojanowicz M. Determination of fluoride as fluorosilane derivative using reversed-phase HPLC with UV detection for determination of Total Organic Fluorine. *J. Sep. Sci.* (2010) 33: 2636–2644.
- Naile JE, Khim JS, Wang T, Chen C, Luo W, Kwon BO, Park J, Koh CH, Jones PD, Lu Y, Giesy JP. Perfluorinated compounds in water, sediment, soil and biota from estuarine and coastal areas of Korea. *Environ. Pollut.* (2010) 158: 1237–1244.
- Namikoshi M, Rinehart KL, Sakai R, Sivonen K, Carmichael WW. Structures of three new cyclic heptapeptide hepatotoxins produced by the cyanobacterium (blue-green alga) *Nostoc sp.* strain. *J. Org. Chem.* (1990) 55: 6135–6139.

- Namikoshi M, Rinehart KL, Sakai R, Stotts RR, Dahlem AM, Beasley VR, Carmichael WW, Evans WR. Identification of 12 hepatotoxins from a Homer Lake bloom of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis*, and *Microcystis wesenbergii*: nine new microcystins. *J. Org. Chem.* (1992a) 57: 866–872.
- Namikoshi M, Sivonen K, Evans WR, Carmichael WW, Rouhiainen L, Luukkainen R, Rinehart KL. Structures of three new homotyrosine-containing microcystins and a new homophenylalanine variant from *Anabaena sp.* strain 66. *Chem. Res. Toxicol.* (1992b) 5: 661–666.
- Namikoshi M, Sivonen K, Evans WR, Carmichael WW, Sun F, Rouhiainen L, Luukkainen R, Rinehart KL. Two new L-serine variants of microcystin-LR and –RR from *Anabaena sp.* strain 202 A1 and 202 A2. *Toxicon* (1992c) 30: 1457–1464.
- Namikoshi M, Sivonen K, Evans WR, Sun F, Carmichael WW, Rinehart KL. Isolation and structures of microcystins from a cyanobacterial water bloom (Finland). *Toxicon* (1992d) 30: 1473–1479.
- Namikoshi M, Sun F, Choi BW, Rinehart KL, Carmichael WW, Evans WR, Beasley VR. Seven more microcystins from Homer Lake cells: application of the general method for structure assignment of peptides containing  $\alpha$ ,  $\beta$ -dehydroamino acid unit(s). *J. Org. Chem.* (1995) 60: 3671–3679.
- Namikoshi M, Yuan M, Sivonen K, Carmichael WW, Rinehart KL, Rouhiainen L, Sun F, Brittain S. Seven new microcystins possessing two L-glutamic acid units, isolated from *Anabaena sp.* strain 186. *Chem. Res. Toxicol.* (1998) 11: 143–149.
- Neffling MR, Spool L, Meriluoto J. Rapid LC-MS detection of cyanobacterial hepatotoxins microcystin and nodularins- Comparison of columns. *Anal. Chim. Acta* (2009) 653: 234–241.
- Newcombe G, House J, Ho L, Baker P, Burch M. Management Strategies for Cyanobacteria (Blue-Green Algae): A Guide for Water Utilities. Research Report No 74. Water Quality Research Australia Limited, 2010.
- NHMRC/NRMMC. Australian Drinking Water Guidelines. National Health and Medical Research Council/Natural Resource Management Ministerial Council, Canberra 2004. Nicholson BC, Burch MD. Evolution of analytical methods for determination and quantification of cyanotoxins in relation to Australian drinking water guidelines, a report to the National Health Authority, 2001.
- NICNAS. Potassium perfluorobutane sulfonate. Existing Chemicals Hazard Assessment Report. NICNAS, Department of Health and Ageing, Australian Government, 2005.
- Nishiwaki-Matsushima R, Ohta T, Nishiwaki S, Suganuma M, Kohyama K, Ishikawa T, Carmichael WW, Fujiki H. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* (1992) 118: 420–424.
- NJDEP-Division of Water Supply & Geoscience, 2007. Drinking-water guidance value. State of New Jersey. [http://www.nj.gov/dep/watersupply/pdf/pfoa\\_dwguidance](http://www.nj.gov/dep/watersupply/pdf/pfoa_dwguidance).
- Nuñez O, Gallart-Ayala H, Martins CPB, Lucci P (Eds). Fast Liquid Chromatography- Mass Spectrometry Methods in Food and Environmental Analysis. Imperial College Press, London, 2015.
- Ochoa-Herrera V, Sierra-Alvarez C. Removal of perfluorinated substances by sorption onto granular activated carbon, zeolite and sludge. *Chemosphere* (2008) 72: 1588–1593.

- ODA. Standard for microcystin in blue-green algal health food supplements. Adopted administrative rule 603-025-0190. Oregon Department of Agriculture, Portland, **1997**.
- Oehrle SA, Southwell B, Westrick J. Detection of various freshwater cyanobacterial toxins using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Toxicon* (**2010**) 55: 965–972.
- Ohya T, Kudo N, Suzuki E, Kawashima Y. Determination of perfluorinated carboxylic acids in biological samples by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* (**1998**) 720: 1–7.
- Olsen GW, Burris JM, Mandel JH, Zobel LR. Serum perfluorooctane sulfonate and hepatic and lipid clinical chemistry tests in fluorochemical production employees. *J. Occup. Environ. Med.* (**1999**) 41: 799–806.
- Olsen GW, Burris JM, Burlew MM, Mandel JH. Epidemiologic assessment of worker serum perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) concentrations and medical surveillance examinations. *J. Occup. Environ. Med.* (**2003**) 45: 260–270.
- Olsen GW, Burris JM, Ehresman DJ, Froehlich JW, Seacat AM, Butenhoff JL, Zobel LR. Half-life of serum elimination of perfluorooctanesulfonate, perfluorohexanesulfonate, and perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers. *Environ. Health Perspect.* (**2007**) 115 (9): 1298–1305.
- OMS. WHO Guidelines for drinking-water quality. World Health Organization, Geneva, **1998**.
- OMS. WHO Guidelines for drinking-water quality. World Health Organization, Geneva, **1993**.
- Onghena M, Moliner-Martinez Y, Pico Y, Campíns-Falcó P, Barceló D. Analysis of 18 perfluorinated compounds in river waters: Comparison of highperformance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, ultrahigh-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry and capillary liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* (**2012**) 1244: 88–97.
- Orden PRE/374/2008 por la que se modifica el anexo I del Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y al uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos (sulfonatos de perfluorooctano-PFOS).
- Orr PT, Jones GJ. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited microcystis aeruginosa cultures. *Limnol. Oceanogr.* (**1998**) 43: 1604–1614.
- Orr PT, Jones GJ, Hunter RA, Berger K, Paoli DA, Orr CLA. Ingestion of toxic *Microcystis aeruginosa* by dairy cattle and the implications for microcystin contamination of milk. *Toxicon* (**2001**) 39: 1847–1854.
- Padisák J. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju, an expanding, highly adaptive blue-green algal species: worldwide distribution and review of its ecology. *Arch. Hydrobiol.* (**1997**) 107: 563–593.
- Painuly P, Perez R, Fukai T, Shimizu Y. The structure of a cyclic peptide toxin, cyanogenosin-RR from *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron Lett.* (**1988**) 29: 11–14.
- Pal A, He Y, Jekel M, Reinhard M, Gin KY. Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle. *Environ. Int.* (**2014**) 71: 46-62.

- Pantelic D, Svircev Z, Simeunovic J, Vidovic M, Trajkovic I. Cyanotoxins: Characteristics, production and degradation routes in drinking water treatment with reference to the situation in Serbia. *Chemosphere* (2013) 91: 421–441.
- Park H, Namikoshi M, Brittain SM, Carmichael WW, Murphy T. [D-Leu<sup>1</sup>]microcystin-LR, a new microcystin isolated from waterbloom in a Canadian prairie lake. *Toxicon* (2001) 39: 855–862.
- Park H-D, Sasaki Y, Maruyama T, Yanagisawa E, Hiraishi A, Kato K. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake. *Environ. Toxicol.* (2001) 16: 337–343.
- Paul AG, Jones KC, Sweetman AJ. A first global production, emission, and environmental inventory for perfluorooctane sulfonate. *Environ. Sci. Technol.* (2009) 43(2): 386–392.
- Pérez F, Llorca M, Farré M, Barceló D. Automated analysis of perfluorinated compounds in human hair and urine samples by turbulent flow chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* (2012) 402: 2369–2378.
- Pérez S, Aga DS. Recent advances in the sample preparation, liquid chromatography tandem mass spectrometric analysis and environmental fate of microcystins in water. *Trends Anal. Chem.* (2006) 25(7): 658-670.
- Perfluorooctane Sulfonate: Current Summary of Human Sera, Health and Toxicology Data, USEPA Administrative Record, AR226-0548; 3M Company: St. Paul, MN, 1999.
- Picó Y, Blasco C, Farré M, Barceló D. Occurrence of perfluorinated compounds in water and sediment in L'Albufera Natural Park (Valencia, Spain). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* (2012) 19(4): 946–957.
- Pilotto LS, Douglas RM, Burch MD, Cameron S, Beers M, Rouch GJ, Robinson P, Kirk M, Cowie CT, Hardiman S, Moore C, Attewell RG. Health effects of exposure to cyanobacteria (blue-green algae) during recreational water-related activities, Aust. NZ. *J. Public Health* (1997) 21: 562–566.
- Pistocchi A, Loos R. A map of European emissions and concentrations of PFOS and PFOA. *Environ. Sci. Technol.* (2009) 43: 9237–9244.
- Plumlee MH, Larabee J, Reinhard M. Perfluorochemicals in water reuse. *Chemosphere* (2008) 72: 1541–1547.
- Pobel D, Robin J, Humbert J-F. Influence of sampling strategies on the monitoring of cyanobacteria in shallow lakes: Lessons from a case study in France. *Water Res.* (2011) 45 (3): 1005–1014.
- Poon KF, Lam MHW, Lam PKS, Wong BSF. Microcystin determination in cyanobacterial blooms by SPME. *Environ. Toxicol. Chem.* (2001) 20: 1648–1655.
- POPRC, 2009. Decision POPRC-1/7: Perfluorooctane Sulfonate; UNEP/POPs/POPRC.1/10; Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. <http://chm.pops.int/Convention/POPsReviewCommittee/Reports/tabid/2301/Default.aspx>
- Post GB, Cohn PD, Cooper KR. Perfluorooctanoic acid (PFOA), an emerging drinking water contaminant: a critical review of recent literature. *Environ. Res.* (2012) 116: 93–117.



- Post GB, Louis JB, Cooper KR, Boros-Russo BJ, Lippincott RL. Occurrence and potential significance of PFOA detected in New Jersey public drinking water systems. *Environ. Sci. Technol.* (2009) 43: 4547–4554.
- Prepas EE, Kotak BG, Campell LN, Evans JC, Hrudehy SE, Holmes CFB. Accumulation and elimination of cyanobacterial hepatotoxins by the freshwater clam *Anodonta grandis simpsoniana*. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* (1997) 54: 41–46.
- Prevedouros K, Cousins IT, Buck RC, Korzeniowski SH. Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates. *Environ. Sci. Technol.* (2006) 40: 32–44.
- Propuesta de la Comisión Europea de Directiva del Parlamento Europeo y del Consejo que modifica las Directivas 2000/60/EC y 2008/150/EC en lo que respecta sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas (Directiva Marco del Agua). COM(2011) 876 final 2012.
- Puerto M, Pichardo S, Jos Á, Prieto AI, Sevilla E, Frías JE, Cameán AM. Differential oxidative stress responses to pure Microcystin-LR and Microcystin containing and non-containing cyanobacterial crude extracts on Caco-2 cells. *Toxicon* (2010) 55: 514–522.
- Pyo D, Shin H. Supercritical fluid extraction of microcystins from cyanobacteria. *Anal. Chem.* (1999) 71: 4772–4775.
- Quesada A, Moreno E, Carrasco D, Paniagua T, Wormer L, De hoyos C, Sukenik A. Toxicity of *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanobacteria) in a Spanish water reservoir. *Eur. J. Phycol.* (2006) 41: 39–45.
- Quesada A, Sanchis D, Carrasco D. Cyanobacteria in Spanish reservoirs. How frequently are they toxic? *Limnetica* (2004) 23(1-2): 109–118.
- Qi Y, Rosso L, Sedan D, Giannuzzi L, Andrinolo D, Volmer DA. Seven new microcystin variants discovered from a native *Microcystis aeruginosa* strain – unambiguous assignment of product ions by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (2015) 29: 220–224.
- Quinete N, Wu Q, Zhang T, Hun Yun S, Moreira I, Kannan K. Specific profiles of perfluorinated compounds in surface and drinking waters and accumulation in mussels, fish and dolphins from southeastern Brazil. *Chemosphere* (2009) 77: 863–869.
- Quiñones O, Snyder SA. Occurrence of perfluoroalkyl carboxylates and sulfonates in drinking water utilities and related waters from the United States. *Environ. Sci. Technol.* (2009) 43: 9089–9095.
- Raab U, Albrecht M, Preiss U, Völkel w, Schewegler U, Fromme H. Organochlorine compounds nitro musks and perfluorinated substances in breast milk – Results from Bavarian monitoring of breast milk 2007/8. *Chemosphere* (2013) 93: 461–467.
- Rahman MF, Peldszus S, Anderson WB. Behaviour and fate of perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in drinking water treatment: A review. *Water Research* (2014) 50: 318–340.
- Rand AM, Mabury SA. Perfluorinated Carboxylic Acids in Directly Fluorinated High-Density Polyethylene Material. *Environ. Sci. Technol.* (2011) 45(19): 8053–8059.
- Rapala J, Sivonen K, Luukkainen R, Niemelä S. Anatoxin-a concentration *Anabaena* and *Aphanizomenon* under different environmental conditions and comparison of growth by toxic and non-toxic *Anabaena*-strains — a laboratory study. *J. Appl. Phycol.* (1993) 5: 581–591.

- Rayne S, Forest K. Perfluoroalkyl sulfonic and carboxylic acids: a critical review of physicochemical properties, levels and patterns in waters and wastewaters, and treatment methods. *J. Environ. Sci. Health Part A-Toxic Hazard. Substances Environ. Eng.* (2009) 44 (12): 1145–1199.
- Real Decreto (RD) 140/2003, BOE num. 45, 21 Febrero 2003: 7228–7245.
- Real Decreto (RD) 1341/2007, BOE num. 257, 26 Octubre 2007: 43620–43629.
- Renner R. The long and the short of perfluorinated replacements. *Environ. Sci. Technol.* (2006) 40: 12–13.
- Renner R, Cooney CM, Pelley J, Chatterjee R, Lubick N, Engelhaupt E. News briefs: New Jersey dives into PFOA water guidance. *Environ. Sci. Technol.* (2007) 41: 3394–33401.
- Reglamento 1907/2006/EC relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la Directiva 1999/45/EC y se derogan el Reglamento 793/93/CEE del Consejo y el Reglamento 1488/94/EC de la Comisión así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/EC y 2000/21/EC de la Comisión; L 396/1.
- Reynolds CS. *Vegetation Processes in the pelagic: a model for ecosystem theory. Excellence in Ecology*, Ecology Institute, 1997.
- Reynolds CS. *The Ecology of Phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge, 2006.
- Richard DS, Beattie KA, Codd GA. Toxicity of cyanobacterial blooms from Scottish freshwaters. *Environ. Technol. Lett.* (1983) 4: 377–382.
- Richardson SD. Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal. Chem.* (2008) 80: 4373–4402.
- Richardson SD. Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal. Chem.* (2012) 84(2): 747–78.
- Richardson SD y Ternes TA. Water analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal. Chem.* (2014) 86 (6): 2813–2848.
- Rinehart KL, Harada K-I, Namikoshi M, Chen C, Harvis CS, Munro MHG, Blunt JW, Mulligan PE, Beasley VR, Dahlem AM, Carmichael WW. Nodularin, microcystin, and the configuration of Adda. *J. Am. Chem. Soc.* (1988) 110: 8557–8558.
- Rinehart KL, Namikoshi M, Choi BM. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green-algae (Cyanobacteria). *J. Appl. Phycol.* (1994) 6(2): 159–176.
- Ríos V, Moreno I, Prieto AI, Soria-Díaz ME, Frías JE, Cameán AM. Comparison of Microcystis aeruginosa (PCC7820 and PCC7806) growth and intracellular microcystins content determined by liquid chromatography-mass spectrometry, enzyme-linked immunosorbent assay anti-Adda and phosphatase bioassay. *J. Water Health.* (2014) 12(1): 69–80.
- Rivasseau C, Martins S, Hennion M-C. Determination of some physicochemical parameters of microcystins (cyanobacterial toxins) and trace level analysis in environmental samples using liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* (1998) 799: 155–169.

- Rivasseau C, Vanhoenacker G, Sandra P, Hennion MC. On-line solid-phase extraction in microcolumn-liquid chromatography coupled to UV or MS detection Application to the analysis of cyanobacterial toxins. *J. Microcolumn Sep.* (2000) 12: 323-332.
- Robillot C, Vinh J, Puisieux-Dao S, Henion M-C. Hepatotoxin productions kinetics of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, as determined by HPLC-mass spectrometry and protein phosphatase bioassay. *Environ. Sci. Technol.* (2000) 34: 3372–3378.
- Rodrigues MA, Reis MP, Mateus MC. Liquid chromatography/negative electrospray ionization ion trap MS2 mass spectrometry application for the determination of microcystins occurrence in Southern Portugal water reservoirs. *Toxicon* (2013) 74: 8–18.
- Rodríguez EM, Acero JL, Spoof L, Meriluoto J. Oxidation of MC-LR and -RR with chlorine and potassium permanganate: toxicity of the reaction products. *Water Res* (2008) 42: 1744–1752.
- Roschitz E. Sukzession und Produktion des Phytoplanktons in der Alten Donau vor und nach der Sanierung. Diplomarbeit an der Universität Wien, Vienna, 1996.
- Rosen R. Mass spectrometry for monitoring micropollutants in water. *Curr. Opin. Biotechnol.* (2007) 18: 246-251.
- Rostkowski P, Yamashita N, So IMK, Taniyasu S, Lam PKS, Falandysz J, Lee KT, Kim SK, Khim JS, Im SH, Newsted JL, Jones PD, Kannan K, Giesy JP. Perfluorinated compounds in streams of the Shihwa industrial zone and Lake Shihwa, South Korea. *Environ. Toxicol. Chem.* (2006) 25: 2374–2380.
- Rotander A, Kärrman A, Toms LM, Kay M, Mueller JF, Gómez Ramos MJ. Novel fluorinated surfactants tentatively identified in firefighters using liquid chromatography quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and a case-control approach. *Environ. Sci. Technol.* (2015) 49(4): 2434–2442.
- Ruan T, Lin Y, Wang T, Jiang G, Wang N. Methodology for studying biotransformation of polyfluoroalkyl precursors in the environment. *Trends Anal. Chem.* (2015) 67: 167–178.
- Rumsby PC, McLaughlin C, Hall T. Perfluorooctane sulphonate and perfluorooctanoic acid in drinking and environmental waters. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. A* (2009) 367: 4119–4136.
- Runnegar MT, Kong S, Berndt N. Protein phosphatase inhibition and in vivo hepatotoxicity of microcystins. *Am. J. Phys.* (1993) 265: G224–G230.
- Saito N, Sasaki K, Nakatome K, Harada K, Yoshinaga T, Koizumi A. Perfluorooctane sulfonate concentrations in surface water in Japan. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* (2003) 45: 149–158.
- Saito N, Harada K, Inoue K, Sasaki K, Yoshinaga T, Koizumi A. Perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate concentrations in surface water in Japan. *J. Occup. Health* (2004) 46: 49–59.
- Sánchez-Avila J, Meyer J, Lacorte S. Spatial distribution and sources of perfluorochemicals in the NW Mediterranean coastal waters (Catalonia, Spain). *Environ. Pollut.* (2010) 158: 2833–2840.
- Sano T, Nohara K, Shiraishi F, Kaya K. A method for microdetermination of total microcystin content in waterblooms of cyanobacteria (blue-green algae). *Int. J. Environ. Anal. Chem.* (1992) 49: 163–170.
- Sano T, Kaya K. A 2-amino-2-butenoic acid (Dhb)-containing microcystins isolated from *Oscillatoria agardhii*. *Tetrahedron Lett.* (1995) 36: 8603–8606.

- Sano T, Kaya K. Two new (*E*)-2-amino-2-butenoic acid (Dhb)-containing microcystins isolated from *Oscillatoria agardhii*. *Tetrahedron* (1998) 54: 463–470.
- Sano T, Beattie KA, Codd GA, Kaya K. Two (*Z*)-dehydrobutyrine-containing microcystins from a hepatotoxic bloom of *Oscillatoria agardhii* from Soulseat Loch, Scotland. *J. Nat. Prod.* (1998) 851–853.
- Sano T, Takagi H, Kaya K. A Dhb-microcystin from the filamentous cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. *Phytochemistry* (2004) 65: 2159–2162.
- Sano T, Takagi H, Nagano K, Nishikawa M, Kaya K. Accurate LC-MS analyses for microcystins using per-<sup>15</sup>N-labeled microcystins. *Anal. Bioanal. Chem.* (2011) 399: 2511–2516.
- Sano T, Takagi H, Nishikawa M, Kaya K. NIES certified reference material for microcystins, hepatotoxic cyclic peptide toxins from cyanobacterial blooms in eutrophic water bodies. *Anal. Bioanal. Chem.* (2008) 391: 2005–2010.
- Sano T, Usui T, Ueda K, Osada H, Kaya K. Isolation of New Protein Phosphatase Inhibitors from Two Cyanobacteria Species, *Planktothrix* spp. *J. Nat. Prod.* (2001) 64: 1052–1055.
- Sarazin G, Quiblier-Llobéras C, Bertru G, Brient L, Vezie C, Bernard C, Couté A, Hennion MC, Robillot C, De Marsac NT. First assessment of the toxic risk associated with fresh water cyanobacteria in France: the EFFLOCYA research program. *J. Water Sci.* (2002) 15: 315–326.
- Schaefer CE, Andaya C, Urriaga A, McKenzie ER, Higgins CP. Electrochemical treatment of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) in groundwater impacted by aqueous film forming foams (AFFFs). *J. Hazard. Mat.* (2015) 295: 170–175.
- Schaidler LA, Rudel RA, Ackerman JM, Dunagan SC, Brody JG. Pharmaceuticals, perfluorosurfactants, and other organic wastewater compounds in public drinking water wells in a shallow sand and gravel aquifer. *Sci. Total Environ.* (2014) 468–469: 384–393.
- Schenker U, Scheringer M, MacLeod M, Martin JW, Cousins IT, Hungerbühler K. Contribution of volatile precursor substances to the flux of perfluorooctanoate to the Arctic. *Environ. Sci. Technol.* (2008) 42: 3710–3716.
- Schröder HF. Determination of fluorinated surfactants and their metabolites in sewage sludge samples by liquid chromatography with mass spectrometry and tandem mass spectrometry after pressurised liquid extraction and separation on fluorine-modified reversed-phase sorbents. *J. Chromatogr. A.* (2003) 1020: 131–151.
- Schröder HF, Meesters RJW. Stability of fluorinated surfactants in advanced oxidation processes: a followup of degradation products using flow injection mass-spectrometry, liquid chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–multiple stage mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* (2005) 1082: 110–119.
- Schultz MM, Barofsky DF, Field JA. Fluorinated alkyl surfactants. *Environ. Eng. Sci.* (2003) 20: 487–501.
- Schultz MM, Barofsky DF, Field JA. Quantitative determination of fluorotelomer sulfonates in groundwater by LC–MS/MS. *Environ. Sci. Technol.* (2004) 38: 1828–35.
- Schultz MM, Barofsky DF, Field JA. Quantitative determination of fluorinated alkyl substances by large-volume-injection liquid chromatography tandem mass spectrometry. characterization of municipal wastewaters. *Environ. Sci. Technol.* (2006) 40: 289–295.

- Schultz MM, Higgins CP, Huset CA, Luthy RG, Barofsky DF and Field JA. Fluorochemical mass flows in a municipal wastewater treatment facility. *Environ. Sci. Technol.* (2006) 40: 7350–7357.
- Schürmann A, Dvorak V, Crüzer C, Butcher P, Kaufmann A. False-positive liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmation of sebutylazine residues using the identification points system according to EU directive 2002/657/EC due to a biogenic insecticide in tarragon. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (2009) 23: 1196–1200.
- Senogles P-J, Scott JA, Shaw G, Stratton H. Photocatalytic degradation of the cyanotoxin cylindrospermopsin, using titanium dioxide and UV irradiation. *Water Res.* (2001) 35: 1245–1255.
- Sepulvado JG, Blaine AC, Hundal LS, Higgins CP. Occurrence and fate of perfluorochemicals in soil following the land application of municipal biosolids. *Environ. Sci. Technol.* (2011) 45(19): 8106–8112.
- Sevilla E, Martin-Luna B, Vela L, Bes MT, Fillat MF, Peleato ML. Iron availability affects mcyD expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Environ. Microbiol.* (2008) 10: 2476–2483.
- Shan Y, Shi X, Dou A, Zou C, He H, Yang Q, Zhao S, Lu X, Xu G. A fully automated system with on-line micro solid-phase extraction combined with capillary liquid chromatography–tandem mass spectrometry for high throughput analysis of microcystins and nodularin-R in tap water and lake water. *J. Chromatogr. A* (2011) 1218: 1743–1748.
- Sha M, Xing P, Jiang B. Strategies for synthesizing non-bioaccumulable alternatives to PFOA and PFOS. *Chinese Chem. Lett.* (2015) 26: 491–498.
- Shi X, Du Y, Lam PK, Wu RS, Zhou B. Developmental toxicity and alteration of gene expression in zebrafish embryos exposed to PFOS. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (2008) 230: 23–32.
- Shivakoti BR, Fujii S, Nozoe M, Tanaka S, Kunacheva C. Perfluorinated chemicals (PFCs) in water purification plants (WPPs) with advanced treatment processes. *Water Sci. Technol.* (2010) 10: 87–95.
- Shoeib M, Harner T, M Webster G, Lee SC. Indoor sources of poly- and perfluorinated compounds (PFCS) in Vancouver, Canada: Implications for human exposure. *Environ. Sci. Technol.* (2011) 45(19): 7999–8005.
- Shoeib M, Harner T, Wilford BH, Jones KC, Zhu J. Perfluorinated sulfonamides in indoor and outdoor air and indoor and dust: occurrence, partitioning, and human exposure. *Environ. Sci. Technol.* (2005) 39: 6599–6606.
- Simcik MF, Dorweiler KJ. Ratio of perfluorochemical concentrations as a tracer of atmospheric deposition to surface waters. *Environ. Sci. Technol.* (2005) 39: 8678–8683.
- Sinclair E, Kannan K. Mass loading and fate of perfluoroalkyl surfactants in wastewater treatment plants. *Environ. Sci. Technol.* (2006) 40: 1408–1414.
- Skutlarek D, Exner M, Färber H. Perfluorinated surfactants in surface and drinking waters. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* (2006) 13(5): 299–307.
- Sivonen K. Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycologia* (1996) 35: 12–24.

- Sivonen K, Carmichael WW, Namikoshi M, Rinehart KL, Dahlem AM, Niemela SI. Isolation and characterization of hepatotoxic microcystins homologs from the filamentous fresh-water cyanobacterium *Nostoc sp* Strain-152. *Appl. Environ. Microbiol.* (1990a) 56(9): 2650.
- Sivonen K, Jones GJ. Cyanobacterial toxins. En: Chorus I, Bartram J (Eds.). *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*, E&FN Spon, OMS, London, 1999, 55–124.
- Sivonen K, Leikoski N, Fewer DP, Jokela J. Cyanobactins-ribosomal cyclic peptides produced by cyanobacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2010) 86: 1213–1225.
- Sivonen K, Namihoshi M, Evans WR, Carmichael WW, Sun F, Rouhiainen L, Luukkainen R, Rinehart KL. Isolation and characterization of a variety of microcystins from seven strains of the cyanobacterial genus *Anabaena*. *Appl. Environ. Microb.* (1992a) 58: 2495–2500.
- Sivonen K, Namihoshi M, Evans WR, Färdig M, Carmichael WW, Rinehart KL. Three new microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins from *Nostoc sp.* strain 152. *Chem. Res. Toxicol.* (1992b) 5: 464–469.
- Sivonen K, Namihoshi M, Evans WR, Gromov BV, Carmichael WW, Rinehart KL. Isolation and structures of five microcystins from a Russian *Microcystis aeruginosa* strain CALU 972. *Toxicon* (1992c) 30: 1481–1485.
- Sivonen K, Niemela SI, Niemi RM, Lepistö I, Luoma TH, Rasanen LA. Toxic cyanobacteria (blue-green-algae) in Finnish fresh and coastal waters. *Hydrobiologia* (1990b) 190: 267–275.
- Sivonen K, Skulberg OM, Namihoshi M, Evans WR, Carmichael WW, Rinehart KL. Two methyl ester derivatives of microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins, isolated from *Anabaena flos-aquae* strain CYA 83/1. *Toxicon* (1992d) 30: 1465–1471.
- So MK, Miyake Y, Yeung WY, Hoa YM, Taniyasu S, Rostkowski P, Yamashita N, Zhou BS, Shi XJ, Wang JX, Giesy JP, Yu H, Lam PKS. Perfluorinated compounds in the Pearl River and Yangtze River of China. *Chemosphere* (2007) 68: 2085–2095.
- So MK, Taniyasu S, Yamashita S, Giesy JP, Zheng J, Fang Z, Im SH, Lam PKS. Perfluorinated compounds in coastal waters of Hong Kong, South China, and Korea. *Environ. Sci. Technol.* (2004) 38: 4056–4063.
- So MK, Yamashita N, Taniyasu S, Jiang Q, Giesy JP, Chen K, Lam PKS. Health risks in infants associated with exposure to perfluorinated compounds in human breast milk from Zhoushan, China. *Environ. Sci. Technol.* (2006) 40: 2924–2929.
- Soares RM, Magalhães VF, Azevedo SMFO. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichliade) under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.* (2004) 70: 1–10.
- Sobrino C, Matthiensen A, Vidal S, Galvão H. Occurrence of microcystins along the Guadiana estuary. *Limnetica* (2004) 23(1-2): 133–144.
- Song H-L, Li X-N, Lu X-W, Inamori Y. Investigation of microcystin removal from eutrophic surface water by aquatic vegetable bed. *Ecol. Eng.* (2009) 35: 1589–1598.

- Sottani C, Minoia C. Quantitative determination of perfluorooctanoic acid ammonium salt in human serum by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (2002) 16: 650-654.
- Spoof L, Karlsson K, Meriluoto J. High-performance liquid chromatographic separation of microcystins and nodularin, cyanobacterial peptide toxins, on C18 and amide C16 sorbents. *J. Chromatogr. A* (2001) 909: 225–236.
- Spoof L, Vesterkvist P, Lindholm T, Meriluoto J. Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* (2003) 1020: 105–119.
- Steenland K, Fletcher T, Savitz DA. Epidemiologic evidence on the health effects of perfluorooctanoic acid (PFOA). *Environ. Health Perspect.* (2010) 118 (8): 1100–1108.
- Steenland K, Jin C, MacNeil J, Lally C, Ducatman A, Vieira V, Fletcher T. Predictors of PFOA levels in a community surrounding a chemical plant. *Environ. Health Perspect.* (2009) 117: 1083–1088.
- Steinle-Darling E, Litwiller E, Reinhard M. Effects of sorption on the rejection of trace organic contaminants during nanofiltration. *Environ. Sci. Technol.* (2010) 44 (7): 2592–2598.
- Steinle-Darling E, Reinhard M. Nanofiltration for trace organic contaminant removal: structure, solution, and membrane fouling effects on the rejection of perfluorochemicals. *Environ. Sci. Technol.* (2008) 42 (14): 5292–5297.
- Stewart I, Webb PM, Schluter PJ, Fleming LE, Burns JW, Gantar M, Backer LC, Shaw GR. Epidemiology of recreational exposure to freshwater cyanobacteria – an international prospective cohort study. *BMC Public Health* (2006) 6: 93.
- Stoner RD, Adams WH, Slatkin DN, Siegelman HW. The effects of single L-amino acid substitutions on the lethal potencies of the microcystins. *Toxicon* (1989) 27: 825–828.
- Stotts RR, Namikoshi M, Hascheck WM, Rinehart KL, Carmichael WW, Dahlem AM, Beasley VR. Structural modifications imparting reduced toxicity in microcystin from *Microcystis spp.* *Toxicon* (1993) 31: 783–789.
- Strynar MJ, Lindstrom AB. Perfluorinated compounds in house dust from Ohio and North Carolina, USA. *Environ. Sci. Technol.* (2008) 42 (10): 3751–3756.
- Sweetser PB. Decomposition of organic fluorine compounds by Wickbold oxyhydrogen flame combustion method. *Anal. Chem.* (1956) 28: 1766–1768.
- Swoboda UK, Dow CS, Chaivimol J, Smith N, Pound BP. Alternatives to the mouse bioassay for cyanobacterial toxicity assessment. En Codd GA, Jefferies TM, Keevil CW, Potter E (Eds.). Detection methods for cyanobacterial toxins. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1994, 106-110.
- Szostek B, Prickett KB. Determination of 8:2 fluorotelomer alcohol in animal plasma and tissues by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* (2004) 813: 313–321.
- Szostek B, Pickett KB, Buck RC. Determination of fluorotelomer alcohols by liquid chromatography/tandem mass spectrometry in water. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (2006) 20: 2837-2844.

- Takagi S, Adachi F, Miyano K, Koizumi Y, Tanaka H, Mimura M, Watanabe I, Tanabe S, Kannan K. Perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate in raw and treated tap water from Osaka, Japan. *Chemosphere* (2008) 72: 1409–1412.
- Takagi S, Adachi F, Miyano K, Koizumi Y, Tanaka H, Watanabe I, Tanabe S, Kannan K. Fate of perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate in drinking water treatment processes. *Water Res.* (2011) 45: 3925–3932.
- Takino M, Daishima S, Nakahara T. Determination of perfluorooctane sulfonate in river water by liquid chromatography/atmospheric pressure photoionization mass spectrometry by automated on-line extraction using turbulent flow chromatography. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (2003) 17: 383–390.
- Tanaka, Y., Takenaka, S., Matsuo, H., Kitamori, S., Tokiwa, H., Levels of microcystins in Japanese Lakes. *Toxicol. Environ. Chem.* (1993) 39: 21–27.
- Taniyasu S, Kannan K, So MK, Gulkowska A, Sinclair E, Okazawa T, Yamashita N. Analysis of fluorotelomer alcohols, fluorotelomer acids, and short- and long-chain perfluorinated acids in water and biota. *J Chromatogr A.* (2005) 1093(1-2): 89–97.
- Taniyasu S, Kannan K, Wu Q, Kwok KY, Yeung LW, Lam PK, Chittim B, Kida T, Takasuga T, Tsuchiya Y, Yamashita N. Inter-laboratory trials for analysis of PFOS and PFOA in water samples: Performance and recommendations. *Anal. Chim. Acta.* (2013) 770: 111–120.
- Taniyasu S, Kannan K, Yeung LWY, Kwok KY, Lam PKS, Yamashita N. Analysis of trifluoroacetic acid and other short-chain perfluorinated acids (C2–C4) in precipitation by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Comparison to patterns of long-chain perfluorinated acids (C5–C18). *Anal. Chim. Acta* (2008) 619(2): 221–230.
- Tang CY, Fu QS, Criddle CS, Leckie JO. Effect of flux (transmembrane pressure) and membrane properties on fouling and rejection of reverse osmosis and nanofiltration membranes treating perfluorooctane sulfonate containing wastewater. *Environ. Sci. Technol.* (2007) 41 (6): 2008–2014.
- Tang CY, Fu QS, Robertson AP, Criddle CS, Leckie JO. Use of reverse osmosis membranes to remove perfluorooctane sulfonate (PFOS) from semiconductor wastewater. *Environ. Sci. Technol.* (2006) 40 (23): 7343–7349.
- Taves D. Evidence that there are two forms of fluoride in human serum. *Nature* (1968) 217(133): 1050–1051.
- Taves DR, Grey WS, Brey WS. Organic fluoride in human-plasma - its distribution and partial identification. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (1976) 37(1): 120–120.
- Teixeira MR, Rosa MJ. Comparing dissolved air flotation and conventional sedimentation to remove cyanobacterial cells of *Microcystis aeruginosa*. Part II. The effect of water background organics. *Sep. Purif. Technol.* (2007) 53: 126–134.
- Tencalla FG, Dietrich DR, Schlatter C. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* (1994) 30: 215–224.
- Thevis M, Volmer DA. Recent instrumental progress in mass spectrometry: advancing resolution, accuracy, and speed of drug detection. *Drug Test. Anal.* (2012) 4 (3-4): 242–245.



- Thompson J, Eaglesham G, Reungoat J, Poussade Y, Bartkow M, Lawrence M, Mueller JF. Removal of PFOS, PFOA and other perfluoroalkyl acids at water reclamation plants in South East Queensland Australia. *Chemosphere* (2011) 82: 9–17.
- Tillett D, Dittmann E, Erhard M, von Dohren H, Borner T, Neilan BA. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide–polyketide synthetase system. *Chem. Biol.* (2000) 7: 753–764.
- Tittlemier SA, Pepper K, Edwards L, Torny G. Development and characterization of a solvent extraction–gas chromatographic/mass spectrometric method for the analysis of perfluorooctanesulfonamide compounds in solid matrices. *J. Chromatogr. A* (2005) 1066: 189–195.
- Toft G, Jönsson BAG, Lindh CH, Giwercman A, Spano M, Heederik D, Lenters V, Vermeulen R, Rylander L, Pedersen HS, Ludwicki JK, Zvezdai V, Bonde JP. Exposure to perfluorinated compounds and human semen quality in arctic and European populations. *Hum. Reprod.* (2012) 27: 2532–2540.
- Tolls J, Kloepper-Sams P, Sijm DTHM. Bioconcentration of surfactants – A critical review. *Chemosphere* (1994) 29: 693–717.
- Tolls J, Sijm DTHM. A preliminary evaluation of the relationships between hydrophobicity and bioconcentration for surfactants. *Environ. Toxicol. Chem.* (1995) 14: 1675–1685.
- Tong P, Tang S, He Y, Shao Y, Zhang L, Chen G. Label-free immunosensing of microcystin-LR using a gold electrode modified with gold nanoparticles. *Microchim. Acta* (2011) 173: 299–305.
- Tonk L, Visser PM, Christiansen G, Dittmann E, Snelder E, Wiedner C, Mu LR, Huisman J. The microcystin composition of the cyanobacterium *Planktothrix agardhii* changes toward a more toxic variant with increasing light intensity. *Appl. Environ. Microbiol.* (2005) 71: 5177–5181.
- Törökné AK. A new culture-free microbiotest for routine detection of cyanobacterial toxins. *Environ. Toxicol.* (1999) 14: 466–472.
- Trier X, Granby K, Christensen JH. Tools to discover anionic and nonionic polyfluorinated alkyl surfactants by liquid chromatography–electrospray ionization–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* (2011) 1218: 7094–7104.
- Trojanowicz M, Koc M. Recent developments in methods for analysis of perfluorinated persistent pollutants. *Microchim. Acta* (2013) 180: 957–971.
- Trojanowicz M, Musijowski J, Koc M, Donten MA. Determination of Total Organic Fluorine (TOF) in environmental samples using flow-injection and chromatographic methods. *Anal. Meth.* (2011) 3: 1039–1045.
- Trudel D, Horowitz L, Wormuth M, Scheringer M, Cousins IT, Hungerbühler K. Estimating consumer exposure to PFOS and PFOA. *Risk Anal.* (2008) 28: 251–269.
- Tsuji K, Masui H, Uemura H, Mori Y, Harada K. Analysis of microcystins in sediments using MMPB method. *Toxicon* (2001) 39: 687–692.
- Tsuji K, Watanuki T, Kondo F, Watanabe MF, Nakazawa H, Suzuki M, Uchida H, Harada, K-I. Stability of microcystins from cyanobacteria – IV. Effect of chlorination on decomposition. *Toxicon* (1997) 35: 1033–1041.

- Ueno Y, Nagata S, Tsutsumi T, Hasegawa A, Watanabe MF, Park H-D, Chen G-C, Chen G, Yu S-Z. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in haimen and fusui, endemic areas of primary liver cancer in china, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis* (1996) 17: 1317–1321.
- Ullah S. Improved analytical methods for perfluoroalkyl acids (PFAAs) and their precursors – a focus on human dietary exposure. Department of Applied Environmental Science (ITM), Stockholm University. *Tesis Doctoral* (2013).
- Ullah S, Alsberg T, Berger U. Simultaneous determination of perfluoroalkylphosphonates, carboxylates and sulfonates in drinking water. *J. Chromatogr. A* (2011) 1218: 6388–6395.
- UK Environment Agency (2004) Environmental Risk Evaluation Report: perfluorooctanesulphonate (PFOS).
- UNEP (2008) Consideration of new information on perfluorooctane sulfonate (PFOS). [http://www.unon.org/confss/doc/unep/pops/POPRC\\_04/POPRC\\_4\\_INF\\_17/K0841478%20POPRC-4-INF17.pdf](http://www.unon.org/confss/doc/unep/pops/POPRC_04/POPRC_4_INF_17/K0841478%20POPRC-4-INF17.pdf)
- UNEP. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs). New POPs SC-4/17: listing of perfluorooctane sulfonic acid, its salts and perfluorooctane sulfonyl fluoride. Geneva, Switzerland: UNEP; 2010 [http://chm.pops.int/Implementation/NewPOPs/TheNewPOPs/tabid/672/Default.aspx (accessed 22 February 2013)].
- UNICEF, 2009. Water, sanitation and higiene anual report.
- UN WWAP, 2003. Water for people, water for life (2003); 3rd World Water Forum in Kyoto. Japan. [www.norman-network.net](http://www.norman-network.net).
- USEPA, 2002. Perfluoroalkyl sulfonates; significant new use rule; final and supplemental proposed rule. Federal Register 67, <http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-TOX/2002/March/Day-11/t5747.pdf>
- USEPA, 2006a. United States Environmental Protection Agency. Science Advisory Board Review of EPA's Draft Risk Assessment of Potential Human Health Effects Associated with PFOA and Its Salts, May 30, 2006. /[http://www.epa.gov/sab/pdf/sab\\_06\\_006.pdf](http://www.epa.gov/sab/pdf/sab_06_006.pdf), (Accessed August 16, 2011).
- USEPA, 2006b. PFOA Stewardship Program. Docket EPA-HQ-OPPT-2006-0621.
- USEPA, 2006c. Science Advisory Board Review of EPA's Draft risk assessment of potential human health effects associated with PFOA and its salts. Washington, DC: EPA; [http://yosemite.epa.gov/sab/sabproduct.nsf/A3C83648E77252828525717F004B9099/\$File/sab\_06\_006.pdf]
- USEPA, 2009a. Final Third Drinking Water Contaminant Candidate List (CCL 3). Washington, DC: EPA; [http://www.epa.gov/ogwdw/ccl/pdfs/ccl3\_docs/fs\_cc3\_final.pdf]
- USEPA, 2009c. Long-chain Perfluorinated Chemicals (PFCs)-Action Plan. [http://www.epa.gov/opptintr/existingchemicals/pubs/pfcs\\_action\\_plan1230\\_09.pdf](http://www.epa.gov/opptintr/existingchemicals/pubs/pfcs_action_plan1230_09.pdf)
- USEPA, 2009b. Provisional health advisories for perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS). Washington, DC: EPA; [http://water.epa.gov/action/advisories/drinking/upload/2009\_01\_15\_criteria\_drinking\_pha-PFOA\_PFOS.pdf]

- USEPA, **2010**. United States Environmental Protection Agency. Office of Pollution Prevention and Toxics. 2010/2015 PFOA Stewardship Program. [/http://www.epa.gov/opptintr/pfoa/pubs/stewardship/index.htm](http://www.epa.gov/opptintr/pfoa/pubs/stewardship/index.htm)
- USEPA, **2011a**. Regulatory determinations for the third drinking water contaminant candidate list. In: Stake Holders Meetings, June 16, Washington D.C. <http://water.epa.gov/scitech/drinkingwater/dws/ccl/upload/Preliminary-Regulatory-Determinations-3-June-16th-Public-Meeting-Slides.pdf>
- USEPA. Revisions to the unregulated contaminants monitoring regulations (UCMR3) for public water systems. *Fed. Regist.* (**2011b**) 76 (42): 11713–11737.
- USEPA, **2012a**. New Chemical Review of Alternatives for PFOA and Related Chemicals. <http://www.epa.gov/oppt/pfoa/pubs/altnewchems.html>
- USEPA, **2012b**. United States Environmental Protection Agency. Perfluorooctanoic Acid (PFOA) and Fluorinated Telomers 2011 Annual Progress Reports. Posted February 6, 2012. <http://www.epa.gov/oppt/pfoa/pubs/stewardship/preports5.html>
- USEPA, **2012c**. Emerging Contaminants – Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) and Perfluorooctanoic Acid (PFOA). Emerging Contaminants Fact Sheet – PFOS and PFOA, EPA 505-F-11-002.
- USEPA, **2015**. <http://www2.epa.gov/nutrient-policy-data/guidelines-and-recommendations>.
- USEPA Method 537, **2009**. Determination of selected perfluorinated alkyl acids in drinking water by solid phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS).
- USEPA Method 544, **2015**. Determination of microcystins and nodularin in drinking water by solid phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS).
- Utermöhl H. Zur vervollkommnung der quantitativen-methodik. *Mitt. Int. Ver Theor. Angew Limnol.* (**1958**) 9: 1–38. German.
- Utkilen H, Fastner J, Bartram J. Fieldwork: site inspection and sampling. En: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.). Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. F & FN Spon, London, **1999**, 329-345.
- Valsecchi S, Rusconi M, Polesello S. Determination of perfluorinated compounds in aquatic organisms: A review. *Anal. Bioanal. Chem.* (**2013**) 405: 143–157.
- Van Apeldoorn ME, van Egmond HP, Speijers GJA, Bakker GJI. Toxins of cyanobacteria. *Mol. Nutr. Food Res.* (**2007**) 51: 7–60.
- Vanden Heuvel JP, Kuslikis BI, van Rafelghem MJ, Peterson RE. Tissue distribution, metabolism, and elimination of perfluorooctanoic acid in male and female rats. *J. Biochem. Toxicol.* (**1991**) 6: 83–92.
- Van der Westhuizen AJ, Eloff JN. Toxin extraction from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* by different extraction media. *J. Limnol. Soc. South. Afr.* (**1982**) 8: 76–77.
- Vankateswarlu P. Determination of fluorine in biological materials: A review. *Adv. Dent. Res* (**1994**) 8: 80–86.

- Van Leeuwen SPJ, De Boer J. Extraction and clean-up strategies for the analysis of poly- and perfluoroalkyl substances in environmental and human matrices. *J. Chromatogr. A* (2007) 1153: 172–185.
- Van Leeuwen SPJ, Karrman A, van Bavel B, de Boer J, Lindstrom G. Struggle for Quality in Determination of Perfluorinated Contaminants in Environmental and Human Samples. *Environ. Sci. Technol.* (2006) 40: 7854–7860.
- Van Leeuwen SPJ, Strub M, Cofino W, Lindström G, van Bavel B. Report 11/04, Institute for Environmental Studies (IVM), VU University, Amsterdam, The Netherlands, 2011.
- Van Leeuwen SPJ, Swart CP, van der Veen I, de Boer J. Significant improvements in the analysis of perfluorinated compounds in water and fish: results from an interlaboratory method evaluation study. *J. Chromatogr. A* (2009) 1216: 401–409.
- Vasas G, Gáspár A, Páger C, Surányi G, Máthé C, Hamvas MM, Borbely G. Analysis of cyanobacterial toxins (anatoxin-a, cylindrospermopsin, microcystin-LR) by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* (2004) 25: 108–115.
- Vasconcelos VM. Toxic cyanobacteria (blue-green-algae) in Portuguese fresh-waters. *Arch. Hydrobiol.* (1994) 130: 439-451.
- Vasconcelos VM. Uptake and depuration of the heptapeptide toxin microcystin-LR in *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* (1995) 32: 227–237.
- Vecitis CD, Park H, Cheng J, Mader BT, Hoffmann MR. Treatment technologies for aqueous perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA). *Front. Environ. Sci. Eng. China* 2009 3(2): 129–151.
- Vested A, Ramlau-Hansen CH, Olsen SF, Bonde JP, Kristensen SL, Halldorsson TI, Becher G, Haug LS, Ernst EH, Toft G. Association of in utero exposure to perflurinated alkyl acids with human semen quality and reproductive hormones in adult men. *Environ. Health Perspect.* (2013) 121: 453–458.
- Vestergren R, Berger U, Glynn A, Cousins IT. Dietary exposure to perfluoroalkyl acids for the Swedish population in 1999, 2005 and 2010. *Environ. Int.* (2012b) 49: 120–127.
- Vestergren R, Cousins IT. Tracking the pathways of human exposure to perfluorocarboxylates. *Environ. Sci. Technol.* (2009) 43: 5565-5575.
- Vestergren R, Ullah S, Cousins IT, Berger U. A matrix effect-free method for reliable quantification of perfluoroalkyl carboxylic acids and perfluoroalkane sulfonic acids at low parts per trillion levels in dietary samples. *J. Chromatogr. A.* (2012a) 1237: 64-71.
- Vezie C, Brient L, Sivonen K, Bertru G, Lefeuvre JC, Salkinoja-Salonen M. Variation of microcystin content of cyanobacterial blooms and isolated strains in Lake Grand-Lieu (France). *Microbial Ecol.* (1997) 35: 126–135.
- Via-Ordorika L, Fastner J, Kurmayer R, Hisbergues M, Dittmann E, Komare J, Erhard M, Chorus I. Distribution of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* sp. in European freshwater bodies: detection of microcystins and microcystin genes in individual colonies. *Syst. Appl. Microbiol.* (2004) 27: 592–602.

- Villagrasa M, López de Alda M, Barceló D. Environmental analysis of fluorinated alkyl substances by liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* (2006) 386: 953–972.
- Vilariño N, Louzao MC, Fraga M, Rodríguez LP, Botana LM. Innovative detection methods for aquatic algal toxins and their presence in the food chain. *Anal. Bioanal. Chem.* (2013) 405(24): 7719–7732.
- Wan HT, Leung PY, Zhao YG, Wei X, Wong MH, Wong CKC. Blood plasma concentrations of endocrine disrupting chemicals in Hong Kong populations. *J. Hazard. Mater.* (2013) 261: 763–769
- Wang L, Chen W, Xu D, Shim BS, Zhu Y, Sun F, Liu L, Peng C, Jin Z, Xu C, Kotov NA. Simple, rapid, sensitive, and versatile SWNT-paper sensor for environmental toxin detection competitive with ELISA. *Nano Lett.* (2009) 9: 4147–4152.
- Wang N, Szostek B, Buck RC, Folsom P W, Sulkecki L.M, Capka V, Berti WR, Gannon JT. Fluorotelomer alcohol biodegradation—Direct evidence that perfluorinated carbon chains breakdown. *Environ. Sci. Technol.* (2005a) 39: 7516–7528.
- Wang N, Szoster B, Folsom P W, Sulecki LM, Capka V, Buck RC, Beerti, WR. Gannon J.T. Aerobic biotransformation of <sup>14</sup>C-labeled 8-2 telomer B alcohol by activated sludge from a domestic sewage treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* (2005b) 39: 531–553
- Wang Z, Cousins IT, Scheringer M, Buck RC, Hungerbühler K. Global emission inventories for C4-C14 perfluoroalkyl carboxylic acid (PFCA) homologues from 1951 to 2030, Part I: production and emissions from quantifiable sources. *Environ. Int.* (2014) 70: 62–75.
- Wang Z, Cousins IT, Scheringer M, Hungerbuehler K. Hazard assessment of fluorinated alternatives to long-chain perfluoroalkyl acids (PFAAs) and their precursors: Status quo, ongoing challenges and possible solutions. *Environ. Int.* (2015) 75: 172–179.
- Washington JW, Naile JE, Jenkins TM, and Lynch DG. Characterizing fluorotelomer and polyfluoroalkyl substances in new and aged fluorotelomer-based polymers for degradation studies with GC/MS and LC/MS/MS. *Environ. Sci. Technol.* (2014) 48 (10): 5762–5769.
- Watanabe MF, Oishi S, Harada K-I, Matsuura K, Kawai H, Suzuki M. Toxins contained in *Microcystis* species of cyanobacterium (blue-green algae). *Toxicol* (1988) 26: 1017–1025.
- Webb K, Bristow AWT, Sargent M, Stein B. Methodology for Accurate Mass Measurement of Small Molecules. Best Practice Guide, LGC Ltd., London, 2004.
- Weiss JM, van der Veen I, van Leeuwen SPJ, Cofino W, Crum S, de Boer J. Analytical improvements shown over four interlaboratory studies of perfluoroalkyl substances in environmental and food samples. *Trends Anal.Chem.* (2013) 43: 204–216.
- Welker M, Fastner J, Erhard M, von Döhren H. Applications of MALDI-TOF analysis in cyanotoxin research. *Environ. Toxicol.* (2002) 17(4): 367–374.
- Weckesser J, Drews G, Mayer H. Lipopolysaccharides of photosynthetic prokariotes. *Annu. Rev. Microbiol.* (1979) 33: 215–239.
- Weiß O, Wiesmüller GA, Bunte A, Göen T, Schmidt CK, Wilhelm M, Hölzer J. Perfluorinated compounds in the vicinity of a fire training area — human biomonitoring among 10 persons drinking water from contaminated private wells in Cologne, Germany. *Int. J. Hyg. Environ. Health* (2012) 215: 212–215.

- Wille K, Bussche JV, Noppe H, De Wulf E, Van Caeter P, Janssen CR, De Brabander HF, Vanhaecke L. A validated analytical method for the determination of perfluorinated compounds in surface-, sea- and sewage water using liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* (2010) 1217 (43): 6616–6622.
- Wilhelm M, Bergmann S, Dieter HH. Occurrence of perfluorinated compounds (PFCs) in drinking water of North-Rhine-Westphalia, Germany and new approach to assess drinking water contamination by shorter-chained C4–C7 PFCs. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* (2010) 213: 224–232.
- Wilhelm M, Kraft M, Rauchfuss K, Holzer J. Assessment and management of the first German case of a contamination with perfluorinated compounds (PFC) in the region Sauerland, North Rhine Westphalia. *J. Toxicol. Environ. Health A* (2008) 71: 725–733.
- Williams DE, Dawe SC, Kent ML, Andersen RJ, Craig M, Holmes CFB. Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, *Mytilus edulis*, and in vivo evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues. *Toxicon* (1997) 35: 1617–1625.
- Wilson SR, Malerød H, Holm A, Molander P, Lundanes E, Greibrokk T. On-line SPE–nano-LC–nanospray-MS for rapid and sensitive determination of perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate in river water. *J. Chromatogr. Sci.* (2007) 45: 146–152.
- Wode F, van Baar P, Dünnbier U, Hecht F, Taute T, Jekel M, Reemtsma T. Search for over 2000 current and legacy micropollutants on a wastewater infiltration site with a UPLC-high resolution MS target screening method. *Water Res.* (2015) 69(1): 274–283.
- Wode F, Reilich C, van Baar P, Dünnbier U, Jekel M, Reemtsma T. Multiresidue analytical method for the simultaneous determination of 72 micropollutants in aqueous samples with ultra high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* (2012) 1270: 118–26.
- Wójcik L, Szostek B, Maruszak W, Trojanowicz M. Separation of perfluorocarboxylic acids using capillary electrophoresis with UV detection. *Electrophoresis* (2005) 26: 1080–1088.
- Wójcik L, Korczak K, Szostek B, Trojanowicz M. Separation and determination of perfluorinated carboxylic acids using capillary zone electrophoresis with indirect photometric detection. *J. Chromatogr. A* (2006) 1128: 290–297.
- Wood SA, Mountfort D, Selwood AI, Holland PT, Puddick J, Cary SC. Widespread distribution and identification of eight novel microcystins in Antarctic cyanobacterial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* (2008) 74(23): 7243–7251.
- Wörmer L, Cirés S, Quesada A. Importance of natural sedimentation in the fate of microcystins. *Chemosphere* (2011) 82: 1141–1146.
- WSC, 2009. Joint statement of the 13th meeting of the world semiconductor council. <http://www.eeca.eu/data/File/ESIA%20WSC/Beijing%202009%20WSC%20Joint%20Statement%20Final.pdf>
- Xiao F, Halbach TR, Simcik MF, Gulliver JS. Input characterization of perfluoroalkyl substances in wastewater treatment plants: source discrimination by exploratory data analysis. *Water Res.* (2012a) 46: 3101–3109.
- Xiao F, Simcik MF, Gulliver JS. Perfluoroalkyl acids in urban stormwater runoff: influence of land use. *Water Res.* (2012b) 46: 6601–6608.

- Xiao F, Simcik MF, Gulliver JS. Mechanisms for removal of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) from drinking water by conventional and enhanced coagulation. *Water Res.* (2013) 47: 49–56.
- Xiao F, Simcik MF, Halbach TR, Gulliver JS. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in soils and groundwater of a U.S. metropolitan area: Migration and implications for human exposure. *Water Res.* (2015) 72: 64–74.
- Yamaguchi M, Arisawa K, Uemura H, Katsuura-Kamano S, Takami H, Sawachika F, Nakamoto M, Juta T, Toda E, Mori K, Hasegawa M, Tanto M, Shima M, Sumiyoshi Y, Morinaga K, Kodama K, Suzuki T, Nagai M, Satoh H. Consumption of Seafood, Serum Liver Enzymes, and Blood Levels of PFOS and PFOA in the Japanese Population. *J. Occup. Health.* (2013) 55(3): 184-194.
- Yamashita N, Kannan K, Taniyasu S, Horii Y, Okazawa T, Petrick G, Gamo T. Analysis of perfluorinated acids at parts-per-quadrillion levels in seawater using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* (2004) 38(21): 5522–5528.
- Yamashita N, Kannan K, Taniyasu S, Horii Y, Petrick G, Gamo T. A global survey of perfluorinated acids in oceans. *Mar. Pollut. Bull.* (2005) 51: 658–668.
- Yamashita N, Kannan K, Taniyasu S, So MK, Okazawa T, Lam PKS. The inter-laboratory trial of PFOS and PFOA measurements in water samples (ISO/TC14/SC2/WG56). *Organohalogen Compd.* (2007) 69: 990–993.
- Yen H-K, Lin T-F, Liao, P-C. Simultaneous detection of nine cyanotoxins in drinking water using dual solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicon* (2011) 58: 209–218.
- Yeung LWY, Miyake Y, Li P, Taniyasu S, Kannan K, Guruge KS, Lam PKS, Yamashita N. Comparison of total fluorine, extractable organic fluorine and perfluorinated compounds in the blood of wild and perfluorooctanoate (PFOA)-exposed rats: evidence for the presence of other organofluorine compounds. *Anal. Chim. Acta* (2009) 635: 108–114.
- Ylinen M, Hanhijarvi H, Peura P, Ramo O. Quantitative gas chromatographic determination of perfluorooctanoic acid as the benzyl ester in plasma and urine. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* (1985) 14: 713–717.
- Yoo RS, Carmichael WW, Hoehn RC, Hruday SE. Cyanobacterial (blue-green Algal) Toxins: A Resource Guide. AWWA Research Foundation and American Water Works Association (Eds). Denver, 1995.
- Yoo H, Washington JW, Jenkins TM, Ellington JJ. Quantitative determination of perfluorochemicals and fluorotelomer alcohols in plants from biosolid-amended fields using LC/MS/MS and GC/MS. *Environ. Sci. Technol.* (2011) 45(19): 7985–7990.
- Yu J, Hu J, Tanaka S, Fujii S. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in sewage treatment plants. *Water Res.* (2009a) 43: 2399–2408.
- Yu HW, Lee J, Kim S, Nguyen GH, Kim IS. Electrochemical immunoassay using quantum dot/antibody probe for identification of cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR. *Anal. Bioanal. Chem.* (2009b) 394: 2173–2181.
- Yu N, Wang X, Zhang B, Yang J, Li M, Li J, Shi W, Wei S, Yu H. Distribution of perfluorooctane sulfonate isomers and predicted risk of thyroid hormonal perturbation in drinking water. *Water Res.* (2015) 76: 171–180.

- Yu Q, Zhang R, Deng S, Huang J, Yu G. Sorption of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate on activated carbons and resin: kinetic and isotherm study. *Water Res.* (2009c) 43: 1150–1158.
- Yuan M, Namikoshi M, Otsuki A, Rinehart KL, Sivonen K, Watanabe MF. Low-energy collisionally activated decomposition and structural characterization of cyclic heptapeptide microcystins by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 34 (1999a) 33–43.
- Yuan M, Namikoshi M, Otsuki A, Watanabe MF, Rinehart KL. Electrospray ionization mass spectrometric analysis of microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins: modulation of charge states and  $[M+H]^+$  to  $[M+Na]^+$  ratio. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* (1999b) 10: 1138–1151.
- Zegura B, Sedmak B, Filipic M. Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicol.* (2003) 41: 41–48.
- Zushi Y, Hogarh JN, Masunaga S. Progress and perspective of perfluorinated compound risk assessment and management in various countries and institutes. *Clean. Tech. Environ. Policy* (2012) 14(1): 9–20.
- Zhang J, Lei J, Xu C, Ding L, Ju H. Carbon nanohorn sensitized electrochemical immunosensor for rapid detection of microcystin-LR. *Anal. Chem.* (2010) 82: 1117–1122.
- Zhang L, Luo X, Niu Z, Ye X, Tang Z, Yao P. Rapid screening and identification of multi-class substances of very high concern in textiles using liquid chromatography-hybrid linear ion trap orbitrap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* (2015) 1386: 22–30.
- Zhang L, Ping X, Yang Z. Determination of microcystin-LR in surface water using high-performance liquid chromatography/tandem electrospray ionization mass detector. *Talanta* (2004) 62: 191–198.
- Zhou Q, Chen M, Zhu L, Tang H. Determination of perfluorinated carboxylic acids in water using liquid chromatography coupled to a corona-charged aerosol detector. *Talanta* (2015) 136: 36–41.
- Zweigenbaum JA, Henion JD, Beattie KA, Codd GA, Poon GK. Direct analysis of microcystins by microbore liquid chromatography electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2000) 23: 723–733.





**ANEXO A**

---

**SOP. ANALYSIS OF MICROCYSTINS BY ON-LINE SOLID PHASE EXTRACTION-LIQUID  
CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY**



**SOP. Analysis of microcystins by on-line solid phase extraction-liquid chromatography tandem mass spectrometry,**

in *CYANOCOST - Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*

Cintia Flores and Josep Caixach, Mass Spectrometry Laboratory/Organic Pollutants, IDAEA-CSIC, Barcelona, Spain.

## **1 Introduction**

High-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) has been widely used to analyse microcystins for its robust quantitative analysis and good sensitivity and specificity (Meriluoto and Codd, 2005). The routine analysis of aqueous samples for microcystins requires a sample extraction, concentration and clean-up. A variety of techniques have been reported for this purpose and among them, solid phase extraction (SPE) is the most commonly used (Meriluoto and Codd, 2005). On-line SPE-HPLC allows a fast and reliable approach to the monitoring of trace pollutants in water and has been also been applied to the matrix removal and pre-concentration of microcystins from water samples prior to HPLC (Beltrán et al., 2012; Lee y et al., 1999; Rivasseau et al., 2000; Shan et al., 2011). In summary, on-line SPE offers practical advantages over off-line methods: low amounts of sample required and solvent consumption; reduction of analysis times and sample manipulation (no contamination or loss of sample occurs during the treatment steps); improvement of the sample throughput; excellent precision and accuracy; and automation of the method. Additionally, HPLC method for on-line trace enrichment carried out by means of column switching technique is very simple, easily configured and allows the reduction in the analysis expenses. On the other hand, tandem mass spectrometry provides high sensitivity, specificity and selectivity, large versatility of MS/MS experiments and robust quantitative analysis. In particular the selected reaction monitoring (SRM) mode by triple quadrupole instruments offers high signal-to-noise ratio and an improved accuracy and reproducibility of quantitation.

The aim of this standard operating procedure (SOP) is to describe the general systematic followed for the analysis of microcystins in aqueous samples by on-line SPE HPLC-ESI-MS/MS in SRM quantitation mode. This SOP applies to aqueous samples -surface, treated and drinking waters- for analysis of microcystin (especially microcystin-LR, -RR and -YR, but also demethylated-microcystin-RR and microcystin-LA, -LF, -LR, -LW, -LY, -RR, -WR ad -YR). The range of concentrations for all analytes is 0.02 to 10 µg/L.

## **2 Experimental**

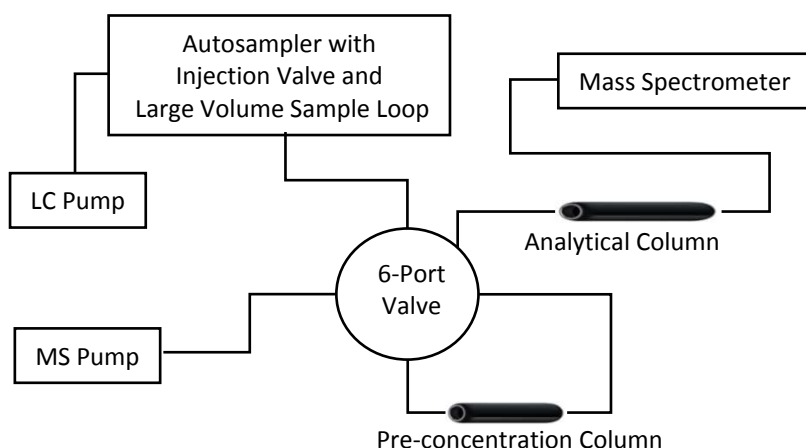
### **2.1 Materials**

- High purity water produced with a Milli-Q system.
- Acetonitrile gradient HPLC grade.
- Formic acid (HCOOH), analytical grade.

- L(+)-ascorbic acid, analytical grade.
- Argon or nitrogen, 99.999% purity.
- GF/F filters (0.7  $\mu\text{m}$ ).
- C<sub>18</sub> endcapped HPLC column (Luna C<sub>18</sub> (2) 150  $\times$  2.0 mm, 5  $\mu\text{m}$  particle size, from Phenomenex, Torrance, CA, USA, is mentioned in this SOP as possible alternative). A compatible guard column is also required.
- C<sub>18</sub> load column (like Hypersil Gold C<sub>18</sub> 20  $\times$  2.1 mm, 12  $\mu\text{m}$  particle size, from Thermo Scientific, Bellefonte, PA, USA).
- Pyrex borosilicate glass bottles.
- Borosilicate glass chromatographic vials: e.g. 10 mL clear glass.
- Microcystin (MC) and nodularin (NOD) standards.

## 2.2 Special equipment

- On-line SPE HPLC-ESI-MS/MS system consists of an autosampler, two high-pressure or low-pressure pump systems and one switching device unit (six-port valve). All connected to triple quadrupole mass spectrometer equipped with an electrospray ionisation (ESI) source as shown in Figure SOP1. Two columns are used, load and HPLC columns, the former for pre-concentration of the sample and the latter for the analytical analysis.
- HPLC-MS analysis software.
- Filtering system.



**Figure SOP1:** Scheme of on-line SPE HPLC-ESI-MS/MS system device connections.

## 2.3 HPLC mobile phase

- HPLC mobile phase component A: HPLC or Milli Q water + 0.08% HCOOH.
  - i. Add 1600  $\mu\text{L}$  of HCOOH in 2 L of water.
  - ii. Replace every week.
- HPLC mobile phase component B: acetonitrile + 0.08% HCOOH.
  - i. Take 850  $\mu\text{L}$  of HCOOH in a borosilicate glass vial. Add 800  $\mu\text{L}$  of HCOOH in 1 L of ACN. Discard the rest of the HCOOH.
  - ii. Replace every week.

Please observe the following:

Work in fume hood with HCOOH or acetonitrile.

Dispense the HCOOH under the surface of acetonitrile.

Do not contaminate the original HCOOH bottle with acetonitrile.

Disposal of acetonitrile and HCOOH should conform to local regulations.

## 2.4 On-line SPE HPLC-ESI-MS/MS analysis

### 2.4.1 General procedure

*Sample Preparation.*

- (a) *Filtration:* Filter the water samples through the GF/F filters if it contains particulates or cyanobacterial cells. Collect the water samples in Pyrex borosilicate glass bottles and immediately place in darkness at 4°C until analyses (typically within 48 h of collection). Stored aqueous and sestonic (defined as the particles retained on 0.7  $\mu\text{m}$  filters) fractions are analysed separately. The analysis of sestonic fraction is not subject of this SOP.
- (b) *Removing chlorine residual:* Chlorinated waters are usually treated with ascorbic acid or sodium thiosulphate before pre-concentration in order to prevent the further degradation of microcystins. Quench with ascorbic acid those samples containing residual chlorine such as treated waters (2 mL/L ascorbic acid per 2 ppm  $\text{Cl}_2$ ).
- (c) *Internal standard addition:* Spike 10 mL of filtered water samples with nodularin as internal standard to obtain a final concentration of 1  $\mu\text{g/L}$  (10  $\mu\text{L}$  at 1 mg/L) and then process directly using the on-line SPE HPLC-ESI-MS/MS system.

*Set up HPLC.* The HPLC system should be set up according to good HPLC practice: e.g., unnecessary dead volumes should be avoided and the mobile phases should be degassed. All

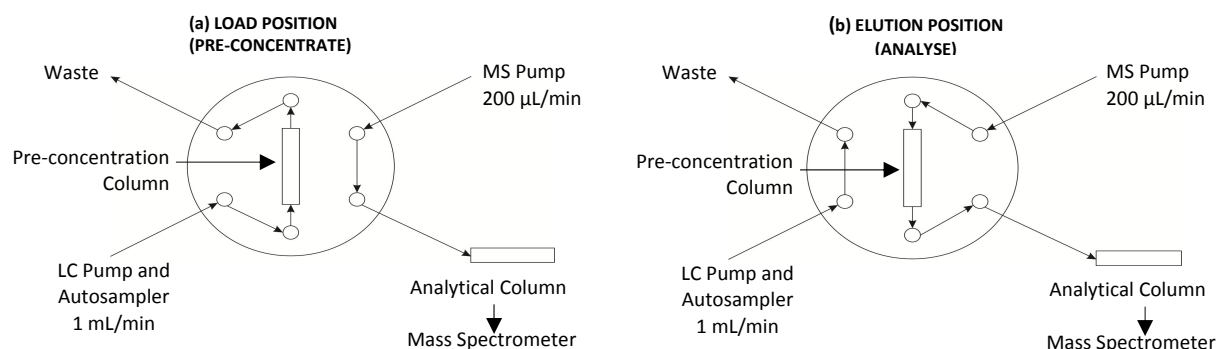
components and parameters should be monitored and documented. Always use a guard column. Change the guard column if the back-pressure rises or peak forms deteriorate. Change the HPLC gradually up to starting conditions and allow to condition. The flow is directed to waste while conditioning.

*Set up MS.* The MS instrument with the ESI source should be set up and tuned as described in the manufacturer instructions. The following ionisation parameters are given just as an example for one triple quadrupole instrument (Thermo Fisher Scientific TSQ Quantum Discovery, San Jose, CA, USA) in the analysis of microcystins. REMEMBER: EVERY INSTRUMENT MODEL MUST BE TUNED INDIVIDUALLY since the resulting optimal parameters may be slightly different on distinct systems even as the same model. The analyses are performed operating in the positive ESI (+) mode. Examples of ionisation parameters: spray voltage 4.5 kV, optimum tube lens voltage (TL) for each  $m/z$ , ion transfer tube temperature 250 °C, sheath gas (N<sub>2</sub>), ion sweep gas (N<sub>2</sub>) and auxiliary gas (N<sub>2</sub>) flow rates 30 psi, 0 and 5 a.u. (arbitrary units), respectively. Scan, SIR or SRM acquisition modes can be applied depending on the purpose of analyses. High purity Ar is used as collision-induced gas with a pressure of 1.5 mtorr and the optimum collision energy (CE) for each transition is selected. For a reliable quantitation by tandem mass spectrometry, SRM acquisition mode must be chosen, and two transitions, one for quantitation and a second one for confirmation, for each compound should be monitored to avoid false positives due to matrix interferences in complex samples. A relation between transitions is calculated (Commission Decision 2002/657/CE). Table SOP1 shows the MS/MS conditions of some typical microcystins.

**Table SOP1.** MS/MS conditions of some typical microcystins.

Compound	Precursor Ion ( $m/z_1$ )	State of molecular ion	Tube Lens (V)	Product Ion ( $m/z_2$ )	Collision Energy (eV)
Microcystin-RR	519.7	[M+2H] <sup>2+</sup>	137	127.0	41
				135.1	28
Nodularin	825.3	[M+H] <sup>+</sup>	225	135.1	50
				227.1	50
Microcystin-LR	995.5	[M+H] <sup>+</sup>	236	135.1	55
				213.1	45
Microcystin-YR	1045.5	[M+H] <sup>+</sup>	224	135.1	57
				213.1	40

*Automatic on-line SPE HPLC-ESI-MS/MS analysis.* Briefly, 1 mL of water sample is injected directly onto load column (pre-concentration) in a high aqueous mobile phase (95%) at a flow rate of 1 mL/min (Figure SOP2a). Afterwards, the six-port valve on the mass spectrometer is switched by instrument control software. This enabled the load column to be back flushed onto the analytical column, where the compounds are separated prior the introduction into the mass spectrometer (Figure SOP2b). After all compounds are eluted from the analytical column, the six-port valve is switched back to the starting position, and the loading and analytical columns are re-equilibrated to their starting conditions. After separation, detection is carried out using a triple quadrupole mass spectrometer equipped with an ESI source.



**Figure SOP2.** Six-port valve positions during on-line SPE analysis: (a) load position for pre-concentrate; and (b) elution position for analyse.

*Analysis of data.* For identification purposes comply with the following conditions:

- i. Analyte retention time in the sample compared to analyte retention time in the calibration curve should be in agreement (the ratio of the chromatographic retention time of the analyte to that of the internal standard, shall correspond to that of the calibration solution at a tolerance of  $\pm 2.5$  according Commission Decision 2002/657/EC).
- ii. Two  $m/z$  transitions are confirmed for every analyte (Table SOP1).
- iii. The ratio between the area of two transitions in the sample compared to ratio in the calibration curve should be in agreement to [calibration curve average  $\pm$  SD (calibration curve)] taking into account the maximum tolerances included in the Commission Decision 2002/657/EC.

For quantitation purposes calculate the microcystin concentration according to internal calibration based on isotope dilution using nodularin as internal standard (IS). As there are no isotopically labelled microcystins commercially available, nodularin is currently used as internal standard (2.4.1c).

- (a) Prepare a set of standard solutions ( $n \geq 5$ ) for microcystin mixture (analytes) as calibration curve method, and add a constant amount of nodularin (IS) to each solution.
- (b) Prepare a plot of (area quantitation transition analyte/area quantitation transition IS) versus analyte concentration for each microcystin. The quantitation transition is chosen as the most specific, selective and intense of two transitions monitored.

*Quality control.* Blank samples to test the specificity of the method and blank spikes should be used as quality controls.

- i. A blank sample should always be extracted with every batch of samples showing good repeatability for the method.



- ii. Instrumental blanks (Milli Q water) should be injected between samples and three additional blanks should be injected after the most concentrated calibration standard solution in order to avoid cross talking between injections.
- iii. To check the recoveries in all samples, the recovery of nodularin, added before extraction, may be calculated.
- iv. To evaluate possible changes in sensitivity during the sample sequence and ensure a proper quantitation, a fortified sample of medium concentration (1 µg/L) are injected and quantified like a sample. If the calculated concentration using the calibration curve is not consistent with the theoretical and a tolerance of 25%, re-inject the calibration curve.
- v. External quality assurance may be evaluated by participation in intercomparison exercises.

#### 2.4.2 On-line SPE HPLC-ESI-MS/MS chromatograms of microcystins on isocratic mode: Suitable for samples of medium complexity

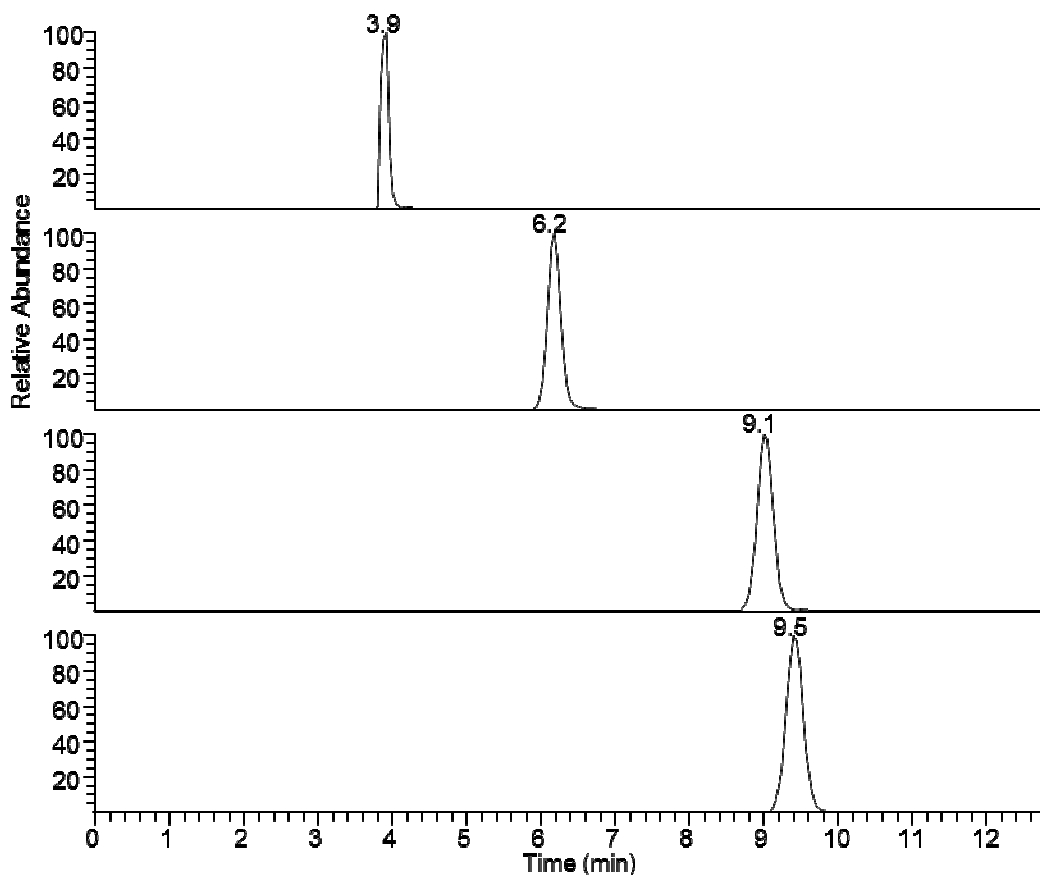
Do not use unnecessarily long HPLC gradients with easy samples. The use of an isocratic mode saves time and solvents.

**Table SOP2.** Suggested gradient programme and operation mode of switching valve for C<sub>18</sub> load column like Thermo Hypersil Gold C<sub>18</sub> 20 × 2.1 mm, 12 µm particle size by Thermo Electron's EQUAN environmental quantitation on-line SPE HPLC-ESI-MS/MS system. Linear gradient at a flow rate of 1 mL/min. Injection cycle about 22 minutes.

Time (min)	Switching valve mode	Flow (mL/min)	%A	%B
0	Loading	1	95	5
1.2		1	95	5
2.0	Eluting	1	95	5
2.2		0	95	5
13.0	Loading	0	95	5
14.9		0	95	5
15.0		1	5	95
16.0		1	5	95
16.1		1	95	5
22.0		1	95	5

**Table SOP3.** Suggested isocratic programme at flow rate of 200 µL/min, for an analytical column like Phenomenex Luna C<sub>18</sub> (2) 150 × 2.0 mm, 5 µm particle size. Injection cycle about 22 minutes.

Time(min)	%A	%B
0	70	30
22	70	30



**Figure SOP3.** On-line SPE HPLC-ESI-MS/MS chromatograms of microcystin extracted SRM traces from a standard mixture of 100 ng/L (-RR, -YR and -LR and nodularin) on an isocratic mode. Load column: Thermo Hypersil Gold C<sub>18</sub> 20 × 2.1 mm, 12 μm particle size and analytical column: Phenomenex Luna C<sub>18</sub> (2) 150 × 2.0 mm, 5 μm particle size. Retention times: MC-RR (3.9 min.); NOD (6.2 min.); MC-YR (9.1 min.) and MC-LR (9.5 min.). The total time is 11 min. for the analysis of MC-LR, -RR and -YR and 22 min. including pre-equilibration process.

#### 2.4.3 On-line SPE HPLC-ESI-MS/MS chromatograms of microcystins on elution gradient: suitable for complex samples.

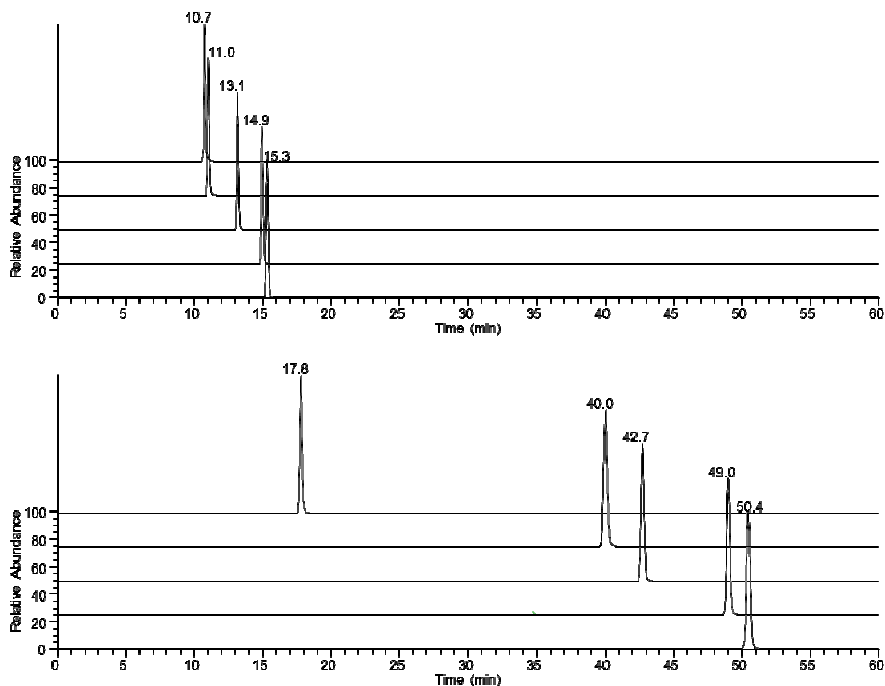
Complex field or strain samples may require the use of a long elution gradient and thus be able elucidate the toxin profile (Flores and Caixach, 2015).

**Table SOP4:** Suggested gradient programme and operation mode of switching valve for C<sub>18</sub> load column like Thermo Hypersil Gold C<sub>18</sub> 20 × 2.1 mm, 12 µm particle size by Thermo Electron's EQuan environmental quantitation on-line SPE HPLC-ESI-MS/MS system. Linear gradient at a flow rate of 1 ml min<sup>-1</sup>. Injection cycle about 70 minutes.

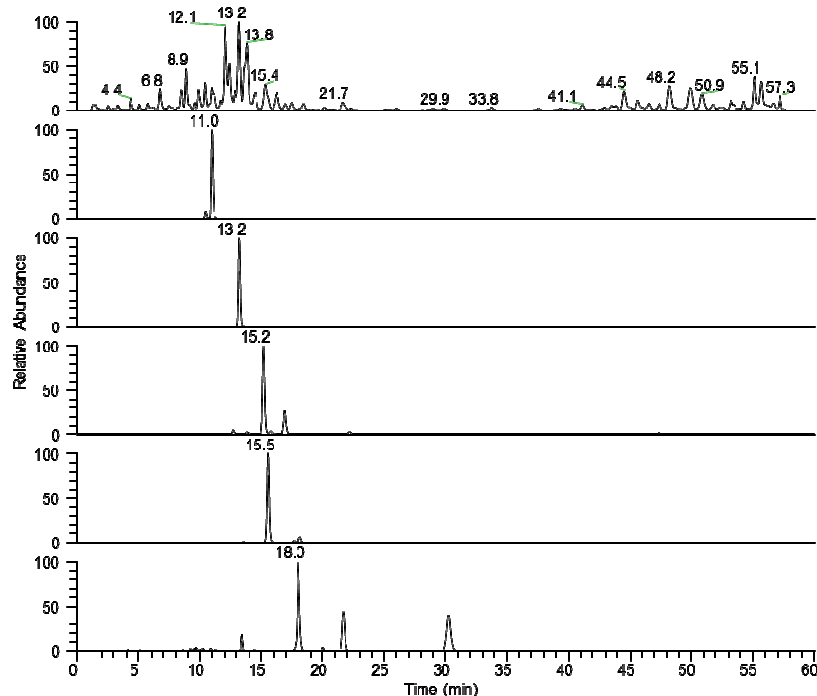
Time (min)	Switching valve mode	Flow (mL/min)	%A	%B
0	Loading	1	95	5
1.2		1	95	5
2.0	Eluting	1	95	5
2.2		0	95	5
63.4		0	95	5
64.9		0	95	5
65.0	Loading	1	5	95
66.0		1	5	95
66.1		1	95	5
70.0		1	95	5

**Table SOP5.** One possible gradient programme for an analytical column like Phenomenex Luna C<sub>18</sub> (2) 150 × 2.0 mm, 5 µm particle size. Linear gradient at a flow rate of 200 µL/min. Injection cycle about 70 minutes.

Time(min)	%A	%B
0	90	10
2.0	90	10
12.0	70	30
32.0	65	35
47.0	45	55
52.0	45	55
54.0	10	90
57.0	10	90
57.1	90	10
70.0	90	10



**Figure SOP4.** Overlaid extracted SRM traces of microcystins from a mixture of commercial standards at 100 ng/L by on-line SPE HPLC-ESI-MS/MS analysis using an elution gradient. Load column: Thermo Hypersil Gold C<sub>18</sub> 20 × 2.1 mm, 12 μm particle size and analytical column: Phenomenex Luna C<sub>18</sub> (2) 150 × 2.0 mm, 5 μm particle size. Retention times: dm-MC-RR (10.7 min.); MC-RR (11.0 min.); nodularin (13.1 min.); MC-YR (14.9 min.); MC-LR (15.3 min.); MC-WR (17.8 min.); MC-LA (40.0 min.); MC-LY (42.7 min.); MC-LW (49.0 min.) and MC-LF (50.4 min.). The total analysis time is 70 min. including pre-equilibration process.



**Figure SOP5.** On-line SPE HPLC-ESI-MS/MS total ion and SRM extracted chromatograms of microcystins detected in a natural bloom sample using an elution gradient. The different microcystin concentrations ranging from 0.1 to 15 μg/L. Load column: Thermo Hypersil Gold C<sub>18</sub> 20 × 2.1 mm, 12 μm particle size and analytical column: Phenomenex Luna C<sub>18</sub> (2) 150 × 2.0 mm, 5 μm particle size. Retention times: MC-RR (11.0 min.); nodularin (internal standard) (13.2 min.); MC-YR (15.2 min.); MC-LR (15.5 min.) and MC-WR (18.0 min.). The total analysis time is 70 min. including pre-equilibration process.

**N. B.** The reader is also advised to follow up the development of the ISO 20179:2005 standard method for microcystin analysis.

### 3 Validation

i. *Linearity:* As quantitation of analytes is performed using the internal calibration method, calibration standard solutions of microcystins in a properly range (covering WHO maximum guideline level, 1 µg/L) at different concentration levels ( $n \geq 5$ ) should be prepared daily with nodularin as internal standard and should be subjected to the overall on-line procedure. Levels between 0.02 and 10 µg/L ( $n = 7$ ) with nodularin, 1 µg/L, have been tested. All microcystins have shown satisfactory linearities with  $r^2$  values higher than 0.98 and residuals lower than 25%.

ii. *Matrix effect:* Calibration standards solutions in three different matrices: drinking, surface and bottled water have been prepared, obtaining equivalent calibration curves for the three matrices. Therefore, it can be concluded that there is no matrix effect in these cases. The validation study has been conducted in bottled water.

iii. *Method accuracy and precision:* Recovery experiments ( $n \geq 3$ ) using several matrix samples (for example surface and drinking water) spiked at two or three concentration levels (low, medium and high concentrations) should be performed to evaluate method accuracy and precision. The calculated recoveries should be in the 50 - 130 % range, and precision can be considered acceptable if relative standard deviations (RSDs) are lower than 25%.

iv. *Limit of quantitation (LOQ) and limit of detection (LOD):* The lowest validated level (0.02 µg/L) of linear interval may be considered the LOQ. And the LOD may be estimated for a signal-to-noise (S/N) ratio equal to 3 from the chromatograms of the samples spiked at the lowest validated level.

Table SOP6 presents a summary of the main analytical parameters validated for some typical microcystins.

**Table SOP6.** Validation parameters.

Compound	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	% Recovery			Precision (% RSD)	
			0.02 µg/L	1 µg/L	10 µg/L	1 µg/L	
						Interday (n = 5)	Intraday (n = 5)
Microcystin-LR	6.0	20	101	102	94	17	9
Microcystin-RR	3.0	20	99	97	102	7	26
Microcystin-YR	14	20	90	121	89	16	22

#### 4 References

1. Meriluoto, J. and Codd, G.A., Eds, (2005) TOXIC - Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis, Abo Akademi University Press.
2. Beltrán E., Ibáñez M., Sancho J.V. *et al.* (2012) Determination of six microcystins and nodularin in surface and drinking waters by on-line solid phase extraction-ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1266**, 61-68.
3. Lee, H.S., Jeong, C.K., Lee, H.M. *et al.* (1999) On-line trace enrichment for the simultaneous determination of microcystins in aqueous samples using high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Journal of Chromatography A*, **848**, 179-184.
4. Rivasseau, C., Vanhoenacker, G., Sandra, P., *et al.* (2000) On-line solid-phase extraction in microcolumn-liquid chromatography coupled to UV or MS detection: Application to the analysis of cyanobacterial toxins. *Journal of Microcolumn Separations*, **12**, 323-332.
5. Shan, Y., Shi, X., Dou, A., *et al.* (2011) A fully automated system with on-line micro solid-phase extraction combined with capillary liquid chromatography-tandem mass spectrometry for high throughput analysis of microcystins and nodularin-R in tap water and lake water. *Journal of Chromatography A*, **1218**, 1743-1748.
6. Commission Decision 2002/657/EC (2002) implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.
7. Flores C. and Caixach J. (2015) An integrated strategy for rapid and accurate determination of free and cell-bound microcystins and related peptides in natural blooms by liquid chromatography-electrospray-high resolution mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight mass spectrometry using both positive and negative ionization modes. *Journal of Chromatography A*, **1407**, 76-89.
8. ISO 20179: 2005 Water quality - Determination of microcystins - Method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection.









## ANEXO B. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS RELACIONADOS CON LA TESIS

- Barco M, Flores C, Rivera J, Caixach J. Determination of microcystin variants and related peptides present in a water bloom of *Planktothrix (oscillatoria) rubescens* in a Spanish drinking water reservoir by LC/ESI-MS. *Toxicon* (2004) 44: 881–886.

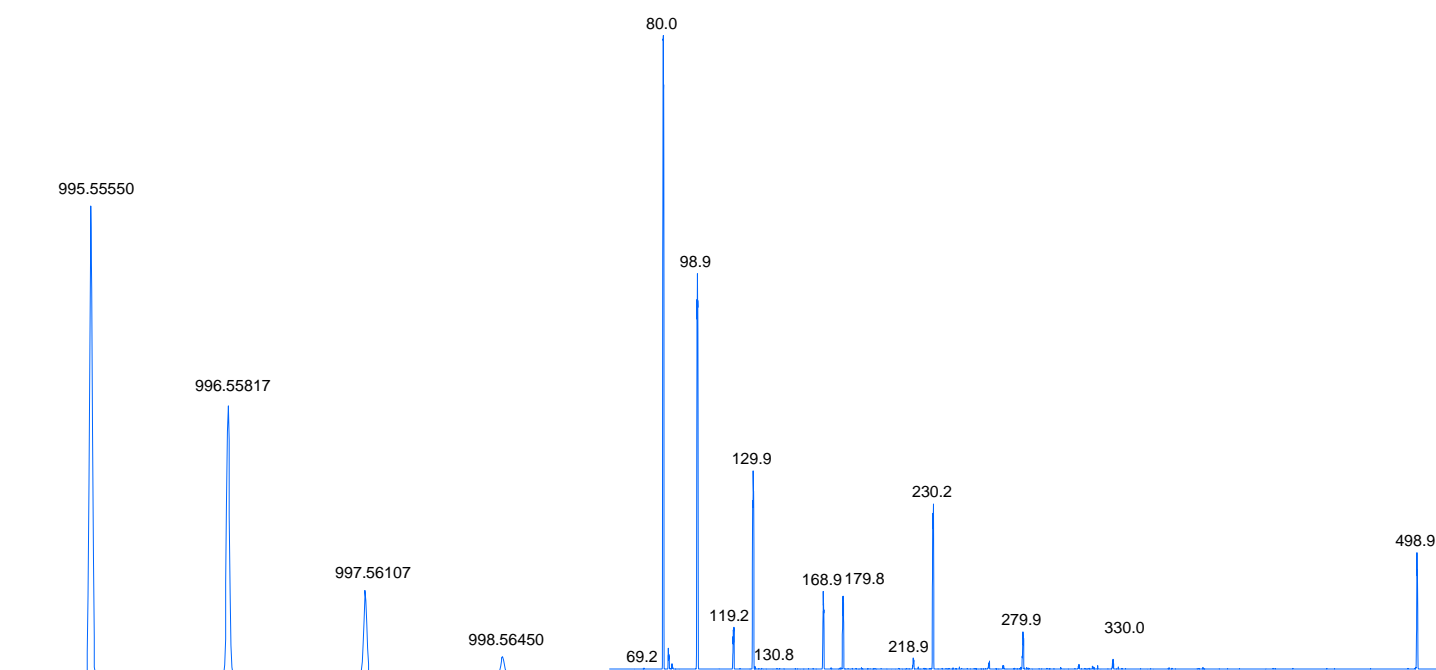
Los resultados de la presente tesis doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones:

- Reverté L, Garibo D, Flores C, Diogène J, Caixach J, Campàs M. Magnetic particle-based enzyme assays and immunoassays for microcystins: from colorimetric to electrochemical detection. *Environ. Sci. Technol.* (2013) 47 (1): 471–478.
- Flores C, Ventura F, Martín-Alonso J, Caixach J. Occurrence of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in N.E. Spanish surface waters and their removal in a drinking water treatment plant that combines conventional and advanced treatments in parallel lines. *Sci. Total Environ.* (2013) 461-462: 618–626.
- Rosso L, Sedan D, Kolman M, Caixach J, Flores C, Oteiza JM, Salerno G, Echenique R, Giannuzzi L, Andrinolo D. Microcystis aeruginosa strain [D-Leu<sup>1</sup>] MCYST-LR producer, from Buenos Aires province, Argentina. *J. Coast. Life Med.* (2014) 2(4): 287–296.
- Garibo D, Flores C, Cetó X, Prieto-Simón B, Del Valle M, Caixach J, Diogène J, Campàs M. Inhibition equivalency factors for microcystin variants in recombinant and wild-type Protein Phosphatase 1 and 2a assays. *Environ Sci Pollut. Res.* (2014) 21(18): 10652–60.
- Flores C, Palacios O, Ventura F, Martín-Alonso J, Caixach J. On-line SPE LC-ESI-MS/MS analysis of PFAAs. Behavior in a drinking water treatment plant that combines conventional and advanced treatments in parallel lines. *Organohalogen Compd. OHC Database. Proceeding Paper* (2014).
- Flores C and Caixach J. An integrated strategy for rapid and accurate determination of free and cell-bound microcystins and related peptides in natural blooms by liquid chromatography-electrospray-high resolution mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight mass spectrometry using both positive and negative ionization modes., *J. Chromatogr. A* (2015) 1407: 76–89.
- Participación en la redacción de un capítulo y un “Standard Operation Procedure” para el libro *CYANOCOST Handbook on Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*. Editores: Jussi Meriluoto, Linda Lawton and Geoffrey A. Codd, en el marco de las acciones *COST (CYANOCOST; ES1105)*.

**SOP9** Analysis of microcystins by on-line solid phase extraction-liquid chromatography tandem mass spectrometry. Flores C and Caixach J.

**Chapter 23** Liquid chromatography – mass spectrometry of cyanobacterial toxins. Caixach J, Flores C, Spoo L, Meriluoto J, Schmidt W, Mazur-Marzec H, Hiskia A, Kaloudis T and Furey A.





995.55550

996.55817

997.56107

998.56450

80.0

98.9

129.9

230.2

498.9

69.2

119.2

130.8

168.9

179.8

218.9

279.9

330.0