

**Vigilancia ambiental de
Compuestos Disruptores Endocrinos
y otros contaminantes prioritarios
en el medio acuático
mediante técnicas cromatográficas y biológicas**

Raquel Céspedes Sánchez



**UNIVERSITAT DE
BARCELONA**



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Universidad de Barcelona
Facultad de Química
Departamento de Química Analítica

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

**Vigilancia ambiental de
Compuestos Disruptores Endocrinos
y otros contaminantes prioritarios
en el medio acuático
mediante técnicas cromatográficas y biológicas**

Raquel Céspedes Sánchez

Barcelona, Noviembre de 2018

Programa de Doctorado:
“Química Analítica y del Medio Ambiente”
Departamento de Química Analítica
Universidad de Barcelona

Memoria presentada para optar al grado de Doctora
por la Universidad de Barcelona

por

RAQUEL CÉSPEDES SÁNCHEZ



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Director de Tesis:

Co-Directora de Tesis:

Tutora de la UB:

Dr. Damià Barceló i Cullerès

Profesor de Investigación

Dpto. de Química Ambiental

IDAEA-CSIC

Dra. Sílvia Lacorte Bruguera

Profesora de Investigación

Dpto. de Química Ambiental

IDAEA-CSIC

Dra. M^a Teresa Galcerán i Huguet

Catedrática de Química Analítica

Dpto. de Química Analítica

Universidad de Barcelona

Barcelona, Noviembre de 2018

Esta tesis está dedicada:

*A mi familia,
A mis hijas Lía y Enya,
y especialmente
a mi madre*

*All that I am,
or hope to be,
I owe to my
Angel Mother.*
-Abraham Lincoln

SUMMARY

There is growing evidence that some compounds, known as endocrine-disrupting compounds (EDCs), can mimic or antagonize the actions of steroid hormones, affecting the health of humans and wildlife species by disrupting their normal endocrine function.

EDCs are natural and synthetic compounds that can be found in the aquatic environment as a result of the chemical industry, pharmacy and household applications. We are exposed to mixtures of EDCs that can exert physiological effects, synergic, antagonist o additive, at very low concentrations (i.e. β -estradiol and ethinylestradiol are reported to be estrogenic to fish at levels as low as 0.1 to 10 ng/L).

Over the past decade there have been significant advances in our understanding of EDCs, their mechanisms of action and biological effects on human and wildlife health, suggesting a greater role for EDCs in disease than what was predicted. EDCs have Non-Monotonic Dose Response curves, they can exert effects at lower doses than expected, the moment of the exposure is critical, their effects can have latency periods and even pass to other generations.

To control the endocrine disruptors, there is a need for monitoring large numbers of samples and for methodologies, not only to identify the EDCs at the low dose that they are present in the environment, but also to assess their estrogenic activity.

This thesis responds to increasing concerns on this matter, providing an integrated methodology that combine analytical methods by LC-MS(MS) to determine the presence of EDCs at low concentrations in the environment, as well as biological techniques (Recombinant Yeast Assay, RYA) to assess their estrogenic activity in environmental samples. In addition, ELISA immunoassays have been validated as a screening tool for a rapid and cost-effective detection of alkylphenolic compounds in water samples in monitoring programs.

Monitoring programs were performed in Portugal and the Llobregat and Ter River basins in Catalonia, Spain. Estrogenic activity was mainly attributed to alkylphenolic compounds, whereas in a few samples, the estrogens identified and confirmed by LC-MS/MS were responsible for the estrogenicity.

The obtained results pointed out the importance to analyze the particulated fraction of waters to determine the total concentration of alkylphenolic compounds, due to partitioning of the most estrogenic (nonylphenol and octylphenol) upon particulate matter (PM) and enrichment in sludge.

RYA showed weak estrogenic activity in surface water samples, whereas the analysis of PM in wastewaters permitted to obtain higher removal of estrogenicity (95-97%) than chemical concentrations, more important from the environmental point of view.

Finally, due to their estrogenic properties, some of the EDCs studied in this thesis (i.e. Nonylphenol, DEHP, estradiol, ethinylestradiol) have been included in the European regulation (D. 2000/60/EC, D. 2008/105/EC, D. 2015/495/EC, REACH Regulation and D. 2003/53/EC) and in the US EPA priority list, confirming the relevance of the target compounds selected.

RESUMEN

Los compuestos disruptores endocrinos (EDCs) son sustancias exógenas capaces de alterar las funciones del sistema endocrino y la regulación del desarrollo embrionario, y por consecuencia, con capacidad de provocar efectos adversos sobre la salud de un organismo o su progenie (WHO, 2012). Hay un aumento de preocupación no solo por la presencia de estos compuestos en el medio ambiente, sino por los efectos biológicos que pueden ejercer sobre la salud humana y de animales.

Los EDCs pueden ser compuestos naturales y sintéticos. Tienen diversos mecanismos de actuación y presentan características propias, de forma que cada EDC tiene una curva Dosis-Respuesta No Monotónica (NMDR) característica, pueden ejercer mayores efectos estrogénicos a dosis muy bajas (*low dose*), el momento de la exposición a los EDCs es crítico, siendo mayor e irreversible en la fase prenatal, tienen largos periodos de latencia. En los últimos 10 años ha habido muchos avances en su conocimiento y se han relacionado enfermedades tan comunes como la diabetes y la obesidad y hay estudios sobre sus efectos, que pueden manifestarse a lo largo de varias generaciones a través de la epigenética.

Son compuestos que entran en el medio acuático principalmente por las descargas de las estaciones depuradoras de aguas residuales y pueden distribuirse en distintos compartimentos, siendo adsorbidos en fangos, sedimentos y material particulado. Las mezclas de EDCs a las que estamos expuestos en el medioambiente pueden presentar efectos sinérgicos, antagonísticos, inhibitorios o aditivos. Presentan actividad estrogénica a concentraciones muy bajas (los estrógenos a 1-10 ng/L y los alquifenoles a µg/L).

La gran variedad de propiedades físico-químicas de los EDCs y las bajas concentraciones a las que están presentes en el medioambiente, hace que su determinación represente un reto por su complejidad, por lo que se necesita métodos químicos multiresiduo sensibles, así como técnicas biológicas que permitan determinar la actividad estrogénica que presentan a concentraciones muy bajas.

Por tanto, ante la actual problemática de la contaminación del agua por compuestos disruptores endocrinos, y la creciente preocupación por los efectos biológicos que pueden tener sobre la salud y el medioambiente, esta tesis responde a la demanda de métodos analíticos para su determinación y control, y a la necesidad de establecer metodologías integradas con técnicas biológicas para la determinación no solo de las bajas concentraciones a las que los EDCs están presentes en el medioambiente acuático, sino también de su actividad estrogénica.

Con este objetivo, en esta tesis se ha llevado a cabo la optimización de una metodología integrada, de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas para identificar los EDCs en el medio acuático, con análisis confirmatorio de estrógenos mediante LC-MS(MS) y el bioensayo con levaduras recombinantes (RYA) que determina de forma cuantitativa la estrogénicidad total de la muestra, detectando tanto los estrógenos naturales como los xenoestrógenos sin tener en cuenta la identidad de los compuestos químicos responsables de este efecto. Adicionalmente, se han validado inmunoensayos ELISA para la determinación de compuestos

alquilfenólicos en aguas, que permiten realizar un previo *screening* y analizar un gran número de muestras en menor tiempo y a coste inferior en Programas de Vigilancia Ambiental (PVA)

Se han llevado a cabo PVAs en Portugal y en las cuencas de los ríos Llobregat y Ter en Cataluña (Nordeste de España). La actividad estrogénica ha sido atribuida principalmente a los compuesto alquilfenólicos, más ubicuos, mientras que en los puntos en los que se han identificado y confirmado estrógenos mediante LC-MS/MS, éstos compuestos tienen mayor contribución a la estrogénicidad total.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la importancia de analizar la fracción particulada en aguas para determinar la concentración total de compuestos alquilfenólicos, debido a la distribución de los compuestos más estrogénicos (nonilfenol y octilfenol) en el material particulado y la absorción en los fangos.

El bioensayo RYA ha detectado una baja actividad estrogénica en las aguas superficiales, mientras que el análisis del PM en aguas residuales ha permitido obtener una mayor eliminación de la estrogénicidad (95-97%), más importante medioambientalmente las concentraciones químicas por los potenciales efectos que puede producir en la fauna y los seres humanos.

Finalmente, el desarrollo de técnicas más avanzadas para la determinación de EDCs, el aumento de publicaciones científicas, y el hecho de que los principales EDCs estudiados en esta tesis (NP, BPA, DEHP, E1, E2, E3) han sido posteriormente incluidos en la normativa europea y de USA de contaminantes prioritarios (D. 2008/105/EC, D. (UE) 2015/495/EC, Reglamento REACH y D. (UE) 2003/53/EC), ponen de manifiesto la relevancia de los compuestos estudiados.

*El agua es el elemento y
principio
de todas las cosas*

Tales de Mileto

*Water is the driving
force of all Nature*

Leonardo da Vinci



Agradecimientos

Una tesis doctoral es un proceso en el cual se espera que los conocimientos que vamos adquiriendo, nos aporten una experiencia para alcanzar una madurez profesional, pero inevitablemente, las vivencias y experiencias en el camino, nos van forjando paralelamente una madurez personal.

Quiero agradecer a todas aquellas personas que me han acompañado en este largo proceso, tanto compañeros del laboratorio, como amigos y familia, de corazón, muchas gracias!!! Son tantas las personas que han dejado algún buen momento en el recuerdo, que es imposible nombrarlas a todas...

En primer lugar, me gustaría agradecer al Prof. Damia Barceló la oportunidad de realizar esta tesis en su grupo de investigación, la posibilidad de participar en proyectos científicos internacionales, congresos, etc, que me han ido formando profesionalmente, así como la confianza depositada en todo este tiempo y su apoyo en la etapa final de elaboración de la memoria. Con el paso de los años he descubierto que su frase "no tinc temps" en temas poco relevantes, se traduce en un estar disponible en cualquier instante y de forma eficaz cuando realmente le necesitas.

También quiero agradecer a la Prof. Silvia Lacorte a lo largo de estos años por aceptar ser mi directora del doctorado y a la Prof. Maria Teresa Galcerán en el último tramo de la tesis, por aceptar ser la tutora de la UB de esta tesis.

Quiero dar un agradecimiento especial a las personas del CSIC que más huella han dejado en este tiempo; a Miren López de Alda, excelente persona y profesional, quien me ha introdujo en el "Masas-Masas (LC-MS/MS) y siempre ha estado dispuesta para explicarme lo que necesite y darme buenos consejos; a Benjamí Piña, que me introdujo en el apasionante mundo de la biología molecular (con el ensayo de levaduras recombinantes o RYA) y me transmitió su ilusión cada vez que decía "ens han crescut els llevats", a Antoni Ginebreda, con un gran conocimiento de los ríos tanto a nivel tanto científico como artístico, por sus buenos consejos cuando realicé los monitorings del Llobregat y el Ter y por permitirme poner uno de sus bellos dibujos sobre ríos en la tesis (portada capítulo 5).

Del mundo laboral, quiero destacar a Carlos Campos (Agbar, Grupo SUEZ), doctor y persona por encima de todos sus cargos, por valorar y apoyar la importancia de finalizar la tesis y por sus sabios consejos que nunca olvidaré.

Además de un aprendizaje profesional, una de las cosas más enriquecedoras de realizar una tesis es toda la gente y compañeros que vas conociendo. Muchas gracias en general a todas las personas del dpt. de Química Ambiental del IIQAB-CSIC (actual IDAEA-CSIC) por ser como una gran familia y por todos los buenos momentos. Simbolizo con este mapa del mundo sin fronteras a todas las nacionalidades que he tenido el placer de conocer durante este tiempo y que me ha enriquecido como persona y me ha hecho valorar las distintas tradiciones y países.



I would like also to express my gratitude to all the international people that I have met during my time at CSIC. Some memories have been unforgettable! In addition:

- Muito obrigada to Dr. Paula Viana from Portugal*
- Děkuji to Dr. Fránek and his laboratory team in Brno, Czech Republic*
- Ευχαριστώ (Eucharistó) to Dr. Despina Tsiipi (Athens)*
- Spasibo to Dr. Andrey Mart'ianov and Dra. Elena Orlova from Russia and Bielorrussia respectively*

Pero quiero expresar mi gratitud especialmente a Dori y a Roser, esos ángeles de la "sala de Masas", las reinas del "troubleshooting" del masas, siempre dispuestas a ayudar con los equipos en los turnos, que han mantenido durante todos estos años su sonrisa, ánimos y apoyo constante. Mención especial a "las viejas glorias" que inexplicablemente siempre se conservan igual aún con el paso de los años, destacando a Sandra, por su apoyo durante la etapa final de la tesis. Respecto a mis compañer@s, me gustaría destacar a Sara, especialmente por el último año de doctorado en el CSIC compartido, y su calidad como persona y profesional; a Alain, gentleman siempre con su voz firme, peculiar sentido del humor y ayudando a todas las compañeras (sí, durante un tiempo fue el único compañero del laboratorio!). Y "last but not least" a Andreas, un alemán increíblemente políglota, que recitaba los "setze jütges" a la perfección, que conocí casualmente durante su estancia, enseñándonos a bailar y se ha convertido en uno de los mejores amigos, desbordante de energía y la alegría que le caracteriza en todo momento, con un gran equilibrio como persona y su apoyo incondicional durante todos estos años.

Esta tesis doctoral es el resultado de muchos años de mi vida, me ha robado mucho tiempo de estar con mis seres queridos, y a todos ellos, familiares y amigos, les agradezco enormemente haberme acompañado en el proceso y al mismo tiempo les pido disculpas por la pérdida de buenos momentos compartidos. Especialmente: quiero hacer mención:

A mis abuelos, personas tan entrañables en nuestras vidas, que desafortunadamente fallecieron en el camino y ya no puedo compensar por el tiempo robado. A mis padres, por su amor incondicional, por habérmelo dado todo a cambio de nada, por las deliciosas comidas que me llenan de energía para continuar, por apoyarme en este interminable camino. y por su gran dedicación y cuidado en todo momento y especialmente los últimos años desde que tengo hijas, por el gran apoyo logístico con ellas, y por su absoluta dedicación, entrega y amor con la que nos han cuidado a las tres a pesar de su edad. A mis sobrinos a quienes a pesar de la distancia les quiero un montón y a mi hermana, por fin podré responderle a su pregunta de: "pero cuando acaba esto?". A mi marido, especialmente por todos los sacrificios que a nivel familiar nos ha comportado durante años.

Pero especialmente, quiero dedicar esta tesis a mi madre, la persona que más tiempo, esfuerzo y empeño ha dedicado a brindarme su apoyo durante todas las etapas del largo proceso, tanto moral como logísticamente, especialmente importante en el proceso de redacción de la memoria. Siempre animando y contagiando su optimismo y alegría, que junto a su tesón y valentía afrontando y luchando contra una grave enfermedad, le permitió superarla... lo cual me hace apreciar y valorar mucho más el tiempo juntas. Puedo asegurar que sin su apoyo incondicional y los continuos sacrificios que le ha comportado, la elaboración de esta tesis doctoral hubiese sido materialmente imposible, por lo que sin duda puedo afirmar que "lo hemos conseguido en equipo" y tengo el deber moral de al menos darle públicamente el reconocimiento que merece y dedicarle el trabajo realizado.

Finalmente, también quiero dedicar mi tesis doctoral a mis hijas, Lía y Enya. Ellas son sin duda las personas que por su corta edad más han sufrido la falta de tiempo juntas por la gran dedicación que ha comportado elaborar esta memoria, una con 3 años, que se sintió desplazada de su madre sin entender el porqué y la otra durante los primeros meses de vida... Solamente una madre puede entender la fuerza del amor que se siente por los hijos, indescriptible con palabras. Sois la gran motivación para dar fin a esta larga y dura etapa en nuestras vidas. Deseo ser libre al fin para dedicaros mi tiempo y cariño como merecéis, y espero poder compensaros en un futuro...

GRACIAS ¡!!

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Ac / Ab	Anticuerpo / <i>Antibody</i>
ACN	Acetonitrilo
AchE	Acetilcolin estearasa
ACN	Acetonitrilo
ACP	Análisis de Componentes Principales
AEO	Alcohol polietoxilado
Ag	Antígeno / <i>Antigen</i>
AGBAR	Aigües de Barcelona
Programa AGUA	Actuaciones para la Gestión y la Utilización del Agua
ALS	<i>Alternating Least Squares</i>
AMP	Adenosina monofosfato
AOP	Proceso de Oxidación Avanzada / <i>Advanced Oxidation Process</i>
AP	Alquilfenol / <i>Alkylphenol</i>
APCI	Ionización química a presión atmosférica / <i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>
APEOs	Alquilfenol etoxilado / <i>Alkylphenol Ethoxylate</i>
API	Ionización a presión atmosférica / <i>Atmospheric pressure ionization</i>
As	Antisuero
ASE	Extracción con disolvente acelerada
AT	Antígeno de tapizado
ATP	Adenosina trifosfato
BBA	<i>Biological Based Assays</i>
BBP	Butil benzyl ftalato / <i>buthylbenzylphthalate</i>
BMR	Bioreactores de Membrana
BOD	Demanda Biológica de Oxígeno
BPA	Bisfenol A / <i>Bisphenol A</i>
C ₁₈	Octadecil sílice
CAG	Carbón Activo Granular
CI	Ionización química / <i>Chemical Ionization</i>
CE	Energía de Colisión
C _n EO _x	Alcohol polietoxilado
CLP	Clasificación, etiquetado y envasado / <i>Classification, Labelling and Packaging</i>
DQO / COD	Demanda química de oxígeno / <i>Chemical Oxygen Demand</i>
COMMPS	<i>Combined Monitoring-based and Modelling-based Priority Settings</i>
CV	Coeficiente de variación
DAD	Detector de Diodo Array / <i>Diode Array Detector</i>
DBO ₅ / BOD	Demanda Biológica de Oxígeno / <i>Biological Oxygen Demand</i>
DBP	Dibutilftalato / <i>Dibuthylphthalate</i>
DEHP	Di (2-etilhexil)ftalato / <i>Di (2-ethylhexyl)phthalate</i>
DEP	Dietilftalato / <i>Diethylphthalate</i>
DES	Dietilstilbestrol / <i>Diethylstilbestrol</i>
DMA	Directiva Marco del Agua / <i>Water Framework Directive</i>
DMP	Dimetilftalato / <i>Dimethylphthalate</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
ADN / DNA	Ácido desoxirribonucleico / <i>Desoxirribonucleic Acid</i>
COD / DOC	Carbono orgánico disuelto / <i>Dissolved Organic Carbon</i>
DES	Dietilstilbestrol / <i>Diethylstilbestrol</i>
DOCE	Diario Oficial de la Comunidad Europea
DOUE	Diario Oficial de la Unión Europea
DOGC	Diario Oficial de la <i>Generalitat de Catalunya</i>
DQO	Demanda química de oxígeno
E1	Estrona / <i>Estrone</i>
E2	17β-estradiol / <i>17β-estradiol</i>
E2 eq.	Equivalentes de estradiol / <i>Estradiol equivalents</i>
E3	Estriol / <i>Estriol</i>
E2-gluc	Estradiol-17-glucurónido

E1-sulf	Estrona-3-sulfato
E2-acet	Estradiol-17-acetato
EC ₅₀	Concentración efectiva al 50%
ECD	Detector de captura de electrones
ECHA	Agencia Europea de los Productos Químicos / <i>European Chemicals Agency</i>
EDA	Análisis Dirigido a Efecto / <i>Effect Directed Analysis</i>
EDAR	Estación depuradora de aguas residuales
EDC	Compuestos Disruptores Endocrinos / <i>Endocrine Disrupting Compounds</i>
E2 equiv	Equivalente a Estradiol
EE / EE2	Etinil estradiol / <i>Ethinylestradiol</i>
EEF	Factor de Equivalencia a β -Estradiol / <i>The 17-β-Estradiol Equivalency Factor</i>
EI	Impacto electrónico
ELISA	Ensayos inmuno-enzimáticos en soporte sólido / <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EPA	Agencia de Protección del Medioambiente de EUA / <i>Environmental Protection Agency</i>
ER-CALUX	<i>Estrogen receptor mediated chemical activated luciferase gene expression assay</i>
ERE	Elemento de Respuesta Estrogénica
ES	Esteiro Seixal (Portugal)
ESI	Ionización química por electrospray
ET	Trazador enzimático
ETAP	Estación de Tratamiento de Aguas Potables
ev	Electronvoltios
Fv	Fracción variable
FIA	Análisis por inyección de flujo / <i>Flow injection analysis</i>
FIIA	Análisis inmunológicos por inyección de flujo
Fz	Formariz (Portugal)
GC	Cromatografía de gases / <i>Gas Chromatography</i>
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
GDH	Glucosa deshidrogenasa
hER	Receptor Hormonal
HOBT	2-hydroxybenzotiazol
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HRP	Peroxidasa del rábano picante
IC ₅₀	Concentración causante de inhibición del 50% de señal
ICT	Institut Català de Tecnologia
IDL	Límite de Detección del Instrumento
Ig	Inmuno-globulina
IgG	Inmuno-globulina tipo G
IPPC	Control Integrado de Prevención de la Contaminación
IS	Inmuno-sorbentes
IT	Trampa Iónica / <i>Ion Trap</i>
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada / <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LC	Cromatografía de líquidos / <i>Liquid Chromatography</i>
LC ₅₀	Concentración Letal para el 50% de los organismos expuestos
LC-MS/MS	Cromatografía de líquidos acoplada en tandem de espectrometría de masas
LD ₅₀	Dosis letal para el 50% de los organismos expuestos
LED	Diodo electro-luminiscente
LEV	Levenorgestrel
LDD	Límite de detección
LLE	Extracción líquido-líquido / <i>Liquid-liquid Extraction</i>
LOEC	La más baja concentración sin efecto observado / <i>The Lowest Observable Effect Concentration</i>
LOD	Límite de detección del método / <i>Detection Limit</i>
LOQ	Límite de cuantificación / <i>Quantification Limit</i>
LWL	Valor límite inferior
MA	Medioambiente
MAB	Anticuerpos monoclonales / <i>Monoclonal Antibody</i>

MAE	Extracción asistida por microondas
MAPA	Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
MCF-7	Línea celular de cancer de mama humano
MCR-ALS	<i>Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares</i>
M/z	Relación masa carga
MdV	Monte da Vinha (Portugal)
MeOH	Metanol
MMA	Ministerio de Medio Ambiente
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS	Espectrometría de masas / <i>Mass Spectrometry</i>
MS/MS	Espectrometría de masas en tandem / <i>Tandem Mass Spectrometry</i>
MW	Peso Molecular / <i>Molecular Weight</i>
NCA	Norma de Calidad Ambiental
NF	Nanofiltración
NI	Modo de Ionización Negativo / <i>Negative Ionization Mode</i>
NMDR	Curvas Dosis-respuesta no Monotónicas / <i>Non Monotonic Dose Response</i>
NOR	Noretindrona
NP	Nonilfenol / <i>Nonylphenol</i>
NPE _{1C} , <i>n</i> _{EO} =0	Nonilfenol carboxilatos
NPE _{2C} , <i>n</i> _{EO} =1	Nonilfenol etoxi carboxilados
NP _n EO	Nonilfenol etoxilado / <i>Nonylphenol Ethoxylate</i>
NPD	Detector de nitrógeno fósforo
OECD	Organización para el desarrollo y la cooperación económica / <i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OI	Ósmosis Inversa / <i>Reverse Osmosis</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud / <i>World Health Organization</i>
OP	Octilfenol / <i>Octylphenol</i>
OPE _{1C} , <i>n</i> _{EO} =0	Octilfenol carboxilatos
OPE _{2C} , <i>n</i> _{EO} =1	Octilfenol etoxi carboxilatos
OPEO	Octilfenol etoxilados
PAb	Anticuerpos Policlonales / <i>Policlonal Antibody</i>
PAHs	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
PARAFAC	<i>Parallel Factor Analysis</i>
PC	Praia do Coruche (Portugal)
PCA	Análisis de Componentes Principales / <i>Principal Component Analysis</i>
PCBs	Bifenilos policlorados
PdS	Ponte do Sacavém (Portugal)
PEG	Polietilenglicol
PES	Poli Eter Sulfona
PI	Modo de ionización positive / <i>Positive Ionization Mode</i>
PLE	Extracciones con líquidos presurizados
PM	Ponte Moreira (Portugal)
PNB	Ponte Nova Barcelos (Portugal)
PNEC	Concentración Prevista sin Efecto / <i>Predicted No Effect Concentration</i>
PNUMA	Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente
PRO	Progesterona
PRP	Ponte Ribeira Pernes (Portugal)
Pv	Presión de Vapor
PVA	Programa de Vigilancia Ambiental
RA	Ria Aveiro (Portugal)
RAM	<i>Restricted Acces Material</i>
RC	Reactividad Cruzada / <i>Cross Reactivity</i>
REACH	Registro, Evaluación y Autorización de Sustancias Químicas / <i>Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals</i>
RIA	Radio-inmunoensayos
RO	Ósmosis Inversa / <i>Reverse Osmosi</i>
Rs	Velocidad o tasa de muestreo / <i>Sampling Rate</i>

RSD	Desviación Estándar relativa / <i>Relative Standard Deviation</i>
R ²	Coefficiente de Correlación
RYA	Ensayo con Levaduras Recombinantes / <i>Recombinant Yeast Assay</i>
Rt	Tiempo de Retención / <i>Retention time</i>
SAX	Resinas de intercambio iónico / <i>Strong Anion Exchange</i>
SBSE	Extracción por Sorción en Barra Agitadora / <i>Stir Bar Sorptive Extraction</i>
Screen-printed	Serigrafiado
SDB	Poli Estireno divinil benceno
SFE	Extracción con fluidos supercríticos
SIM	Modo Selectivo de Iones / <i>Selected Ion Monitoring</i>
SGEs	Electrodos de grafito
SPE	Extracción en fase sólida / <i>Solid Phase Extraction</i>
SPME	Micro extracción en fase sólida
SRM	Modo de Reacción Selectivo / <i>Selective Reaction Monitoring</i>
SSPE	Extracción secuencial en fase sólida
SPR	Resonancia de Superficie de Plasma / <i>Surface Plasmon Resonance</i>
STP	<i>Sewage Treatment Plant</i>
TEI	Herencia Epigenética Transgeneracional / <i>Transgenerational Epigenetic Inheritance</i>
TIC	Corriente Total de Iones / <i>Total Ion Current</i>
TIE	Evaluación e Identificación de la Toxicidad / <i>Toxicity Identification Evaluation</i>
TI ₅₀	Índice de Impacto Tóxico
TIR	Reflexión interna total
TOC	Contenido orgánico total / <i>Total Organic Carbon</i>
TU	Unidades de toxicidad
TWA	Concentración promedio en el tiempo / <i>Time Weighted Average</i>
UE	Unión Europea / <i>European Union</i>
UK	Reino Unido / <i>United Kingdom</i>
UF	Ultrafiltración
UPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficacia / <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
UPLC-MS/MS	Cromatografía de líquidos de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en tandem
USA	Estados Unidos de América / <i>United states of America</i>
UE	Unión Europea
UV	Ultravioleta / <i>Ultra violet</i>
V	Voltios
VTG	Vitellogenina / <i>Vitellogenin</i>
WFD	<i>Water Framework Directive</i> / Directiva Marco del Agua
WHO	Organización Mundial de la Salud / <i>World Health Organization</i>
WWF	<i>World wildlife fund</i>
X	Valor medio
YES	Ensayo de Estrógeno de Levaduras / <i>Yeast Estrogen Screen</i>
σ	Desviación Estándar
σ ²	Varianza

ÍNDICE DE LA TESIS DOCTORAL

SUMARY / RESUMEN.....	i
ACRÓNIMOS.....	iv
OBJETIVOS Y ESTRUCTURA.....	viii
JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS.....	XII

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN -----

1.1. COMPUESTOS DISRUPTORES ENDOCRINOS (EDCs) EN EL MEDIOAMBIENTE ACUÁTICO.....1

1.1.1. La contaminación del agua. Control de la calidad química	1
1.1.2. Compuestos Disruptores Endocrinos (EDCs). Antecedentes. Definición EDCs	3
1.1.3. Mecanismos de acción de los EDCs. Relación dosis-respuesta	8
1.1.4. Clasificación de EDCs	- 10
1.1.5. Efectos en animales y humanos por exposición a EDCs	13
1.1.6. Evaluación del riesgo de exposición a EDCs	23
1.1.7. Legislación relativa a la calidad del agua y los EDCs	27

1.2. COMPUESTOS DISRUPTORES ENDOCRINOS ESTUDIADOS..... 41

1.2.1. Origen, usos y aplicaciones de los EDCs estudiados	46
1.2.2. Propiedades físico-químicas de los EDCs	52
1.2.3. Toxicidad y estrogénicidad de los EDCs	57
1.2.4. Presencia y distribución de los EDCs en el medioambiente	61
1.2.4.1. EDCs en aguas superficiales y medio acuático en general	64
1.2.4.2. EDCs en aguas residuales	82

1.3. ANÁLISIS DE EDCs EN EL MEDIOAMBIENTE ACUÁTICO.....92

1.3.1. Toma y conservación de muestras de agua	92
1.3.2. Técnicas analíticas de (pre) tratamiento o extracción de las muestras	94
1.3.2.1. Extracción de EDCs en muestras líquidas	96
1.3.2.3. Extracción de EDCs en muestras sólidas	107

1.3.3. ANÁLISIS QUÍMICO de EDCs:.....111

1.3.3.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	111
1.3.3.2. Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas	120
1.3.3.3. Validación de métodos analíticos	125

1.3.4. ANÁLISIS BIOLÓGICO de EDCs:.....128

1.3.4.1. Técnicas Biológicas o bioensayos.	129
1.3.4.2. Ensayo de Levaduras Recombinantes (RYA). Potencia estrogénica	133
1.3.4.3. Técnicas Inmunológicas o Inmunoensayos.	138
1.3.4.4. Inmunoensayo ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)	140

1.3.5. COMBINACIÓN DE TÉCNICAS QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS.....147

CAPÍTULO 2 METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE EDCs -----

2.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS-----	155
2.1.1. Determinación de los EDCs estudiados mediante LC-MS.....	155
2.1.2. Objetivos.....	166
2.2. RESULTADOS:	
METODOLOGÍA DE LC-MS Y ENSAYO DE LEVADURAS RECOMBINANTES (RYA) -----	167
<u>Publicación científica 1:</u>	168
<i>“Integrated Procedure for Determination of Endocrine Disrupting Activity in Surface Waters and Sediments by use of Biological Technique Recombinant Yeast Assay and Chemical Analysis by LC-ESI-MS”. R. Céspedes, M.Petrovic, D.Raldúa, U.Saura, B.Piña, S.Lacorte, P.Viana, D. Barceló. Analytical and Bioanalytical Chemistry Vol. 378 (2004) 697-708.</i>	
2.3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS -----	180
2.3.1. Desarrollo analítico de la metodología LC-MS.....	180
2.3.2. Desarrollo analítico de LC-MS/MS. Validación. Supresión Iónica.....	183
2.3.3. Ensayo de Levaduras Recombinantes (RYA). Curvas de estrogenicidad.....	187
2.3.4. Integración de LC-MS y Ensayo de Levaduras Recombinantes (RYA).....	191
2.4. CONCLUSIONES -----	193

CAPÍTULO 3. TÉCNICAS BIOLÓGICAS DE SCREENING:

ENSAYO IMMUNOENZIMÁTICO ELISA -----

3.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS-----194

3.1.1. Determinación de compuestos alquilfenólicos mediante el Inmunoensayo ELISA.....195

3.1.2. Objetivos.....195

3.2. RESULTADOS:

DETERMINACIÓN DE NP EN MUESTRAS DE AGUA MEDIANTE EL INMUNOENSAYO ELISA...198

Publicación científica 2:199

“Validation of an ELISA for the Determination of 4-Nonylphenol and Octylphenol in Surface and Waste Water Samples by LC-ESI-MS”. **R. Céspedes**, K. Skryjová, M. Rackova, J. Zeravik, M. Fránek, S. Lacorte, D. Barceló. *Talanta*. Vol. 70 (2006) 745-751.

Publicación científica 3:206

“Immunoenzyme assay of nonylphenol: The study of selectivity and the detection of non-ionic surfactants in water samples”. A.A.Mart’ianov, B.B.Dzantiev, A.V.Zherdev, S.A.Eremin, **R. Céspedes**, M.Petrovic, D.Barceló. *Talanta*. Vol. 65 (2005) 367-374.

3.3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS:

VALIDACIÓN DE INMUNOENSAYOS ELISA MEDIANTE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS...214

3.3.1. Validación del ensayo ELISA Directo para la determinación de NP y OP mediante LC-MS216

3.3.2. Validación del ensayo ELISA Indirecto para la determinación de NP y mediante LC-S(MS).....219

3.4. CONCLUSIONES -----224

CAPÍTULO 4: PROGRAMA DE VIGILANCIA AMBIENTAL (PVA) EN PORTUGAL -----

4.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS-----225

- 4.1.1. Cuencas de los ríos y puntos de muestreo estudiados.....226
- 4.1.2. PVA para el cumplimiento de la D. 76/464/CE en Portugal.....229
- 4.1.3. PVA para el cumplimiento de la D. 2000/60/CE en Portugal.....230

4.2. RESULTADOS: PVA_s PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS Y EDCs EN PORTUGAL 231

- 4.2.1. Niveles de plaguicidas obtenidos en el PVA de la D. 76/464/CE.....231
- 4.2.2. Estudio Quimiométrico de los datos de plaguicidas del PVA de la D.76/464/CE.....234
- 4.2.3 Determinación de EDCs y evaluación de la estrogenicidad en aguas en Portugal.....235

Publicación científica 4:236
“Organic Pollutants in Surface Waters from Portugal using Chemometric Interpretation”.Tauler, D. A. Azevedo, S.Lacorte, R.Céspedes, P.Viana, D.Barceló. Environmental Technology,Vol. 22 (2001)1043-1054

Publicación científica 5:248
“Chemometric modelling of main contamination sources in surface waters of Portugal” R.Tauler, S.Lacorte, M. Guillamón, R.Céspedes, P.Viana, D.Barceló Environmental Toxicology and Chemistry. Vol. 23 (2004)565-575.

Publicación científica 6:259
“Detection and Evaluation of Endocrine Disruption Activity in Water Samples from Portugal Rivers”. L. Quirós, R. Céspedes, S. Lacorte, P. Viana, D. Barceló and B. Piña. Environmental Toxicology and Chemistry. Vol. 24 (2005) 389-395.

4.3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS:

PVA PARA EL CUMPLIMIENTO DE LA D.76/464/CE EN PORTUGAL 266

- 4.3-1. Análisis Quimiométrico de los datos analíticos del PVA de la D. 76/464/CE.....266

4.4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS:

PVA PARA EL CUMPLIMIENTO DE LA D.2000/60/CE EN PORTUGAL 269

- 4.4.1. Niveles de EDCs en el PVA de la D. 2000/60/CE mediante LC-MS (MS) 269
- 4.4.2. Evolución de los niveles de EDCs estudiados en Portugal (periodo 2000 - 2017)281
- 4.4.3. Determinación de la estrogenicidad mediante RYA en PVA D. 2000/60/CE.....287
- 4.4.4. Integración de resultados LC-MS y RYA.....291

4.6. CONCLUSIONES -----292

CAPÍTULO 5: PROGRAMA DE VIGILANCIA AMBIENTAL EN LAS CUENCAS EN LOS RÍOS LLOBREGAT Y TER -----

5.1. INTRODUCCIÓN -----	295
5.1.1. La cuenca del Río Llobregat. Puntos de muestreo.....	296
5.1.2. La cuenca del Río Ter. Puntos de muestreo.....	302
5.1.3. Plan de Vigilancia Ambiental en las cuencas del Ter y Llobregat	306
5.2. RESULTADOS -----	307
5.2.1. Estudios realizados en la cuenca del Río Llobregat.....	307
<u>Artículo científico 7:</u>	308
<i>“Distribution of Endocrine Disruptors in the Llobregat River basin (Catalonia, N.E. Spain). Analysis by LC-MS and Recombinant Yeast Assay”.</i> R. Céspedes, S. Lacorte, D. Raldúa, A. Ginebreda, D. Barceló, B. Piña. <i>Chemosphere. Vol. 61 (2005) 1710-1719</i>	
5.2.2. Estudios realizados en la cuenca del Río Ter.....	318
<u>Artículo científico 8:</u>	319
<i>“Chemical monitoring and occurrence of alkylphenols, alkylphenol ethoxylates, alcohol ethoxylates, phthalates and benzothiazoles in sewage treatment plants and receiving waters along the Ter River basin of Spain (Catalonia, N.E. Spain)”.</i> R. Céspedes, S. Lacorte, A. Ginebreda, D. Barceló. <i>Analytical and Bioanalytical Chemistry. Vol. 385 (2006) 992-1000.</i>	
<u>Artículo científico 9:</u>	328
<i>“Occurrence and fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in sewage treatment plants and impact on receiving waters along the Ter River basin (Catalonia, N.E. Spain) by SPE (PLE)-LC-ESI-MS”.</i> Raquel Céspedes , <i>Sílvia Lacorte, Antonio Ginebreda, Damià Barceló</i>	
5.3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS -----	337
5.3.1. Niveles de EDCs y actividad estrogénica en el río Llobregat	337
5.3.2. Río Llobregat: Niveles de EDCs en aguas superficiales y residuales mediante LC-MS (MS). Determinación de la estrogénicidad por RYA. Correlaciones.....	343
5.3.3. Río Ter: Niveles de EDCs en aguas superficiales y residuales mediante LC-MS (MS).. Determinación de la estrogénicidad por RYA. Correlaciones. Distribución de compuestos alquilfenólicos en la fase disuelta y particulada	351
5.4. CONCLUSIONES -----	361

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES.....364

CONTRIBUCIONES de la tesis doctoral.....368

7. BIBLIOGRAFÍA370

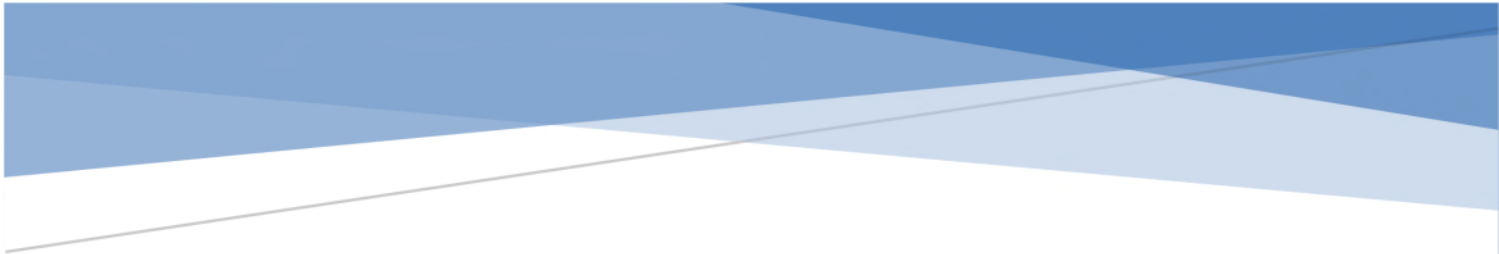
ANEXOS

ANEXO 1. Tablas resumen de la legislación europea, nacional y comunitaria relativa a la calidad del agua y a los EDCs.....A1

ANEXO 2. Tablas resumen de disfunciones endocrinas en seres humanos.....A7

ANEXO 3. Tablas con las concentraciones de EDCs obtenidas en el PVA en Portugal (D. 2000/60/CE)A9

ANEXO 4. Estudio quimiométrico de EDCs del PVA en Portugal (D. 2000/60/CE).....A14



***OBJETIVOS
ESTRUCTURA
Y JUSTIFICACIÓN
DE LA TESIS DOCTORAL***

OBJETIVOS

Ante la actual problemática de la contaminación del agua, y la creciente preocupación no solo por la presencia de compuestos disruptores endocrinos (EDCs) sino por el estudio de los efectos biológicos que pueden tener sobre la salud y el medioambiente, esta tesis responde a la demanda de métodos analíticos para su determinación y control, y a la integración con técnicas biológicas para determinar su actividad estrogénica. Los objetivos que se fijaron en la presente tesis fueron los siguientes:

1. Desarrollo de metodologías de análisis multiresiduo basadas en la **cromatografía de líquidos** acoplada a **espectrometría de masas** para la determinación de compuestos disruptores endocrinos y otros contaminantes prioritarios en el medio acuático. Las familias químicas estudiadas son:
 - Compuestos alquilfenólicos (alquilfenoles y alquilfenoles etoxilados)
 - Plastificantes: bisfenol A y ftalatos
 - Hormonas esteroideas: estrógenos y progestógenos
 - Plaguicidas.
2. Evaluación de la estrogénicidad de los distintos contaminantes mediante **ensayos de Levaduras Recombinantes (RYA)** en muestras de aguas superficiales y residuales (analizadas por LC-MS), estableciendo previamente los equivalentes de estrogénicidad para cada uno de los compuestos estudiados.
2. Desarrollo de **ensayos inmuno-enzimáticos (ELISA)** para la determinación de compuestos alquilfenólicos en aguas naturales. Estudio de los parámetros de calidad de los ensayos y validación mediante el análisis y la comparación de resultados con técnicas cromatográficas (LC-MS(MS)).
3. Realización de **programas de vigilancia ambiental (PVA)** para la determinación de EDCs y otros contaminantes prioritarios en ríos, y evaluación de los niveles de estrogénicidad:
 - en diversos ríos a lo largo de Portugal.
 - en ríos y estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) a lo largo de la cuenca de 2 ríos mediterráneos de Cataluña, el Llobregat y el Ter y
4. Estudio de la **distribución y comportamiento** de diversos EDCs (compuestos alquilfenólicos) en diferentes matrices ambientales (aguas superficiales, residuales y fangos de depuradora) en la cuenca del río Ter.
5. Aplicación de la **metodología Integrada química (LC-MS (MS)) y el ensayo de biología molecular RYA** con el objetivo de determinar conjuntamente la composición química y la actividad estrogénica de las muestras en los Planes de Vigilancia Ambiental.
6. Evaluación de la distribución de los EDCs estudiados mediante **técnicas quimiométricas** para el establecimiento de distribuciones geográficas y temporales, así como correlaciones entre los compuestos más ubicuos detectados en los programas de monitorización de los ríos.

En resumen, esta tesis pretende la integración de técnicas químicas y biológicas basadas en la cromatografía de líquidos acopladas a espectrometría de masas para la determinación de compuestos disruptores endocrinos y ensayos de Levaduras Recombinantes (RYA) para determinar su actividad estrogénica en el medioambiente, así como la validación de ensayos inmuno-enzimáticos ELISA como técnica de cribado de los alquilfenoles.

ESTRUCTURA DE LA MEMORIA

La presente memoria está estructurada en seis capítulos:

En el primer capítulo se describe una introducción general acerca de los compuestos disruptores endocrinos en el medioambiente, sus mecanismos de acción, efectos en organismos y humanos, sus estructuras, usos y aplicaciones, propiedades físico-químicas, y estrogénicidad. Se revisan los niveles y distribución de estos compuestos en el medioambiente y las técnicas de extracción, analíticas y biológicas utilizadas para su determinación.

En los capítulos 2 - 5 se describe el trabajo experimental realizado a lo largo de la Tesis Doctoral. Cada capítulo se inicia con una introducción al tema que se va a desarrollar, a la que le sigue la exposición de los objetivos concretos planteados, el trabajo experimental realizado, el cual se presenta en la mayoría de los capítulos en forma de publicaciones, y la correspondiente discusión de los resultados obtenidos. Finalmente, para cerrar el capítulo, se exponen las conclusiones obtenidas de la evaluación del trabajo experimental realizado.

En el capítulo 2 se describe el desarrollo y la validación de la metodología integrada LC-MS (MS) y RYA. En primer lugar, se incluye la metodología analítica, con el desarrollo de métodos multiresiduo adaptados a cada estudio o PVA, en función de los compuestos disruptores endocrinos a determinar en el medio acuático. En los métodos presentados se describe la extracción de las muestras mediante SPE y análisis mediante LC-MS, y en el caso de los estrógenos el análisis confirmatorio por LC-MS/MS. Adicionalmente se presenta la descripción del ensayo de levaduras recombinantes (RYA) aplicado en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Piña del IDAEA-CSIC (dpto. de Biología Molecular del IDAEA-CSIC en el momento de la elaboración de esta tesis doctoral).

En el capítulo 3 se desarrolla la validación de dos inmunoensayos ELISA para la determinación de nonilfenol en aguas: validación de un ELISA directo usando anticuerpos monoclonales para el análisis de aguas superficiales y validación de un ELISA indirecto usando anticuerpos policlonales, e incluye estudios de reactividad cruzada, y su aplicación en el análisis de aguas superficiales y residuales. Ambos ensayos fueron validados mediante la comparación con el análisis mediante técnicas analíticas, LC-MS y LC-MS/MS. Estos estudios se realizaron en colaboración con los grupos de investigación del Dr. Fránek del *Dpt. Of Analytical Biotechnology del Veterinary Research Institute (Brno, Czech Republic)* y del Dr. Dzantiev del *Institute of Biochemistry of the Moscow State University (Russian Academy of Sciences (Moscow, Russia))*.

En el capítulo 4 se describe el trabajo experimental realizado en los PVA llevados a cabo en Portugal para el cumplimiento de las Directivas 76/464/CE y 2000/60/CE respectivamente, estudios realizados para el Instituto do Ambiente de Portugal. Se han estudiado los niveles y comportamiento de los EDCs en diversos puntos de la geografía portuguesa mediante LC-MS y la estrogénicidad de las aguas mediante el ensayo de levaduras recombinantes RYA. Adicionalmente, en el Anexo A.4. se incluye el análisis quimiométrico de los datos generados que ha permitido determinar los *hot spots* y la distribución geográfica y temporal.

En el capítulo 5 se describe el trabajo experimental realizado en los PVA llevados a cabo a lo largo de las cuencas de los ríos mediterráneos Ter y Llobregat, realizados para la Agencia Catalana del Agua (ACA). Se han estudiado los niveles y comportamiento de los EDCs en diversos puntos de ambos ríos, así como la eficacia de las depuradoras (EDARs) para la eliminación de EDCs y de la estrogénicidad, mediante la aplicación de la metodología integrada LC-MS(MS) y RYA. Adicionalmente, se presenta el análisis del material particulado en el Ter, que ha permitido estudiar la compartimentación de los compuestos alquilfenólicos en el medio acuático.

En el último capítulo (capítulo 6) se recogen las conclusiones generales obtenidas en la discusión de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral.

A continuación, al final de la memoria, se incluye la bibliografía utilizada y diversos anexos, en los cuales se puede encontrar información adicional complementaria a la memoria: tablas resumen de la legislación relativa a la calidad del agua y los compuestos disruptores endocrinos, las tablas con las concentraciones obtenidas en el PVA en Portugal y el estudio quimiométrico realizado con estos datos en el grupo de investigación.

La distribución de las publicaciones incluidas en esta memoria es la siguiente:

Capítulo 2:

- *Publicación científica 1: "Integrated Procedure for Determination of Endocrine Disrupting Activity in Surface Waters and Sediments by use of Biological Technique Recombinant Yeast Assay and Chemical Analysis by LC-ESI-MS". R. Céspedes, M.Petrovic, D.Raldúa, U.Saura, B.Piña, S.Lacorte, P.Viana, D. Barceló. Analytical and Bioanalytical Chemistry. Vol. 378 (2004) 697-708.*

Capítulo 3:

- *Publicación científica 2: "Validation of an ELISA for the Determination of 4-Nonylphenol and Octylphenol in Surface and Waste Water Samples by LC-ESI-MS". R. Céspedes, K. Skryjová, M. Rackova, J. Zeravik, M. Fránek, S. Lacorte, D. Barceló. Talanta. Vol. 70 (2006) 745-751.*
- *Publicación científica 3: "Immunoenzyme assay of nonylphenol: The study of selectivity and the detection of non-ionic surfactants in water samples" .A.A.Mart'ianov, B.B.Dzantiev, A.V.Zherdev, S.A.Eremin, R. Céspedes, M.Petrovic, D.Barceló. Talanta. Vol. 65 (2005) 367-374.*

Capítulo 4:

- Publicación científica 4: “Organic Pollutants in Surface Waters from Portugal using Chemometric Interpretation”. R.Tauler, D. A. Azevedo, S.Lacorte, **R.Céspedes**, P.Viana, D.Barceló. *Environmental Technology*, Vol. 22. (2001) 1043-1054.
- Publicación científica 5: “Chemometric modelling of main contamination sources in surface waters of Portugal” R. Tauler, S. Lacorte, M. Guillamón, **R. Céspedes**, P. Viana, D. Barceló. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 23 (2004) 565-575.
- Publicación científica 6: “Detection and Evaluation of Endocrine Disruption Activity in Water Samples from Portugal Rivers”. L. Quirós, **R. Céspedes**, S. Lacorte, P. Viana, D. Barceló and B. Piña. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 24 (2005) 389-395.

Capítulo 5:

- Publicación científica 7: “Distribution of Endocrine Disruptors in the Llobregat River basin (Catalonia, N.E. Spain). Analysis by LC-MS and Recombinant Yeast Assay”. **R. Céspedes**, S. Lacorte, D. Raldúa, A. Ginebreda, D. Barceló, B. Piña. *Chemosphere*. Vol. 61 (2005) 1710-1719
- Publicación científica 8: “Chemical monitoring and occurrence of alkylphenols, alkylphenol ethoxylates, alcohol ethoxylates, phthalates and benzothiazoles in sewage treatment plants and receiving waters along the Ter River basin of Spain”. **R. Céspedes**, S. Lacorte, A. Ginebreda, D. Barceló. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Vol. 385 (2006) 992-1000.
- Publicación científica 9: “Occurrence and fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in sewage treatment plants and impact on receiving waters along the Ter River (Catalonia, N.E.Spain)”. **Raquel Céspedes**, Sílvia Lacorte, Antonio Ginebreda, Damià Barceló. *Environmental Pollution* Vol. 153 (2008) 384-392

JUSTIFICACIÓN TESIS

Hay un aumento de concienciación sobre la presencia de compuestos disruptores endocrinos (EDCs) en el medio ambiente, que ejercen actividad estrogénica a concentraciones muy bajas, causando efectos sobre el sistema endocrino en la fauna y los seres humanos, y cuya determinación representa un reto por su complejidad y las características propias de estos compuestos. Cada EDC tiene una curva dosis-respuesta propia, pueden ejercer mayores efectos estrogénicos a dosis muy bajas, el momento de la exposición a los EDCs es crítico, tienen largos periodos de latencia y las mezclas de EDCs presentes en el medioambiente pueden tener efectos sinérgicos, antagonísticos, inhibitorios, etc. Los importantes avances producidos en la última década sobre el conocimiento de los EDCs y el desarrollo de técnicas más avanzadas que permitan su determinación, y el aumento de publicaciones, ponen de manifiesto la relevancia de estos compuestos.

Ésta es una **tesis multidisciplinar**, ya que se han estudiado diversos ámbitos:

- Química Analítica: desarrollo y validación de técnicas de cromatografía acoplada a la espectrometría de masas (y masas en tándem) (LC-MS y LC-MS/MS) para la determinación de EDCs.
- Biología Molecular: ensayos de levaduras recombinantes (RYA) para determinar la estrogénicidad total de la muestra.
- Métodos Inmunológicos: ensayos inmunoenzimáticos mediante ELISA para la discriminación de muestras positivas y negativas.

La diversidad de propiedades físico-químicas de las familias de EDCs hace necesario el desarrollo de **métodos multiresiduo** para su determinación. Las bajas concentraciones a las que están presentes en el medioambiente y ejercen actividad estrogénica (ej: estrógenos a ng/L) justifican la necesidad de desarrollar **técnicas** suficientemente **sensibles** para su identificación unívoca y correcta cuantificación. La validación de los métodos optimizados permite garantizar la calidad y fiabilidad de los resultados. Sin embargo, con las técnicas químicas solo se permite identificar y cuantificar los compuestos *target* o diana causantes de la estrogénicidad, mientras que otros compuestos potencialmente estrogénicos *non target* o desconocidos no pueden ser determinados.

Los compuestos disruptores endocrinos causan efectos biológicos (actividad estrogénica), lo cual justifica la necesidad de incluir **técnicas biológicas** para la determinación de los efectos debidos a la presencia de estos compuestos. Para ello se ha determinado la estrogénicidad total de la muestra mediante el RYA y se han validado técnicas inmunoquímicas (ELISA), rápidas, específicas y sensibles que requieren ser validadas mediante técnicas químicas.

La **integración de las técnicas químicas y biológicas** estudiadas en esta tesis, permiten obtener una información integrada de las muestras, combinando las ventajas de ambas, con un aumento de sensibilidad y selectividad, relacionando causa y efecto, siendo muy importante para la correcta y completa determinación de los EDCs y su actividad estrogénica en el medioambiente acuático.

Adicionalmente, el gran número de muestras que han de analizarse en los **Programas de Vigilancia Ambiental** pone de manifiesto la necesidad de desarrollar métodos rápidos, sencillos y económicos, que permitan procesar un gran número de muestras simultáneamente. Con este objetivo se han validado las metodologías desarrolladas y aplicadas en esta tesis doctoral (técnica inmunoquímica ELISA y RYA). Para ello, se propone como procedimiento analítico realizar un previo **screening** o cribado de las muestras mediante **técnicas biológicas** o inmunoquímicas, como RYA y ELISA para determinar respectivamente las muestras con estrogenicidad y las que contienen los compuestos EDCs, para posteriormente, analizar mediante **técnicas analíticas** (LC-MS y LC-MS/MS) únicamente las muestras positivas, para confirmar la presencia de los EDCs y cuantificarlos, con el ahorro en tiempo y coste que comporta. Aunque actualmente existen técnicas analíticas más sensibles y avanzadas, hay que poner en contexto que las técnicas desarrolladas en esta tesis eran avanzadas en el momento en que fueron optimizadas las correspondientes metodologías (2001-2004).

Adicionalmente, la correcta selección de los **compuestos objeto de estudio** en esta tesis ha sido justificada por la relevancia medioambiental que han ido adquiriendo en la última década, demostrada por el incremento de publicaciones sobre estos EDCs. Así mismo, un aspecto a destacar es que algunos compuestos emergentes han sido incluidos en normativas medioambientales de la UE: se ha impuesto la restricción o prohibición del uso de algunos de los EDCs (ej: NPs y NPEOs) en la D. 2003/53/CE; el NP, el OP y el DEHP, han sido también clasificados por el Reglamento REACH como sustancias extremadamente preocupantes; se han establecido Normativas de Calidad Ambiental (NCA) según la D. 2008/105/CE y recientemente se han incluido algunos estrógenos en la D. 2015/454/CE. En USA también se han incorporado algunos estrógenos en la lista CCL4 de la EPA. Consecuentemente, actualmente hay un control sobre el uso y presencia de EDCs en el medio ambiente y se ha constatado una disminución en los niveles de algunos EDCs como los NPs y NPEOs en el medio acuático a raíz de la implementación de las diversas directrices europeas.

En conclusión, el enfoque de esta tesis doctoral es en el área de la química **ambiental**, es decir, se ha centrado principalmente en la integración de técnicas químicas y biológicas para llevar a cabo estudios de monitorización ambiental, para lo cual se han desarrollado metodologías analíticas y la validación de las técnicas biológicas, con el fin de obtener y evaluar los resultados del análisis integrado químico-biológico en las muestras de agua. Adicionalmente, la metodología ha sido aplicada en 3 PVA en ríos portugueses y a lo largo de la cuenca del Ter y el Llobregat, determinando la estrogenicidad y los niveles de EDCs, así como la eficacia de las EDARs para eliminar la carga de EDCs.



CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. COMPUESTOS DISRUPTORES ENDOCRINOS EN EL MEDIOAMBIENTE ACUÁTICO

1.1.1. LA CONTAMINACIÓN DEL AGUA. CONTROL DE LA CALIDAD QUÍMICA.

Los mares y los océanos cubren el 70 % de la superficie del planeta y generan casi las tres cuartas partes del oxígeno que respiramos. No obstante, el hombre sólo puede utilizar directamente un 1 % del agua, y numerosas actividades humanas ejercen una gran presión sobre este recurso. El agua contaminada, independientemente de la fuente de su contaminación, vuelve de un modo u otro a la naturaleza, especialmente al mar y a las capas freáticas, y puede dañar la salud humana y el medio ambiente.

La Figura 1.1., muestra la distribución del agua en la tierra.

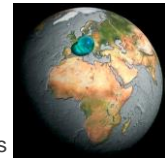
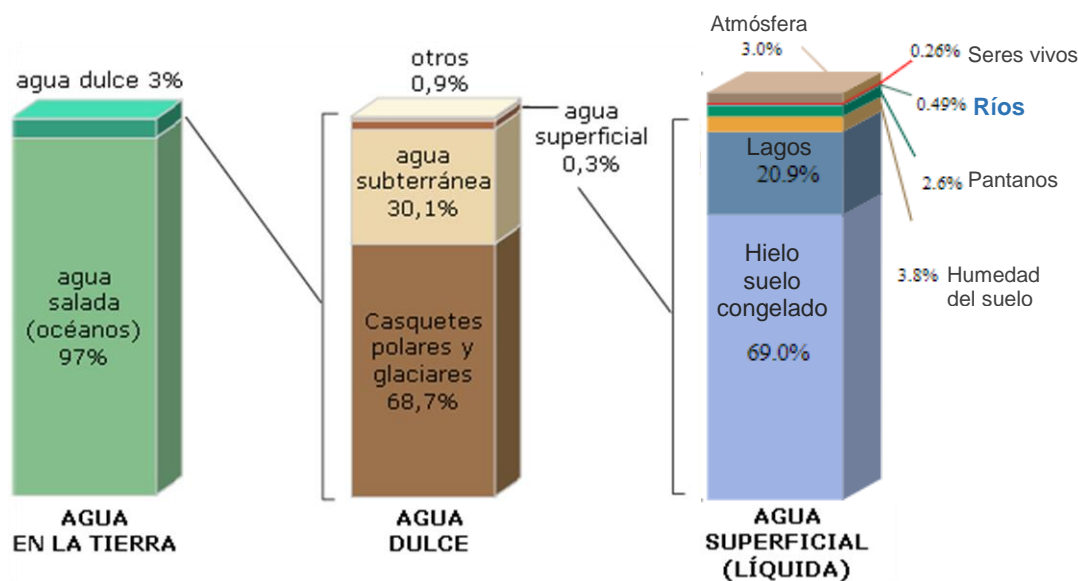


Figura 1.1. Distribución del agua en la tierra. (Fuente: Adaptado de World fresh water resources (Shiklomanov's, I., 1993) USGS (United States Geological Survey)

Las gráficas de barras de la figura 1.1. muestran dónde se localiza el agua de la tierra y en qué forma existe. Así, la barra de la izquierda (a) muestra que casi un 97% de toda el agua del planeta es agua salada que se encuentra en los océanos y tan sólo un 3% es agua dulce; cuya distribución está representada en la barra de en medio (b): La mayoría del agua dulce (68.7 %) es agua congelada de glaciares y capas de hielo, el 30% es agua subterránea y tan solo el 0.3% es agua superficial. La barra de la derecha (c) muestra la distribución del 0.9% restante: gran parte del agua forma parte del hielo congelado en el suelo (69%), el 20.9% los lagos y del resto, tan solo el 0.49% forma parte de los ríos, lo cual representa menos del 0.0002% del agua total en la tierra (Shiklomanov's, 1993).

Por tanto, es de gran importancia preservar la calidad del agua de los ríos (en los que se basan los análisis realizados en esta tesis doctoral), que representa esta pequeña porción del agua total de la tierra, pero que sin embargo constituye la principal parte que abastece a la población para su uso/consumo diario.

El agua es un recurso natural, escaso e indispensable para la vida humana y el sostenimiento del medio ambiente, que es necesario no solamente en la cantidad necesaria, sino también en la calidad precisa. Esta calidad se ha visto amenazada en los últimos años como consecuencia del aumento de la actividad industrial, agrícola y el crecimiento de la población, con el consiguiente incremento en el consumo del agua, que ha aumentado la presión sobre la tierra y los recursos hídricos. Como ejemplo de ello, en los últimos 10 años China ha destruido 28000 ríos a través de la creación de presas, lo cual constituye una cantidad de agua comparable al caudal del río Mississippi (Barceló y col., 2013). El desarrollo industrial ha significado prosperidad para la sociedad, pero también ha dejado como legado la contaminación del medio ambiente, afectando los recursos hídricos y, en última instancia, el bienestar del ser humano.

El agua requiere una constante vigilancia para preservar el origen y la calidad. Los recursos de agua están afectados directa e indirectamente por actividades antropogénicas y factores naturales como el cambio climático. Dos de las consecuencias más evidentes del cambio global son las pérdidas de cantidad y calidad de agua, ambas esenciales para preservar los ecosistemas y la seguridad del agua para uso humano (Petrovic y col., 2011).

El agua salubre y fácilmente accesible es importante para la salud pública, ya sea que se utilice para beber, para uso doméstico, para producir alimentos o para fines recreativos. La mejora del abastecimiento de agua, del saneamiento y de la gestión de los recursos hídricos puede impulsar el crecimiento económico de los países y contribuir en gran medida a la reducción de la pobreza. El cambio climático, el aumento de la escasez de agua, el crecimiento de la población, los cambios demográficos y la urbanización suponen desafíos para los sistemas de abastecimiento de agua (WHO, 2012). En 2010, la Asamblea General de las Naciones Unidas reconoció explícitamente el derecho de todas las personas a disponer de forma continuada de agua suficiente, salubre, físicamente accesible, asequible y de una calidad aceptable, para uso personal y doméstico, así como al saneamiento. Ese mismo año (2010), se cumplió a nivel mundial el Objetivo de Desarrollo del Milenio relativo al agua potable (ODM 7), que consistía en reducir a la mitad la proporción de la población mundial sin acceso sostenible al agua potable. Algunos datos más recientes publicados en julio 2017 por la Organización Mundial de la Salud (OMS, en inglés *WHO, World Health Organization*) refieren que alrededor de 2.100 millones de personas (3 de cada 10 en el mundo) carecen de acceso a agua potable y disponible en el hogar y 4.500 millones (6 de cada 10) carecen de un saneamiento seguro (WHO 2017).

La producción masiva de productos químicos, muchos de los cuales acaban en el medioambiente en donde pueden ser persistentes, ha dado lugar a la contaminación generalizada de éste, alcanzando a prácticamente todos los seres vivos, que estamos expuestos a un cóctel de sustancias químicas sintéticas. La gran mayoría de los 100.000 compuestos químicos que nos rodean, nunca han sido investigados y se desconocen sus efectos sobre la salud humana.

Estos compuestos químicos pueden llegar a los ecosistemas acuáticos a través de las aguas residuales, debido a la ineficiente eliminación en los tratamientos de depuración, pero también a través de efluentes industriales, agrícolas, vertidos directos, deposición atmosférica y escorrentías, entre otros. Una vez en los sistemas acuáticos, la distribución de los contaminantes en diferentes compartimentos es debida a la combinación de diversos factores que incluyen el transporte a través del agua y los animales (Myers y col., 2003) y es función de la matriz donde se liberan y de las propiedades físico-químicas de los propios

contaminantes, como presión de vapor, coeficiente de reparto octanol agua (K_{ow}) y solubilidad en agua. Los compuestos químicos, sus productos de transformación, y/o sus mezclas pueden producir efectos negativos en la calidad del agua de ríos, lagos y mares, y en los organismos que las habitan, incluyendo los peces (Loos et al., 2009; Kuzmanovic et al., 2015). Los compuestos altamente lipofílicos tienden a almacenarse en los tejidos grasos de los organismos. La bioamplificación y bioacumulación de estos contaminantes en los niveles superiores de la cadena trófica conlleva la dispersión de compuestos lejos de su punto de origen, como, por ejemplo, en zonas árticas y peces de aguas profundas, y pueden significar concentraciones elevadas en los organismos tras años de exposición. Algunos compuestos como el DDT, utilizado masivamente como insecticida y plaguicida, y sus metabolitos, se siguen encontrando hoy en día en sedimentos y organismos acuáticos en el rango de ng/g, pese a que su uso se prohibió en los años 70 (Agencia Internacional para las Sustancias Tóxicas, 2002).

1.1.2. COMPUESTOS DISRUPTORES ENDOCRINOS. ANTECEDENTES Y DEFINICIÓN.

En los últimos tiempos se está prestando cada vez más atención a la presencia en el medio ambiente de sustancias químicas, capaces de alterar el funcionamiento normal del sistema endocrino en los animales e incluso en el propio hombre (Colborn y col., 1996). Existe un gran número de sustancias, ya sean de origen natural o antropogénico, a las que se les atribuye esta capacidad. En este sentido, el aumento de la producción de compuestos orgánicos sintéticos y su posterior presencia en el medio ambiente ha aumentado la preocupación acerca de estos compuestos, los llamados disruptores endocrinos (EDCs, *Endocrine Disrupting Compounds*).

En realidad, hace décadas que se conocen los riesgos asociados a algunas de estas sustancias y su habilidad para interferir en la capacidad de reproducción de muchas especies, tal como denunció Rachel Carson (Carson y col., 1962) en su libro “La primavera silenciosa” (www.silentspring.org/). Desde mediados del siglo XX biólogos y naturistas han ido documentando cómo numerosas especies de fauna silvestre, muy diferentes entre sí y localizadas en distintas áreas del planeta, están sufriendo graves problemas debido a la alteración de su sistema endocrino por exposición a EDC (Colborn y col., 1996). Este libro, publicado en 1962, dio el primer aviso de que ciertos productos químicos artificiales, como el DDT, se habían difundido por todo el planeta, hasta en las tierras vírgenes más remotas, y estaban afectando el equilibrio entre las especies. Puso en evidencia como estas sustancias se iban acumulando y magnificando en los organismos vivos. Aquel libro, que marcó un hito, presentó pruebas del impacto que dichas sustancias sintéticas tenían sobre las aves y demás fauna silvestre y anticipaba que podrían reproducirse daños similares en seres humanos. Sin embargo, no ha sido hasta hace unos años que se han advertido los trastornos en el desarrollo sexual y la reproducción, no sólo en numerosas poblaciones animales sino también en los seres humanos.

En el libro “*Our Stolen Future*” (Nuestro futuro robado, www.ourstolenfuture.org/) escrito por Theo Colborn y col., en 1996 (Colborn y col., 1996), se reunieron por primera vez las evidencias obtenidas después de décadas de investigación, de estudios de campo, experimentos de laboratorio y estadísticas humanas y se presentó un extenso informe de las alteraciones provocadas por diferentes sustancias químicas sobre el sistema endocrino. Estas alteraciones se asocian con diferentes tipos de cánceres, descenso de la calidad y

cantidad de los espermatozoides, endometriosis, etc. Por otro lado, se identificó el riesgo para las generaciones venideras del ser humano.

Las concentraciones de EDCs en nuestro organismo multiplican por varios millares los niveles de estrógenos naturales libres, es decir, los que no están unidos a proteínas siendo así biológicamente activos. Sin embargo, los datos indican que podrían ser muy pequeñas, sobre todo si la exposición tiene lugar antes del nacimiento. La exposición a estos compuestos por los organismos en proceso de desarrollo, especialmente en el estado fetal, son de especial preocupación ya que en estos períodos los efectos disruptores suelen ser de tipo irreversible y permanente, mientras que los efectos en adultos pueden ser reversibles (Myers y col., 2003). El interés en los efectos en la salud pública de los EDCs respecto a los efectos a largo plazo y a bajas dosis de exposición está aumentando (Kabir y col., 2016).

Otro problema asociado a los EDCs es que no se ha podido definir una estructura química única que permita identificar y clasificar a un compuesto químico “mimetizador” de las hormonas endógenas (Sonnenschein y col., 1998).

Definición de los EDCs

El término «disruptores endocrinos» fue propuesto en una conferencia organizada por la Dra. Theo Colborn, del *World Wildlife Fund*, en Wingspread, Wisconsin, en el año 1991. El objetivo de esta conferencia fue analizar la evidencia disponible acerca del efecto de los contaminantes químicos ambientales sobre el sistema endocrino de animales salvajes. Los 21 participantes de esta conferencia firmaron la Declaración de Wingspread, un documento en el cual se identificaban diferentes áreas de preocupación:

- La primera era el aumento del número de nuevos productos químicos que no se valoraban de forma adecuada desde el punto de vista endocrinológico. Desde que en 1953 se descubrió que el plaguicida DDT tenía actividad estrogénica, otros compuestos fueron identificados como estrogénicos, entre ellos ciertos PCB (bifenilos policlorados). A raíz de la restricción del uso de PCB y DDT en los años setenta, la mortalidad de los animales salvajes del ecosistema de los Grandes Lagos en los EE.UU. disminuyó notablemente, pero los animales supervivientes presentaban entonces alteraciones en los sistemas reproductivo, endocrino, neurológico e inmune. Este hecho sugería bien que la acción residual de los compuestos prohibidos se revelaba una vez que la mortalidad disminuía debido a la reducción de los valores ambientales, o bien que existía contaminación por otros compuestos con actividad endocrina. En una ponencia en la conferencia de Wingspread se presentaron datos que demostraban que ciertos plásticos liberan contaminantes que poseen actividad estrogénica y se introdujo un bioensayo para la identificación de estrógenos (E-SCREEN), que fue utilizado a partir de entonces como criba o *screening* para identificar compuestos estrogénicos. Sorprendentemente, un gran número de las muestras analizadas dieron resultados positivos. Más tarde se identificaron otros tipos de disruptores endocrinos: antiandrógenos (como el vinclozolin), inhibidores de la aromatasas (como la atrazina) o disruptores de la función tiroidea (como los PCB) (Wingspread, 1991).

Cada año se introducen unas 1000 sustancias químicas sintéticas nuevas (Glynn y col., 1999) y no se sabe cuáles pueden tener un efecto disruptor ya que cada día se identifican nuevos disruptores endocrinos o nuevas manifestaciones del problema y tan solo se realizan evaluaciones de riesgos de unas pocas. Así, de las ~100,000 sustancias químicas que había en 2001 en el mercado de la UE, incluidas en el inventario

EINECS (inventario europeo de sustancias químicas comercializadas existentes), aproximadamente ~25,000 tenían información limitada de su toxicidad y ~75,000 sust. químicas tenían pocos o ningún dato de su toxicidad. De ellas tan solo ~10,000 eran prioridades de la UE en evaluación de riesgos, y de las 22 evaluaciones realizadas en el año 2000, tan solo 4 estaban disponibles al público. El Reglamento europeo REACH (EC 1907/2006), Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Sustancias Químicas en la Unión Europea, en vigor desde el 2007, apoyado por los científicos y con la oposición de la industria, contempla el registro de 30.000 sustancias químicas, con un proceso de evaluación sistemática de los compuestos químicos para conocer y prevenir sus efectos en la salud humana y el medioambiente. La base de datos de la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos (ECHA) (<http://echa.europa.eu>) contenía 15.387 sustancias químicas registradas en 15.03.17 y actualmente 21.405 sustancias químicas ya han sido registradas para uso comercial (24.10.18), en cumplimiento del Reglamento REACH (<https://echa.europa.eu/es/information-on-chemicals/registered-substances>). A pesar del gran avance que supone, se evalúa únicamente la toxicidad de los compuestos químicos individualmente.

Se conoce o se sospecha que cerca de 800 compuestos químicos son capaces de interferir con los receptores hormonales, síntesis o cambios hormonales. Sin embargo, solo una pequeña fracción de estos compuestos ha sido investigada en tests capaces de identificar efectos endocrinos en organismos intactos. Por otra parte, la lista TEDX (*The Endocrine Disruption Exchange*), que identifica químicos que han mostrado evidencia de disrupción endocrina en investigación científica, actualmente tiene 1484 compuestos (septiembre 2018, (<https://endocrinedisruption.org>))

- Una segunda causa de preocupación fue la posibilidad de detectar un elevado número de contaminantes ambientales diferentes que actuaban como disruptores endocrinos en la grasa de los animales salvajes. Las concentraciones de estos productos en sangre o en grasa varían más o menos independientemente unos de otros, por lo cual no puede utilizarse uno de estos contaminantes como marcador de todo el conjunto. Por ejemplo, los valores de DDT son buenos marcadores exclusivamente para la exposición a este compuesto y en la misma población podemos encontrar individuos con concentraciones bajas de DDT y altas de endosulfano, y otros con los valores opuestos. Por tanto, los estudios epidemiológicos en los que se relacionan los valores de exposición interna a un producto químico (por ejemplo, DDT) con un efecto observable (p. ej., cáncer de mama) no permiten obtener ninguna conclusión acerca del papel de los xenoestrógenos en relación con el efecto estudiado. Por tanto, la exposición a múltiples contaminantes requiere nuevas estrategias para medir el efecto aditivo de estas sustancias, siendo necesario identificar un marcador de la carga xenoestrogénica total (Olea y col., 2004).

El término “disruptor endocrino” fue definido durante el “Congreso Europeo en Disruptores Endocrinos” que se celebró en 1996 en Weybridge (Colborn y col., 1996) como sigue:

“Sustancia exógena que causa efectos adversos sobre la salud de un organismo intacto o su progenie como consecuencia de cambios en la función endocrina mediante interferencia con la síntesis, secreción, transporte, unión o eliminación de hormonas naturales en el cuerpo responsables del mantenimiento de la homeostasis, reproducción, desarrollo y/o comportamiento”.

La definición según la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (USEPA):

"Un disruptor endocrino es un agente exógeno que interfiere en la producción, liberación, transporte y metabolismo, unión, acción o eliminación de las hormonas naturales en el cuerpo, responsables de mantener la homeostasis y regulación de los procesos de desarrollo" (Kavlock y col., 1996).

La definición con la cual la Comisión Europea ha descrito a los EDCs:

"Una sustancia exógena o mezclas de ellas, capaces de alterar la función o funciones del sistema endocrino, y por consecuencia, causar efectos adversos sobre la salud de un organismo, o en su progenie, o en poblaciones o subpoblaciones" (CEC, COM, 1999; IPCS 2002).

Y la definición más extendida y aceptada en el contexto de la evaluación del riesgo medioambiental y humano es proporcionada por WHO/IPCS (WHO, 2012):

"Sustancias químicas capaces de alterar el equilibrio hormonal y la regulación del desarrollo embrionario y, por tanto, con capacidad de provocar efectos adversos sobre la salud de un organismo o su progenie".

Algunas definiciones como la de la US EPA o la adoptada por la Sociedad Endocrina, son similares y omiten intencionalmente referencia a que los EDCs produzcan efectos "adversos", porque la naturaleza de interferencias químicas con acción hormonal depende en parte del momento de exposición (Zoeller y col., 2012). Otras en cambio, como la establecida por la WHO, incluye el término "efecto "adverso", limitando por tanto el alcance de los compuestos químicos incluidos para las evaluaciones de riesgo y restricciones, de forma que la CE y la EFSA autoridad europea en seguridad alimentaria han adoptado la definición de la OMS (Muller, 2013, Futran Fuhrman)

El sistema endocrino guía el desarrollo, crecimiento, reproducción y comportamiento de los seres humanos y los animales. Es responsable de controlar un amplio número de procesos en el cuerpo, incluyendo algunos precoces como la diferenciación celular durante el desarrollo y formación de los órganos, así como la mayoría de tejidos y funciones de los órganos en la edad adulta. Algunas glándulas son la pituitaria, el tiroides, las glándulas renales, los ovarios y los testículos. El sistema endocrino tiene 3 componentes principales: las glándulas endocrinas, las hormonas y los receptores en las células diana.

Los principales puntos a tener en cuenta del sistema hormonal o endocrino son:

- Es un sistema complejo de comunicaciones que regula funciones vitales del organismo, incluido el desarrollo embrionario
- Está relacionado estrechamente con el sistema nervioso e inmune.
- Está formado por glándulas, hormonas y receptores hormonales.
- Las hormonas son sustancias químicas que actúan como mensajeros.
- Una misma hormona puede regular funciones muy diferentes en órganos diferentes.
- Las hormonas son muy eficaces y actúan a concentraciones muy bajas.
- Cada persona presenta un equilibrio hormonal diferente.
- El sistema hormonal actúa conjuntamente con el sistema nervioso e inmunitario.

Los EDCs tienen las mismas características que las hormonas y actúan como ellas, uniéndose a los receptores a concentraciones muy bajas, pudiendo interferir a menudo con todos los procesos controlados

por hormonas. Por tanto, pueden alterar la función endocrina que provoca efectos adversos en la salud humana y la fauna (UNEP y WHO 2013). En la tabla 1.1. se describen las principales características de las hormonas vs los EDCs (con las diferencias marcadas en azul) y en la figura 1.2. se describe la acción hormonal:

Tabla 1.1. Comparación de las Hormonas vs los EDCs. Adaptado de (UNEP y WHO 2013; Kabir y col., 2015). Se marca en negro las características coincidentes entre hormonas y EDCs

Hormonas	Disruptores Endocrinos
<p>Actúan via receptores hormonales</p> <ul style="list-style-type: none"> - Algunos tienen múltiples receptores - Clases y subtipos de receptores específicos a tejidos - Las hormonas normalmente se unen de forma similar a todos los subtipos de receptores <p>Activas a bajas dosis</p> <ul style="list-style-type: none"> - Los niveles en sangre no siempre reflejan actividad - Pueden estar unidos al serum de las proteínas con % libre en sangre <p>- No bioacumulación</p> <p>Relaciones dosis-respuesta no lineares</p> <ul style="list-style-type: none"> - Siempre saturable con rango dinámico variable - Pueden mostrar dosis respuesta no monotónicas - Diferentes efectos a altas dosis que a bajas dosis <p>Efectos específicos en tejidos y etapas de la vida</p> <p>Efectos en el desarrollo permanentes</p> <ul style="list-style-type: none"> - Programa cerebro y sistema endocrino para función adulta <p>Diferentes endpoints varían en sensibilidad</p>	<p>Algunos actúan via receptores hormonales</p> <ul style="list-style-type: none"> - Causarán funciones anormales en los receptores - Probables interacciones isoforma-específicas <p>Algunos actúan a bajas dosis, otros variables</p> <p>Los niveles en sangre no siempre reflejan actividad</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pueden estar unidos al serum de las proteínas - Efectos en los niveles hormonales en sangre pueden no reflejar en acción hormonal <p>Possible bioacumulación</p> <p>Relaciones dosis-respuesta no lineares</p> <ul style="list-style-type: none"> - Siempre saturable con rango dinámico variable - Pueden mostrar dosis respuesta no monotónicas - Diferentes efectos a altas dosis que a bajas dosis <p>Efectos específicos en tejidos y etapas de la vida</p> <p>Efectos en el desarrollo permanentes</p> <ul style="list-style-type: none"> - Interfieren con procesos de programación <p>Diferentes endpoints varían en sensibilidad</p>

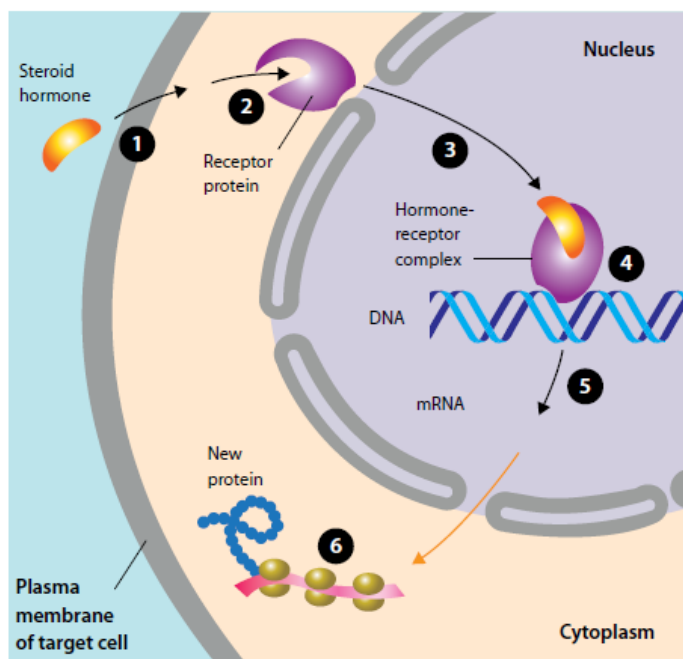


Figura 1.2. Ejemplo de acción hormonal (WHO, 2012)

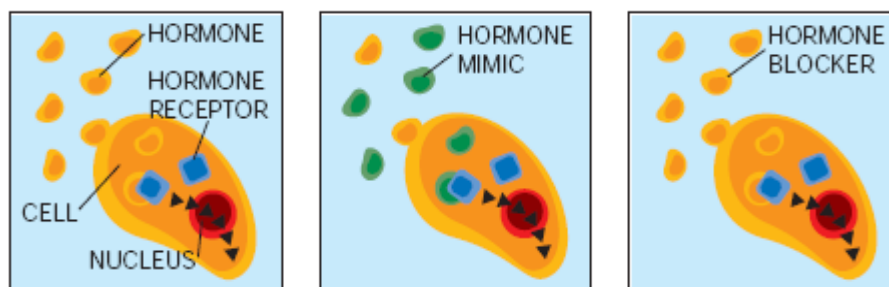
Muchas hormonas actúan uniéndose a receptores específicos (2) estimulando la síntesis de nuevas proteínas (6), las cuales controlan las funciones de los tejidos. Algunas hormonas actúan vía receptores de la membrana.

1.1.3. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS EDCs. RELACIÓN DOSIS RESPUESTA.

Debido a que los EDCs tienen características muy diversas y no comparten similitudes en estructuras y naturalezas, es bastante difícil predecir sus mecanismos de acción (Kabir y col., 2015).

Las acciones biológicas de las hormonas sintetizadas dentro de un organismo, tales como los estrógenos y progesterona entre otros, son mediadas por proteínas receptoras de alta afinidad localizadas en el interior de las células diana. En definitiva, cada hormona y su receptor particular experimentan una atracción mutua. Su interacción inicia una cascada de sucesos que llevan a innumerables efectos asociados con cada hormona en particular. Así, los efectos sobre el equilibrio hormonal de los disruptores endocrinos se explicarían por su capacidad de actuar a diferentes niveles (Pombo y col., 2005).

Los EDCs son capaces de interactuar con los receptores hormonales de las células interfiriendo en la acción de las hormonas y provocando así una disfunción en los procesos fisiológicos regulados por dichas hormonas. Hay varios mecanismos por los cuales una sustancia interfiere en el sistema endocrino y la figura 1.3. muestra los tipos de respuesta y la figura 1.4. muestra los distintos comportamientos de los EDCs en comparación a una hormona del cuerpo.



a) Respuesta normal R. Normal inhibida b) Respuesta agonista Ej: estrogénica c) Respuesta antagonista – Ej: R. anti-estrogénica

Figura 1.3. Tipos de respuesta cuando una sustancia EDC interfiere en el mecanismo del sistema endocrino.

Algunos de los compuestos disruptores endocrinos actúan potenciando o bloqueando los efectos feminizantes que producen las hormonas sexuales femeninas. Estas hormonas son conocidas como estrógenos, mientras que los compuestos estrogénicos o anti-estrogénicos son compuestos exógenos (que no comparten necesariamente una estructura química similar) pero que pueden unirse a los receptores estrogénicos e inducir o atenuar una respuesta (Kabir y col., 2015). Otros compuestos actúan mimetizando o bloqueando los efectos masculinizantes de las hormonas sexuales masculinas u andrógenos y se denominan sustancias androgénicas o antiandrogénicas.

La figura 1.4. describe los mecanismos de acción de los disruptores endocrinos y la unión a los receptores diana, que generalmente pueden dividirse en cuatro formas distintas de actuación.

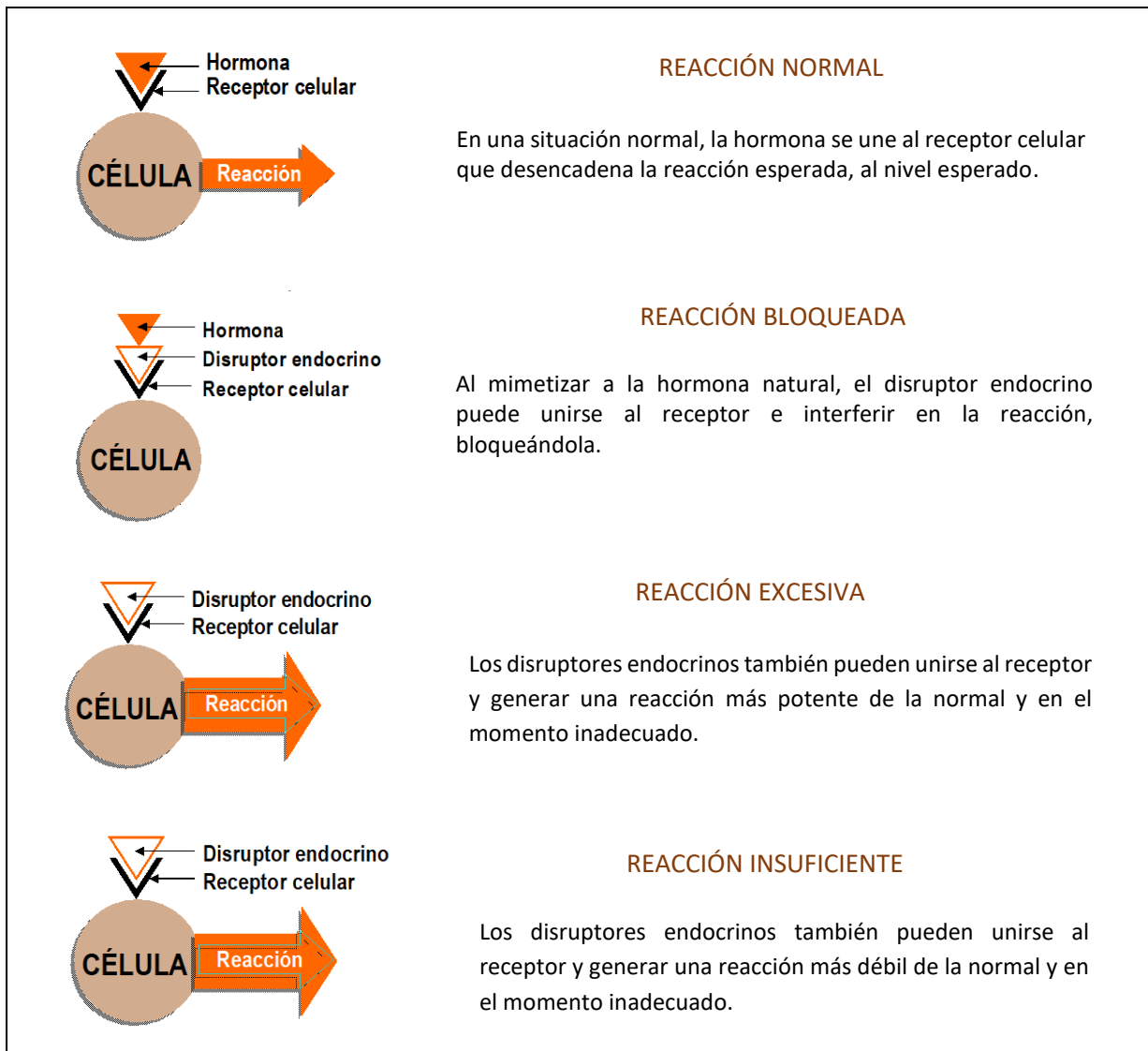


Figura 1.4. Comportamientos de los disruptores endocrinos comparados con el comportamiento de una hormona normal del propio cuerpo (Warhurst, 2004). Fuente: ISTAS 2004.

- *Mimetizar la acción de las hormonas*, ya que puede actuar como una falsa hormona natural (agonista) uniéndose al receptor y activándolo, provocando una respuesta. Por ejemplo, los que actúan como estrógenos se denominan estrógenos ambientales. Entre estos se encuentran el DDT, algunos PCBs y muchos fitoestrógenos, compuestos químicos no esteroideos, que se encuentran en los vegetales, pero son similares a los estrógenos humanos.
- *Antagonizar la acción de las hormonas*, es decir, puede unirse al receptor de la hormona endógena evitando que se una a la verdadera hormona y evitando que se produzca una respuesta normal (antagonista). Ejemplos de químicos que bloquean o antagonizan hormonas son anti-estrógenos (por ejemplo, algunos PCBs o el fungicida vinclozina) y anti-andrógenos.
- *Alterar su patrón de síntesis y metabolismo*, puede actuar interfiriendo el proceso de síntesis de hormonas o receptores o el proceso de eliminación de dichas hormonas. Como por ejemplo el PBDE-99 (retardante de llama) que altera la síntesis de la hormona tiroidea.
- *Modular los niveles de los receptores correspondientes*, como el bisfenol A que interfiere en el receptor estrogénico.

Inicialmente, la mayoría de los estudios llevados a cabo en relación con los EDCs se centraban en el estudio de las interferencias ocasionadas en la activación genética producida por la hormona estradiol (E2) (que es el estrógeno endógeno más potente). Así se vió que muchos EDCs pueden estimular los genes y otros procesos de forma similar a como lo hace el E2, mientras que otros EDCs antagonizan o bloquean la síntesis del E2. Sin embargo, en los últimos 20-25 años, los EDCs han demostrado interferir la acción de muchas otras hormonas endógenas, incluidas las hormonas esteroideas, tiroideas, retinoides, y otros factores de transcripción y de crecimiento, así como otras moléculas que no se consideran hormonas (Myers y col., 2003). La mayoría de los compuestos estrogénicos o xenoestrógenos se consideran débiles ya que su afinidad respecto a los receptores que se encuentran en las células es mucho menor que la del estradiol. Pero debido a su carácter lipofílico y persistencia en el medio ambiente, estos compuestos pueden acumularse en tejidos de animales hasta alcanzar niveles fisiológicamente activos. Actualmente, las investigaciones científicas llevadas a cabo muestran que los mecanismos de los EDCs son mucho más detallados de lo que inicialmente se reconoció (Diamantis-Kandarakis y col., 2009).

El impacto de los EDCs depende de una gran variedad de factores incluyendo la época del ciclo vital en la que ocurre la exposición, y la duración y nivel de dicha exposición. Hasta hace poco, la gran vulnerabilidad del embrión y el hecho de que las consecuencias de la exposición fetal pudieran ser completamente diferentes de las observadas en la exposición adulta no habían sido considerados. La alteración de la expresión génica durante el desarrollo embrionario de un organismo puede llevar a cambios drásticos en su desarrollo, y es cuando la disrupción endocrina puede ser irreversible (Myers y col., 2003), pudiendo ser transgeneracional. Muchas veces las consecuencias de la exposición fetal a estos compuestos pueden no ser reconocibles hasta la juventud del individuo, momento en el que, por ejemplo, se ponen de manifiesto las anomalías relativas al funcionamiento del sistema reproductor.

1.1.4. CLASIFICACIÓN Y ORIGEN DE FAMILIAS DE COMPUESTOS DISRUPTORES ENDOCRINOS

Los EDCs pueden tener un origen natural o sintético (Diamanti-Kandarakis y col., 2009):

- **EDCs de origen natural: hormonas**, que se hallan de forma natural en el cuerpo de humanos y animales, y **sustancias químicas naturales** presentes en plantas y hongos, como los fitoestrógenos y micoestrógenos, que exhiben también actividad estrogénica. La consideración que se da a las hormonas naturales y a los fitoestrógenos de disruptores endocrinos es un tema discutido, ya que para algunos autores este término debería reservarse a las sustancias exógenas al organismo (Olea, N., 2000). Sin embargo, la presencia en el medio ambiente de sustancias naturales como las hormonas endógenas supone un problema medioambiental debido a su elevada potencia estrogénica.
- **EDCs o sustancias producidas artificialmente:**
 - las hormonas sintéticas, usadas fundamentalmente como anticonceptivos y para los tratamientos de sustitución hormonal o como aditivos de alimentos de animales, y
 - las sustancias químicas diseñadas para uso industrial (bifenilos policlorados y dioxinas, alquilfenoles etoxilados, ftalatos, bisfenol A, polibromo difenil éteres, etc) o en agricultura (plaguicidas) que son sospechosos de causar un efecto disruptor. La potencia de estas sustancias químicas es generalmente varios órdenes de magnitud más débil que la de las hormonas endógenas.

La lista de EDCs incluye una gran variedad de familias de compuestos químicos, entre los que cabe mencionar los siguientes (Colborn y col, NFR), de acuerdo a la clasificación en tres grupos conforme a Warhurst y col.,2004:

(1) Sustancias químicas industriales:

- Compuestos orgánicos policlorados: dioxinas, furanos y bifenilos policlorados:
 - Los bifenilos policlorados (PCBs): actualmente prohibidos, se usan en la fabricación de material electrónico, pinturas y plásticos (DeRosa y col., 1998). Tras evaporarse contaminan suelos, aguas y aire, estando presentes de forma global, especialmente en el ártico. A medida que van ascendiendo en la cadena alimenticia, la concentración de PCBs en los tejidos animales puede aumentar hasta 25 millones de veces (Colborn y col, NFR).
 - Las dioxinas o policlorodibenzodioxinas (PCDDs) y los policlorodibenzofuranos (PCDFs): se liberan al medio como subproductos de ciertos procesos químicos, fundamentalmente procesos térmicos y químicos que tienen lugar entre 250 y 3400 °C en presencia de cloro, bromo o flúor y compuestos orgánicos alifáticos o aromáticos. Estas condiciones se dan, por ejemplo, en el caso del blanqueo de la pulpa del papel, la producción de ciertos plaguicidas (organoclorados), la manufactura de PVC, en procesos metalúrgicos y en la incineración de residuos.
 - Compuestos organo-estánicos: como el tributilestano, que se emplea sobre todo como alguicida en pinturas para los barcos, como conservante de la madera, desinfectante, y como biocida para sistemas de refrigeración.
 - Detergentes no iónicos de tipo alquilfenol etoxilado (APEs): los nonilfenol etoxilados (NPE) y los octilfenol etoxilados (OPEs) y sus productos de degradación, los alquilfenoles, el octilfenol (OP) y en particular el nonilfenol (NP), que es mayoritario, más tóxico y tiene mayor potencial estrogénico que los APEs (Pojana y col., 2004a). Los fabricantes añaden nonilfenoles al poliestireno y al cloruro de polivinilo (PVC), como antioxidante para que éstos plásticos sean más estables y menos frágiles (NFR).
 - Ftalatos: utilizados en la fabricación de plásticos PVC, en pinturas, tintas, adhesivos, juguetes, laca de pelo, perfumes, etc. El dietil hexil ftalato (DEHP) se añade generalmente a los plásticos para hacerlos más flexibles (Harris y col., 1997).
 - Bisfenol A (BPA): es un ingrediente clave de las resinas epoxi y los plásticos policarbonatos, empleados en empastes dentales, recubrimientos dentales y envases de alimentos (recubrimiento interior de los envases metálicos de estaño).
 - Retardantes de llama bromados: los compuestos polibromo difenil éteres (PBDE) son de uso habitual en la industria textil o en la fabricación de materiales plásticos para electrodomésticos y muebles. Extremadamente persistentes, es posible detectarlos en animales, aguas o muestras de aire muy alejadas de las zonas de producción y uso.
 - Parabenos: se emplean como conservantes en cosméticos y como agentes antibacterianos en algunas pastas de dientes.
 - Percloro-etileno: utilizado en la limpieza y desengrase de piezas y superficies metálicas.
 - Resorcinol y estireno: se emplean en la fabricación de adhesivos, tintas, fármacos y cosméticos.
 - El butil hidroxianisol (BHA): es un alimento antioxidante.

(2) Hormonas naturales:

Esteroides o estrógenos esteroideos, bien sean naturales o sintéticos. Incluyen:

- Hormonas sexuales: tienen una gran actividad estrogénica, como el 17- β -estradiol (E2) y sus principales metabolitos, el estriol (E3) y la estrona (E1) y sus conjugados (los sulfatos y glucurónidos). Están presentes de forma natural en las hembras y en menor extensión en los machos y son secretados por la orina. Entre las sintéticas destacan el etinilestradiol (EE2) y el mestranol (MES). Dentro de las hormonas sexuales esteroideas, se encuentran los andrógenos, estrógenos y progestógenos (Desbrow y col., 1998; Pojana y col., 2004a).
- Fitoestrogenos y micoestrógenos: son compuestos naturales producidos por plantas y hongos respectivamente. Los fitoestrógenos son estructuralmente parecidos al 17- β -estradiol y se unen a los receptores estrogénicos aislados con afinidades de 500 a 1000 veces menor que el E2. Incluyen las clases de los componentes como las isoflavonas, lignanos, coumestanos y los ácidos lactonas resorcílico (Castanheira, A.P., Tesis, 2012).

(3) Plaguicidas: existe una extensa bibliografía sobre los efectos del DDT en la reproducción de especies salvajes. Los DDT fueron plaguicidas de uso corriente entre los años 50 y 70 y sus efectos tóxicos se han dejado ver a largo plazo en el medio ambiente. La normativa europea prohíbe su uso agrícola desde 1978 y la convención de Estocolmo del 2001 ha restringido radicalmente su producción y utilización (<http://www.pops.int/>). Otros plaguicidas capaces de alterar los sistemas hormonales de los organismos son el lindano, el metoxicloro (autorizado en España), la atrazina y la simazina, el endosulfán (prohibido en numerosos países, pero de amplio uso en la agricultura española), el hexaclorobenceno (HCB), piretroides sintéticos, la vinclozolina, dicofol y clordano entre otros (Colborn y col, NFR).

- Metales: Otras sustancias que recientemente se han sugerido como EDCs son metales, como el cadmio, plomo, mercurio, arsenito y selenito, que podrían interaccionar con los receptores esteroideos (DeRosa y col., 1998; Stoica y col., 2000). El plomo es un compuesto natural utilizado regularmente (Kavir y col., 2015) que recientemente ha sido incluido en julio de 2018 en la lista de sustancias extremadamente peligrosas del Reglamento REACH (<https://echa.europa.eu/es/candidate list>).

Otros autores clasifican los EDCs en base a otros criterios, como por ejemplo Gore y col., (2014), que agrupan estos compuestos en base a su uso o aplicación en:

- Químicos en productos que utilizamos en nuestra vida diaria, como por ej. Productos para el cuidado personal (PCP), productos infantiles, electrónicos (incluyendo el plomo), retardantes de llama bromados, etc.
- Compuestos en embalajes en compuestos con alimentos, como por ej. el BPA.
- Plaguicidas

En esta tesis se han seleccionado varios compuestos con capacidades conocidas o sospechosas de alterar el sistema endocrino que pertenecen a diferentes familias y con origen tanto antropogénico como natural. Según la clasificación hecha en el apartado anterior, se han seleccionado las hormonas esteroideas sexuales naturales y sintéticas. Dentro de los disruptores endocrinos medioambientales se han seleccionado, por su gran uso industrial, los alquilfenoles, el bisfenol A y los ftalatos, y por su uso agrícola, los plaguicidas.

1.1.5. EFECTOS EN LOS SERES VIVOS POR EXPOSICIÓN A COMPUESTOS DISRUPTORES ENDOCRINOS

Aunque los EDCs están presentes en el medioambiente, para que exista un efecto, tiene que producirse una exposición al/os químico/s EDs. Los organismos pueden ser expuestos a los EDCs a través de su dieta, por inhalación, a través de la piel, penetrando en la sangre y en tejidos específicos y afectando al sistema endocrino. Mientras algunos EDCs son rápidamente transformados por la luz solar, bacterias y/o procesos químicos, otros resisten la descomposición y pueden persistir en el medioambiente durante meses o años. Por tanto, no es posible definir una ruta típica o duración de la exposición, sino que ésta puede variar considerablemente de un EDC a otro.

Hay un transporte global de EDCs a través de procesos naturales (océano y corrientes de aire), así como a través del comercio, produciendo una importante exposición en todo el mundo de animales y humanos a EDCs. (WHO/PNUMA 2013).

Los EDCs que alteran la acción hormonal pueden actuar en diferentes etapas en la vida. El momento de exposición y acción hormonal o del EDC a menudo determina la fuerza de su impacto. El momento y los niveles de exposición son críticos para entender porqué algunas etapas de desarrollo como el periodo fetal, durante el cual se forman los órganos y tejidos, son mucho más sensibles a los EDCs que otros. Cuando un tejido se está desarrollando, es más sensible a la acción hormonal y por tanto de EDCs que pueden perturbar los niveles hormonales normales, llevando a cambios en el desarrollo del tejido, que pueden conferir sensibilidad a enfermedades más tarde en la vida. Se han desarrollado las ventanas críticas del desarrollo ("*critical window of development*").

Algunos EDCs producen efectos que pueden incluso transferirse a otras generaciones (efectos transgeneracionales) mediante la epigenética (cambios en la expresión genética heredables que no implican cambios en la secuencia de ADN), como por ejemplo la exposición de mujeres o animales embarazados que pueden afectar el desarrollo de varias generaciones y manifestarse décadas después (largos periodos de latencia).

Existen numerosos estudios científicos que confirman que muchos de los EDCs estudiados hasta la fecha tienen una amplia gama de efectos sobre la salud humana y la fauna silvestre basados en: efectos observados en animales silvestres. experimentos en animales de laboratorio (*in vivo*) y en cultivos celulares (*in vitro*), efectos observados en personas y estudios epidemiológicos

Actualmente hay un conocimiento sobre la **exposición a EDCs en animales y humanos** mucho mayor que hace 20 años, por la diversidad de químicos identificados como EDCs y las rutas de exposición y niveles en animales y humanos. Ambos están expuestos a múltiples EDCs al mismo tiempo y constituye una preocupación justificable que diferentes EDCs pueden actuar conjuntamente y resultar en un incremento del riesgo de los efectos adversos en la salud humana y animal. La exposición a EDCs sucede durante periodos vulnerables del desarrollo animal y humano, desde la fertilización hasta el desarrollo fetal y a través del amamantamiento de las crías, lo cual es de particular preocupación. Los niños pueden tener exposiciones más altas debido a sus actividades de la mano a la boca, así como mayor índice metabólico.

En general, la vulnerabilidad de especies dadas dependerá de las propiedades intrínsecas del compuesto químico, de la magnitud, duración, frecuencia y medio de exposición y de la vía en la cual algunas especies pueden absorber, distribuir, transformar y eliminar sustancias. Dependerá también de la

sensibilidad de órganos específicos a diferentes etapas del desarrollo. Actualmente, solamente se miden y evalúan una pequeña parte de los químicos y los EDCs, haciendo que sea “la punta del iceberg”. Es necesario llevar a cabo evaluaciones más amplias de humanos y animales a mezclas de EDCs (WHO/PNUMA 2013).

Efectos en la fauna por exposición a EDCs

La exposición de la fauna a los EDCs en el medioambiente puede ser a través del aire, agua, comida, suelo o sedimentos y depende de las propiedades y persistencia de los EDCs. Mientras algunos EDCs son rápidamente transformados por la luz solar, bacterias y/o procesos químicos, otros resisten la descomposición y pueden persistir en el MA por meses o años. Por tanto, no es posible definir una ruta típica o duración de la exposición, sino que ésta puede variar considerablemente de un EDC a otro. Los organismos pueden ser expuestos a estos EDCs a través de su dieta, por inhalación o absorción a través de la piel, entrando en la sangre de tejidos específicos y afectando al sistema endocrino. Las exposiciones de EDCs en animales se evalúan a través de medidas, de su medioambiente externo, agua, aire, suelo, sedimentos o comida y analizando los químicos en sus tejidos (WHO, 2013).

El agua es la principal ruta de exposición de la fauna a EDCs. Su importancia depende del tipo de químico. Algunos EDCs son más solubles en agua (ej: algunos pesticidas, estrógenos, etc) y son detectados a niveles entre ng/L y µg/L. Una vez los efluentes son vertidos en el medio acuático, los EDCs liberados serán diluidos en las aguas del río de forma que los organismos cercanos a la descarga tendrán una alta exposición. Aunque algunos EDCs no son persistentes en aguas (ej: los estrógenos persisten de días a semanas), hay una constante emisión, por lo cual los peces y otros organismos están continuamente expuestos a un mix de químicos persistentes y “pseudo-persistentes” (WHO, 2012). Otros EDCs liberados al medioambiente se adsorben en los sedimentos, suelos, etc y pueden concentrarse en gusanos, insectos, etc y pasar a comida acuática o terrestre (WHO, 2013). La exposición a través de la dieta es una importante fuente de EDCs en la fauna, especialmente de los lipofílicos, con mayor afinidad por las grasas y baja solubilidad en el agua. Esta concentración-biomagnificación ha sido bien descrita en pesticidas clorados como el DDT (WHO, 2012).

La capacidad de los contaminantes para interferir en la función endocrina ya fue establecida hace más de 50 años cuando se describió la caída en la población de pájaros piscívoros en US debido a los graves problemas reproductivos provocados por el DDE, un metabolito del plaguicida organoclorado DDT (Olea, 2001). Los múltiples casos de efectos relacionados con la exposición de poblaciones animales a EDCs han ayudado a entender el problema de la disrupción hormonal. Un claro ejemplo es lo ocurrido con la población de caimanes del lago Apopka en Florida, que resultaron accidentalmente expuestos al pesticida dicofol/keltano, tras un vertido accidental en 1980. Diez años más tarde, la población de caimanes había descendido significativamente, había aumentado la mortalidad en los huevos y la mitad de las crías morían antes de los diez días. Se encontraron hembras adolescentes que tenían anomalías severas en los ovarios y presentaban niveles de estrógenos en sangre dos veces más altos de lo normal. Posteriormente se descubrieron efectos importantes sobre el desarrollo sexual de los machos. Las investigaciones llevadas a cabo sirvieron para concluir que los productos químicos que fueron vertidos al lago habían alterado el sistema endocrino de los embriones, limitando la capacidad de los caimanes para reproducirse y dando lugar a las malformaciones descritas (Olea, 2001).







En los años 90 se observó peces macho capturados a la salida del vertido de depuradoras de aguas municipales en algunos ríos en Inglaterra que presentaban características sexuales femeninas Sin embargo, estas anomalías no se encontraban en peces aguas abajo. En 1993, se publicó por primera vez la observación experimental relativa a los desórdenes de expresión del fenotipo sexual en peces (Jobling y col., 1993). Varias sustancias químicas, especialmente los alquilfenoles, procedentes de la degradación de detergentes y plásticos, fueron identificados como responsables de causar estos efectos feminizantes. También existen casos documentados de alteraciones en moluscos de aguas marítimas de Galicia, Cataluña o Huelva. Este fenómeno denominado *imposex*, que consiste en la superposición de caracteres sexuales masculinos sobre hembras de gasterópodos (Guillete y col., 1991), se asocia de forma inequívoca con la exposición a tributilestaño (TBT) y otros derivados del estaño, que tienen una actividad hormonal bien documentada, utilizados como anti-algas para la conservación de embarcaciones. Este caso constituye uno de los pocos ejemplos conocidos en toxicología de relación causa-efecto, dosis-dependiente altamente específico ante la contaminación por TBT. Las ranas tienen una piel muy permeable y son muy sensibles a cambios en el agua y en el medioambiente, y por tanto constituyen excelentes indicadores medioambientales (Cranfiel y col., 2001).

Se sospecha que los EDCs son responsables de la disminución de ciertas especies, del cambio de sexo, feminización, masculinización, deformidades de nacimiento, anomalías metabólicas y del comportamiento, alteración del sistema inmune y otros problemas en peces, aves, moluscos, tortugas y mamíferos en varias partes del mundo (Colborn y col., 1998). En la tabla 1.2. se describen varios efectos y desórdenes observados en la fauna, consecuencia de la acción de la contaminación orgánica, por su exposición a EDCs. Por otra parte, la exposición tanto de la fauna como los humanos no es a compuestos EDCs individuales aislados, sino a mezclas de químicos que pueden afectar el sistema endocrino de formas similares o opuestas, con efectos sinérgicos, antagónicos o simplemente aditivos (Kortemkamp, 2007).

El informe publicado en 2013 por la OMS/PNUMA (en inglés WHO/PNUMA), también muestra problemas similares en relación con el efecto de los EDCs en la fauna salvaje. En Alaska, la exposición a los EDCs puede estar contribuyendo a las alteraciones reproductivas, a la infertilidad y a las malformaciones de la cornamenta observadas en algunas poblaciones de venados. La disminución de las poblaciones de algunas especies de nutrias y leones marinos también podría deberse, al menos en parte, a su exposición a diversas combinaciones de EDCs, al insecticida DDT, a otros contaminantes orgánicos persistentes y a metales como el mercurio. Por otra parte, las prohibiciones y restricciones del uso de EDCs se han relacionado con una recuperación de las poblaciones de diferentes animales salvajes y a una reducción de los problemas de salud. La OMS-PNUMA hace una serie de recomendaciones dirigidas a mejorar el conocimiento mundial sobre los EDCs, reducir los riesgos de enfermedad y reducir los costes conexos (WHO-PNUMA 2013).

Los estudios sobre animales deben servir de advertencia sobre los efectos sobre las personas ya que las evidencias existentes demuestran que, en general, los seres humanos y los demás mamíferos responden de una manera muy similar a los disruptores endocrinos. Además, los datos existentes actualmente de efectos de EDCs sobre los seres humanos presentan una buena correlación con los efectos observados en animales de laboratorio.

Tabla 1.2. Resumen de casos de efectos de disruptores endocrinos producidos por contaminantes orgánicos en los seres vivos.

Contaminante	Efecto de EDCs en fauna / vida silvestre	Referencias
Invertebrados: Gasterópodos y moluscos		
	“Imposex” (masculinización y pseudohermafroditismo) en gasterópodos y moluscos que se asocia con la exposición al biocida tributilestaño TBT y otros derivados utilizados como alguicidas en pinturas marítimas (<i>anti-fouling</i>). El imposex ha provocado la disminución o extinción de algunas poblaciones en Europa	(Barreiro y col., 1999) (Smith y col., 1991, Pellizzato y col., 2004)
		
	Se han realizado estudios de los efectos que los nonilfenoles etoxilados provocan en la <i>Daphnia magna</i> .	(Comber y col., 2003, Hirano y col., 2004)
Peces		
	Inducción de vitelogenina en peces macho, feminización y fenómenos de intersexualidad (producidos entre otros por estógenos y alquilfenoles) en poblaciones de peces en ríos ingleses, alemanes, españoles e italianos expuestos a vertidos de aguas residuales.	(Purdom y col., 1994, Harries y col., 1997, Mellanen y col., 1999) (Sole y col., 2000, Petrovic y col., 2002, Vigano y col., 2001, Gercken y col., 2002)
Reptiles		
	Aumento de esterilidad y anomalías reproductivas por exposición a DDT en el caimán americano , relacionado con un vertido del pesticida en el lago Apopka, en Florida, USA.	(Guillette y col., 1994, Guillette y col., 1996, Guillette y col., 2001 y Woodward y col., 1993)
	Deformidades de nacimiento y/o feminización en tortugas en los grandes lagos, causadas por compuestos organoclorados	(Solla y col., 1998) (Bishop et al., 1998)
Amfibios		
	Hermafroditismo en ranas relacionado con la exposición a atrazina. Hayes descubrió que la atrazina, uno de los pesticidas de mayor uso en USA, hacía que se formaran óvulos en los testes de las ranas macho.	(Hayes y col., 2003) (Ouellet et al., 1997; Schmidt, 1997)
	Deformaciones detectadas en ranas en Minnesota (1995)	Ankley & Giesy, 1998). (Cranfiel y col., 2001)

Aves



Debilitamiento de la cáscara de los huevos en **aves** (ej: halcón peregrino) por exposición a DDE, que produce disminución de la población de aves raptoras en Europa y Norte América

(Struger y col., 1985)

http://www.silent-spring.com/case_studies_eagles.html



La exposición en el desarrollo al complejo DDT ha sido fuertemente asociado a la inducción de ovotestis (feminización) en gaviotas machos



Anormalidades y fallos reproductores en el desarrollo en **aves** que se alimentan de peces en los Grandes Lagos (U.S.). Exposición a compuestos organoclorados persistentes, incluidos PCBs

(Grasman y col., 1998)

Mamíferos



Alteraciones de las funciones reproductoras e inmunes (esterilidad e hiperplasias adrenocorticales) en **focas bálticas** por exposición a PCBs en la cadena alimentaria

(Brouwer y col., 1989)



Hermafroditismo en ballenas beluga causado por PCBs.



Otros mamíferos afectados incluyen visones, conejos y conejillos de indias.

(Ankley y col., 1998)



Alteraciones de las funciones reproductoras e inmunes en **osos polares** por exposición a PCBs en la cadena alimentaria. Osos hembras en Canadá aparentemente tienen genitales masculinos, pero con partes reproductoras internas femeninas.

(Skaare y col., 2002)

Panteras en Florida han experimentado un incremento en esterilidad, anomalías espermáticas, criptoquidismo producido por DDE y PCBs y muestran ratios de estradiol/testosterona alterados.

(Crisp y col., 1998)

http://www.silent-spring.com/case_studies_panthers.html

Posibles efectos sobre los seres humanos por exposición a EDCs

La exposición a EDCs empieza en el útero materno y nunca cesa a lo largo de la vida, ya que estamos continuamente expuestos a compuestos con propiedades de disrupción endocrina en una gran variedad de productos cotidianos. Las posibles vías de exposición de los seres humanos a los EDCs incluyen exposición directa o a través de productos de consumo como comida y sus embalajes, latas, botellas y recipientes de plástico, ciertos plásticos, pinturas, cosméticos, lociones para el sol, pesticidas, detergentes, juguetes, retardantes de llama, etc así como exposición indirecta vía el medioambiente (aire, agua, suelo) (Colborn y col., 1993; Harvey y Darbre, 2004; Guo y col., 2014; Maipas y col., 2015). Adicionalmente a la ingestión de alimentos, han sido identificadas nuevas fuentes de exposición a EDCs, que incluyen medioambientes interiores, materiales electrónicos reciclados, etc. No se conocen todas las fuentes de exposición a EDCs debido a la falta de declaraciones de materiales y artículos. Por tanto, la exposición en humanos sucede en el medioambiente, en casa, en la oficina, en la granja, en el aire que respiramos, en la comida que comemos y en el agua que bebemos.

La exposición humana a los EDCs puede darse por las siguientes vías (WHO/PNUMA 2013):

- vía dérmica: absorción por medio de la piel de los EDCs contenidos en productos de cuidado personal como champús y cosméticos, lubricantes espermicidas y detergentes domésticos e industriales;
- vía respiratoria: inhalación de partículas y de pesticidas en spray, y exposición a través de polvo y partículas en el interior de edificios. Estos EDCs son liberados de materiales y artículos en las casas, trabajos, escuelas, etc, aditivos en productos electrónicos, textiles y muebles.
- vía digestiva: ingestión o consumo oral de comida y agua potable extraída de los ríos contaminados; contaminación de alimentos por campos enriquecidos por lodos de agua residual que contienen alquifenoles (Aranda 2004). La lixiviación de BPA y ftalatos de embalajes de comidas y bebidas y residuos de pesticidas contribuyen a su entrada en el cuerpo humano mediante esta ruta. Adicionalmente, los EDCs pueden entrar en el organismo por:
 - vía intravenosa, por ej. los ftalatos, utilizados habitualmente en los tubos intravenosos (Gore y col., 2014).
 - transferencia biológica de la placenta y leche materna, si la mujer tiene EDCs previamente en su cuerpo.

Una preocupación importante es que cuando las mujeres expuestas en el útero a químicos estrogénicos (diethylstilbestrol (DES) y/o contaminantes medioambientales que son agonistas estrogénicos) alcanzan la edad en la cual normalmente aumenta la incidencia de cánceres de órganos reproductivos, mostrarán una incidencia mucho mayor de cáncer que las no expuestas (Colborn y col., 1993; Newbold y col., 2006). Por tanto, los seres humanos expuestos a DES sirve como modelo de exposición durante la vida temprana a cualquier químico estrogénico, incluyendo contaminantes en el medioambiente que son agonistas estrogénicos (Colborn y col., 1993). Se transmiten efectos adversos del estrógeno medioambiental modelo DES a las subsecuentes generaciones (Newbold y col., 2006). Hay bastante bibliografía documentando los efectos perjudiciales de la exposición a DES durante el periodo crítico de la diferenciación de órganos en estudios experimentales utilizando roedores. Los modelos animales corroboran los estudios clínicos en humanos. Aunque los estudios en animales deben considerarse cuidadosamente antes de extrapolar a humanos, el modelo de exposición de DES a ratones ha proporcionado algunas comparaciones interesantes a humanos expuestos de forma similar (Newbold y col., 2006).

Más recientemente, se han realizado estudios del DES durante años y se han acumulado suficientes evidencias en animales de experimentación y en humanos para mostrar que el feto en desarrollo y el neonato son excepcionalmente sensibles a la exposición de estrógenos exógenos. Si la exposición sucede durante periodos críticos de diferenciación, los efectos adversos permanentes resultantes son bien documentados. Algunos de estos efectos, como anomalías en el tracto reproductivo y tumores uterinos, pueden no ser observados hasta mucho más tarde en la vida, con largos periodos de latencia desde que la exposición sucede (Newbold y col., 2006). Más importante, los datos del estudio realizado por Newbold y col., sugieren que este aumento de susceptibilidad para tumores es transmitido de la ascendencia materna a las subsiguientes generaciones de descendientes machos o hembras: los mecanismos involucrados en estos eventos transgeneracionales incluyen eventos genéticos y epigenéticos. Por tanto, los datos de este estudio puntualizan la sensibilidad exclusiva del organismo en desarrollo a los EDCs, la existencia de efectos a largo plazo, después de la exposición durante el desarrollo y la posibilidad de que los efectos adversos sean transmitidos a las subsiguientes generaciones (Newbold y col., 2006).

Los estudios realizados en los últimos años hacen cada vez más evidente la conexión entre los EDCs y el sistema reproductor y el síndrome metabólico (Giulivo y col., 2016). Durante los últimos 30 años, han aumentado las tasas de enfermedades no comunicables, incluyendo obesidad, diabetes, infertilidad, asma, autismo, desorden de déficit de atención hiperactividad, ciertos defectos de nacimiento, cánceres en la infancia y cánceres de mama y del tracto reproductivo (US EPA 2013). Aunque es muy probable que estos aumentos sean multifactoriales, hay una preocupación de que la exposición a químicos industriales y otras toxinas medioambientales, especialmente aquellas que afectan a la función endocrina, juegan un rol significativo (Schug y col., 2011; Perez y col., 2013; Gore y col., 2015) de forma que la exposición a los EDCs ha sido recientemente asociada a estas enfermedades. En la Tabla del Anexo 2 se resumen las principales enfermedades o disfunciones endocrinas que se sospecha que son causadas por EDCs en seres vivos, y sus tendencias (Aranda y col., 2004; Calafat y col., 2010, WHO/UNEP, 2013; Kabir y col., 2015; Giulivo y col., 2016; Maqbool y col., 2016; Stavros y col., 2017).

Cuatro importantes informes científicos han evaluado el estado de la ciencia en relación con el rol de los EDCs en el desarrollo de enfermedades y trastornos endocrinos, destacado una serie de problemas clave en los últimos 10 años:

- 2009: La Sociedad Endocrina, Productos químicos disruptores endocrinos: Declaración de la Sociedad Endocrina.
- 2011: Comisión Europea, Valoración del estado del arte sobre los disruptores endocrinos, Informe final.
- 2012: Agencia Europea para el Medio Ambiente, "Los impactos de los disruptores endocrinos en la vida silvestre, humana y sus entornos" (2012)
- 2013: Informe del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente y la Organización Mundial de la Salud (WHO/PNUMA), "Estado de la ciencia sobre productos químicos disruptores endocrinos" 2012 (publicado en 2013). El Profesor Ake Bergman, informó en el informe de la OMS: "En los últimos 10 años la investigación ha permitido grandes avances que revelan que las perturbaciones endocrinas pueden ser mucho más amplias y complicadas de lo que se creía en el decenio precedente" (WHO/PNUMA 2013). Los EDC están relacionados con las principales enfermedades que afectan a la población en general y que están alcanzando

cifras epidémicas, como cáncer, problemas de salud reproductiva, diabetes, obesidad, enfermedades neurológicas, etc.

El 24 de mayo de 2013, un grupo de importantes científicos expertos en EDC hicieron una solicitud urgente a la Comisión Europea para que “pusieran en marcha medidas reguladoras de acuerdo con la mejor ciencia disponible”. Los firmantes de la “*Declaración de Berlaymont sobre Disruptores Endocrinos de 2013*” destacaron que hay señales alarmantes de una carga creciente para la salud pública en Europa. Las ventas de productos químicos se han multiplicado por 24 en los últimos 40 años. Afirmaban que: “la prevalencia de enfermedades endocrinas es mayor que nunca y esta carga de enfermedades sigue aumentando en la UE y en todo el mundo. Desarrollando la lista de enfermedades y disfunciones identificados por los autores de la Declaración de Berlaymont, cada sección de este informe proporciona datos de incidencia y prevalencia de estas enfermedades en Europa (resumidas en la tabla A.2.1. del Anexo 2), así como una estimación del gasto sanitario asociado a su tratamiento.

En 2014, se publicó un informe técnico que recoge el cálculo del coste de una serie de enfermedades y disfunciones relacionadas con el sistema endocrino humano. Se elaboró una estimación del coste total en la Unión Europea (UE) basándose en las cifras disponibles en relación con los estados de salud anteriores y en conclusión el informe cifra el coste total de las enfermedades y disfunciones endocrinas seleccionadas en 636 – 638 mil millones de euros al año en la UE. Si los EDCs contribuyen al 2-5% del gasto sanitario total provocado por enfermedades endocrinas crónicas, un cambio en la política de la UE como la retirada progresiva de estas sustancias peligrosas y la promoción de alternativas más seguras podría suponerle a la UE un ahorro de hasta 31.000 millones de euros al año en gasto sanitario y pérdida de productividad.

La obesidad y la diabetes son epidemias en la UE. En 2013, la OMS declaró que el número de personas afectada por la obesidad en el mundo era mayor al número de personas desnutridos. La diabetes es una de las enfermedades no transmisibles más comunes en Europa. Los factores de estilo de vida como la dieta y el descenso de la actividad física, junto a la predisposición genética, son causantes bien conocidos de las enfermedades metabólicas. Independientemente de estos factores, cada vez es más reconocida la contribución de la exposición a EDCs al desarrollo de estos desórdenes en humanos, incluyendo obesidad, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, lesión hepática, dislipidemia y enfermedades cardiovasculares (Desai y col., 2015). Un estudio ha realizado una estimación de la obesidad, diabetes y los costes asociados que pueden ser razonablemente atribuidos a la exposición de EDCs en la UE, concluyendo que la probabilidad es de un coste superior a 18 billones de euros al año (Legler y col., 2015).

La *diabetes mellitus* tipo 2 es considerada una amenaza de pandemia en el mundo. La OMS ha publicado en el 2016 un informe global sobre esta enfermedad demostrando que el número de adultos con diabetes casi se ha cuadruplicado desde 1980. La prevalencia actual de diabetes en adultos de entre 20 y 79 años es de cerca del 6% en la UE y en España y se predice que aumentará un 17% para 2030 en Europa. La carga en los sistemas de salud equivale actualmente a más del 10% del gasto sanitario nacional, estimando un incremento, ampliamente atribuido al aumento de incidencia de diabetes tipo 2 asociada al aumento de sobrepeso y obesidad (WHO, 2016; Giulivo y col., 2016).

En la tabla 1.3. se describen las principales particularidades toxicológicas de los EDCs. Por tanto, 4 puntos importantes a tener en cuenta sobre los disruptores endocrinos son:

1. Latencia: los efectos pueden no aparecer en el momento de la exposición. Las consecuencias se manifiestan con mayor frecuencia en la progenie que en el progenitor expuesto. El desarrollo anormal no se expresa necesariamente en el nacimiento; sus efectos pueden permanecer latentes durante años o hacerse patentes en la descendencia en lugar de en los individuos expuestos, traspasando a través de diversas generaciones (efectos transgeneracionales).

- 2. No existe un umbral (*threshold*) de concentración preciso para el desarrollo del efecto toxicológico, o al menos, ese nivel de concentración es diferente al reconocido como límite de seguridad, para otros aspectos toxicológicos distintos de la disrupción endocrina.

- 3. En el caso de los disruptores endocrinos no es cierta la premisa de “la dosis hace el veneno”, ya que no hay una dosis segura.

- 4. Los efectos de los EDCs en los seres vivos son el resultado de la acción combinada de diversos compuestos que pueden desencadenar una respuesta sinérgica, antagónica o simplemente aditiva.

Varios estudios recientes (2015) muestran que los EDCs tienen la capacidad de alterar procesos epigenéticos, induciendo cambios, (Jacobs y col., 2017), de forma que algunos químicos exógenos también producen efectos heredables transgeneracionales (en varias generaciones) (Skinner, 2016), como mutaciones genéticas, lo cual ha ayudado a comprender los efectos adversos de los EDCs. Este hecho surgió con estudios con el plaguicida anti-androgénico vinclozolin, suministrado en el desarrollo de ratones en un periodo crítico de desarrollo de los testículos, produciendo efectos adversos que fueron pasados a las siguientes tres generaciones de ratones (revisado en Skinner y col., 2011) a través de las células germinales (WHO-UNEP, 2012).

En humanos, desde 1990 varios estudios epidemiológicos han demostrado una asociación entre EDCs específicos y resultados adversos para la salud (Jacobs y col., 2017). Sus consecuencias más devastadoras muchas veces se manifiestan solamente generaciones más tarde, en la descendencia de aquellos individuos expuestos (Newbold y col., 2006; Anway y col., 2008). El caso del tratamiento con DES durante el embarazo, que resulta en adenocarcinoma vaginal en la descendencia, constituye un ejemplo de transmisión generacional de una lesión específica en el tracto reproductivo.

Recientemente (2016), Giulivo y col. han publicado la revisión de 243 estudios, con el objetivo de describir los datos más recientes de los efectos adversos en la salud humana causados específicamente por bisfenoles, ftalatos y parabenos, centrándose en los sistemas reproductivos obesidad y diabetes, con especial atención a las ventanas de exposición críticas: en el útero, durante el embarazo, en bebés y niños (Calafat y col., 2010). En conclusión, los autores afirman que hay una asociación entre la exposición a EDCs y el riesgo de alteraciones en la salud humana (Giulivo y col., 2016).

Tabla 1.3. Principales particularidades toxicológicas de los Compuestos Disruptores Endocrinos (EDCs). (Pombo y col., 2002; Colborn y col., 2004; WHO /PNUMA., 2013; Kortemkat y col., 2013).

Palabra clave	Características de los Compuestos Disruptores Endocrinos (EDCs)
FALTA DE INFORMACIÓN	No existe información toxicológica sobre la mayoría de las sustancias químicas, y en el caso de los EDCs se agudiza y la mayoría no están regulados en la normativa vigente. REACH
	Los ensayos de toxicidad estandarizados en la normativa actual no detectan los efectos adversos que producen los EDC a bajas concentraciones.
PROPIEDADES Y COMPORTAMIENTO	Los EDCs comprenden compuestos químicos muy diversos, con propiedades físico-químicas y comportamientos diferentes
	Son contaminantes ubicuos. Muchos EDCs son persistentes y bioacumulativos
	Constituyen un problema de contaminación global por su capacidad de ser transportados por el aire, agua o alimentos y depositarse en zonas frías localizadas a miles de km de sus lugares de origen
MECANISMOS	Presentan diferentes mecanismos de respuesta por los cuales un EDC interfiere en el sistema endocrino (respuesta normal, agonista, antagonista)
DOSIS	No existe una dosis segura para los EDCs: en su caso no es cierta la premisa “la dosis hace el veneno”
THRESHOLD	Por tanto, no es posible establecer umbrales de exposición segura a los EDCs (<i>threshold</i>), con concentraciones precisas para el desarrollo del efecto toxicológico.
	Algunos EDCs pueden ocasionar efectos a dosis muy bajas (<i>low dose</i>), ej. el BPA, diferentes e incluso mayores que a los efectos a dosis altas
DOSIS-RESPUESTA	La relación dosis-respuesta no es lineal, sino una curva monotónica (NMDR), curvas que cambian de dirección (en forma de U o de U invertida) ya que pueden provocar efectos tóxicos a dosis altas, ningún efecto a dosis intermedias y efectos adversos a dosis bajas o viceversa
	No presentan una relación unívoca dosis-respuesta, no siguen un patrón de curva lineal: <ul style="list-style-type: none"> • Un mismo EDC puede provocar diferentes efectos sobre la salud, puede presentar varias respuestas a una misma causa, mientras que • Varios EDCs diferentes pueden dar la misma respuesta, causando el mismo efecto
MEZCLAS	Estamos expuestos a mezclas de compuestos químicos, con la posibilidad de que los EDCs puedan interactuar entre sí, resultando en un efecto negativo que no presentan a nivel individual.
	La acción combinada de diversos EDCs puede desencadenar una respuesta sinérgica, antagónica o simplemente aditiva, según potencie, inhiba o sume los efectos de los EDCs.
MOMENTO DE EXPOSICIÓN	El momento de exposición es crítico. Hay periodos de vulnerabilidad (ventanas críticas del desarrollo), durante los cuales la exposición a EDCs puede ser particularmente dañina (los periodos más críticos estudiados son el prenatal y el postnatal temprano).
EFFECTOS	Los EDCs puede causar mayores efectos cuanto más temprana es la edad de exposición a los mismos, (en el feto es mucho mayor e irreversible y en adultos es menor y puede ser reversible)
	La bioacumulación de muchos de los EDCs y la latencia, dificultan la determinación del período de exposición
EFFECTOS	El efecto adverso causado puede variar dependiendo de varias factores: <ul style="list-style-type: none"> -el momento de la exposición -el equilibrio hormonal de la persona expuesta, que depende de la edad, el sexo, etc
LATENCIA	Los periodos de latencia entre la exposición y la aparición de efectos son muy largos, incluso de décadas en el caso de la exposición fetal. (Ej: caso del DES)
	Pueden promover herencia epigenética transgeneracional . Es decir, los efectos en una generación pueden transmitirse y manifestarse en generaciones futuras a través de la epigenética

1.1.6. EVALUACIÓN DEL RIESGO DE EXPOSICIÓN A EDCs

Existen diferentes definiciones de riesgo: en general, se define como el producto entre peligro y exposición teniendo en cuenta la incertidumbre, y específicamente: “riesgo es la probabilidad de que un resultado adverso ocurra en un individuo o un grupo que está expuesto a una dosis o concentración específica de un agente peligroso” (Deere *et al.*, 2001). El campo del análisis de riesgos ha crecido rápidamente en los últimos años.

La evaluación del riesgo (*RA*, *Risk assessment*) químico tiene como finalidad identificar y estimar la probabilidad de que se produzcan efectos adversos asociados a exposiciones a sustancias peligrosas. La evaluación del riesgo ambiental, es un procedimiento sistemático para identificar las consecuencias potenciales indeseables de una actividad y estimar la probabilidad de que se produzcan, resultando por tanto una herramienta de gran utilidad. El resultado final ha de ser una declaración cualitativa y cuantitativa de los efectos esperados sobre la salud o sobre el medio.

Las evaluaciones del riesgo tradicionales analizan solo dos tipos de compuestos químicos: aquellos con respuestas lineales sin umbral para efectos relacionados con cancer y aquellos con respuestas de umbrales para efectos no cancerígenos (Gray y col., 2013). Sin embargo, los EDCs no fijan o disponen de un umbral para dosis unidas a todos los efectos nocivos y no siempre tienen efectos críticos o *endpoints* que impliquen efectos en el DNA (Furtran Fuhrman y col., 2015):

- Algunos EDCs son hormonalmente activos a niveles o dosis nano (Campwell y col., 2006; Hecker y col., 2011), lo cual quiere decir que cualquier umbral seguro ha de ser minúsculo.
- Para algunos endpoints puede no haber umbrales seguros (o no nivel de efecto adverso). Por ejemplo, no pueden existir umbrales para EDCs genotóxicos, los cuales pueden producir efectos a cualquier concentración.
- La exposición crónica a mezclas medioambientales y efectos combinados reproducen resultados de estudios a corto plazo de irrelevantes compuestos químicos individuales. Es esencial disponer de más información de químicos individuales y mezclas químicas comunes para extrapolar datos de modelos y estudios a humanos, para poder establecer umbrales amplios de exposición humana (Furtran Fuhrman y col., 2015).

Etapas de la evaluación del riesgo

La evaluación del riesgo consta de cuatro etapas (OMS, 2002), que se describen a continuación en relación a los compuestos disruptores endocrinos:

1. Identificación o caracterización del peligro: determina los tipos de efectos en la salud que pueden producirse, basándose en datos toxicológicos obtenidos en estudios epidemiológicos o de laboratorio. Para describir la naturaleza del efecto tóxico ocasionado por los disruptores endocrinos es necesario conocer qué sustancias son disruptoras endocrinas y cómo afectan a la salud.

Información incompleta: la mayoría de productos químicos en uso actualmente no han sido analizados. La EPA estima que aproximadamente 87.000 químicos serán estudiados para determinar su potencial estrogénico (Mayer, 2002) y cada año se descubren nuevos EDCs. De 564 productos químicos identificados como presuntos EDCs por varias organizaciones o en artículos o informes publicados, 147 fueron considerados probables

compuestos persistentes en el medioambiente o producidos en grandes cantidades. http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/strategy/substances_en.htm.

Existen varias bases de datos que identifican EDCs (ej: en Europa la Comisión Europea y la ECHA, organismos internacionales como WHO/UNEP, y diversos en EE. UU., como US EPA, US FDA, US NLM, TEDX (Futran Fuhrman y col., 2015). Sería conveniente crear una única base de datos de acceso público para compartir la información y que evite realizar investigaciones redundantes

Caracterización de sustancias disruptoras endocrinas: Existen 564 sustancias químicas reportadas por varios organismos cuya capacidad de alteración endocrina se conoce con seguridad o sospecha y cada día se añaden nuevas sustancias a la lista. Dada la magnitud del problema, tanto la Unión Europea como los EE.UU. han iniciado extensos programas de evaluación de la capacidad de disrupción endocrina de sustancias individuales. De las sustancias identificadas hasta el momento, sólo existen regulaciones en Europa por ocasionar además otros efectos sobre la salud o el medio ambiente de 109. Por lo tanto, sustancias que se consideraban seguras hasta la fecha pueden no serlo. Además, debemos tener en cuenta que, según la Agencia Europea de Sustancias Químicas (ECHA), no se tienen datos de toxicidad de la mayoría de sustancias que se comercializan y los datos de toxicidad se refieren en general a efectos tóxicos estudiados tradicionalmente, no a disrupción endocrina.

2. Evaluación de la exposición: combina datos sobre la distribución y las concentraciones de la contaminación en el medio ambiente con información sobre el comportamiento y la fisiología a fin de estimar la cantidad de contaminante a que están expuestas poblaciones (en su conjunto o subgrupos de ellas).

Mezclas: nadie está expuesto a una sola sustancia a la vez, por el contrario, estamos expuestos a mezclas bajas de centenares de sustancias químicas diferentes y, sin embargo, las evaluaciones de riesgo que se realizan en la actualidad sólo contemplan las sustancias químicas individualmente. Otra característica preocupante de algunos EDC es que el efecto adverso puede ser el resultado de la acción combinada de diversas sustancias, que a nivel individual no presentan efectos negativos detectables, pero combinados pueden desencadenar una respuesta paradójica, bien sinérgica, antagónica o simplemente aditiva. Esta característica es de especial relevancia, dado que en la vida real estamos expuestos a un cóctel de concentraciones bajas de centenares de sustancias químicas diferentes y, sin embargo, las evaluaciones de riesgo que se realizan en la actualidad sólo contemplan las sustancias químicas individualmente.

Momento de exposición (timing): debido a sus mecanismos de acción, el momento de exposición a los disruptores endocrinos es decisivo para determinar el carácter, la gravedad y la evolución posterior del efecto de los EDC. La exposición a EDCs depende de la etapa de la vida y el momento (Vandenberg y col., 2013). Hay periodos de especial vulnerabilidad, de forma que, si actúan durante un periodo crítico, como por ejemplo en los primeros estadios de la vida, caracterizados por una rápida diferenciación celular y organogénesis, producen lesiones irreversibles. Las ventanas de desarrollo crítico (*Critical Windows of Development*, TDx) o periodos sensibles, representan un periodo durante el desarrollo cuando el fenotipo de un organismo es sensible a factores (medioambientales) intrínsecos o extrínsecos. Las ventanas de vulnerabilidad incluyen el desarrollo en el útero, la infancia (infancy and childhood), la pubertad y la menopausia (Muller, 2013). Los efectos que puede producir la exposición a xenoestrógenos en una mujer embarazada son completamente diferentes según la semana de desarrollo en la que se encuentre el feto, como se ha mencionado anteriormente en el caso de la exposición a DES (diethylstilbestrol). Además, se ha mostrado que la exposición a EDCs previa al nacimiento o en los primeros años de vida, a veces se manifiesta solamente en etapas posteriores en la vida durante la madurez o incluso en generaciones futuras (Greally y col., 2013; Dietert 2014). Hay

evidencias de que los tejidos embrionarios, fetales y neonatales pueden interpretar los estrógenos y EDCs en diferente forma, o mediante diferentes mecanismos, que los tejidos en adultos (Kavlock y col., 2016).

Exposición a largo plazo y combinada: Los EDCs son ubicuos en el mundo actual (Snyder y col., 2010), por lo cual es común la exposición subcrónica y crónica a bajas dosis a lo largo del tiempo (WHO/UNEP, 2013). La exposición de EDCs combinados mediante diversas rutas puede acercarse o exceder las dosis consideradas "seguras" (Greene y col., 2012), complicando los esfuerzos para establecer un nivel de exposición discreto para la evaluación del riesgo de los EDCs. Puede haber un gran periodo de latencia entre el momento de la exposición y el momento en el que los efectos se ponen de manifiesto, con de riesgo específico a la exposición a largo plazo (Muller 2013). Por tanto, debería ser una prioridad en los programas de investigación y ensayos de los EDCs, como el Programa de *Screening* de EDCs de la EPA y en la UE el Reglamento REACH de la ECHA (Futran Fuhrman y col., 2015). Hay unos pocos criterios de salud para largo plazo de exposición medioambiental de los EDCs a bajo nivel establecidos (Snyder y col., 2010), como por ejemplo la dosis diaria tolerable de la OMS (TDI) (IPCS/WHO 1994), la Dosis de Referencia de la US EPA (USEPA 1993 y USEPA 2002) o el Cociente de Riesgo de la UE (Bodar y col., 2002). El progreso en este punto es a mejorar la precisión y replicabilidad de RA para los EDCs en el futuro.

3.Evaluación de la relación dosis-respuesta: relaciona la probabilidad (o gravedad) de cierto efecto en la salud con la dosis de contaminante o la magnitud de la exposición. El concepto "relación dosis-respuesta" asume que hay una relación causa-efecto entre el nivel de exposición a un tóxico y la magnitud de la respuesta a éste, siendo la toxicidad directamente proporcional a la dosis en la mayoría de los casos. Esta relación se basa fundamentalmente en los datos obtenidos al experimentar sobre animales y en los obtenidos empíricamente de los casos clínicos. Son el resultado de la acción combinada de diversos compuestos que pueden desencadenar una respuesta sinérgica, antagónica o simplemente aditiva

El paradigma tradicional en toxicología es que dosis menores inducen menores reacciones. En contraste, los EDCs tienen curvas dosis-respuesta no monotónicas (NMDR, *non-monotonic dose-response*), definidas como la relación no lineal entre dosis y efecto, donde la pendiente de la curva cambia en algún punto del rango de dosis examinadas. Matemáticamente, pueden invertir la forma de U (Vandenberg y col., 2012 y 2013; Myers col., 2014). Vandenberg y col., revisaron varios estudios concluyendo que cuando suceden curvas NMDR, los efectos a bajas dosis no pueden ser predichos por los efectos observados a altas dosis. Por tanto, para proteger la salud humana es fundamental cambios en el análisis químico. En las curvas de forma de U invertida se dan efectos adversos a dosis inferiores a las que serían identificadas como "nivel sin efecto (adverso) observado" (NOAEL) en un enfoque tradicional de RA/evaluación del riesgo, en el que el NOAEL es tratado como la dosis que no proporciona daño. En estos casos, el RA no captará el riesgo con exactitud (Futran Fuhrman y col., 2015). La extrapolación de dosis bajas de dosis altas puede ser inexacta si la región de la curva por debajo del NOAEL es en realidad no monotónica. La evaluación de riesgo se basa en la asunción de que a mayor dosis de exposición mayor riesgo, suponiendo una respuesta tóxica en forma de curva monotónica (sin puntos de inflexión) y que existe un límite por debajo del cual no existe riesgo. Lagarde y col., revisaron recientemente las publicaciones en las que se citan curvas (NMDR) obtenidas en estudios de investigación experimentales *in vivo* e *in vitro*, seleccionando más de 50 artículos y evaluando 148 curvas con el objetivo de desarrollar un criterio para evaluar la fuerza de las curvas NMDR con el propósito de aplicarlo a la evaluación del riesgo. El estudio finalmente se enfocó en el caso del BPA, considerando estudios *in vivo* y evaluando 49 curvas dosis-respuesta, seleccionando finalmente los estudios con mayor fiabilidad. En conclusión, las relaciones de dosis-respuesta NMDR han de ser incluidas en los métodos de evaluación del riesgo para determinar los potenciales impactos de estas sustancias en la salud humana,

siendo también relevante determinar el alcance del rango del nivel de exposición experimental al cual sucede la curva NMDR (Lagarde y col., 2015).

Efectos a bajas dosis (low dose): Los EDCs tienen la particularidad de que ocasionan efectos a niveles extremadamente bajos, en el límite de la capacidad de análisis y equivalentes a los niveles de exposición que se encuentran actualmente en la población. Diversos estudios han demostrado que la exposición a bajas dosis de algunos EDCs, inicialmente consideradas inocuas, producen serios efectos en la salud de los animales expuestos a los EDCs en el útero materno, así como inmediatamente después del nacimiento. La definición de efectos a dosis bajas en estudios de toxicidad sobre el BPA se refiere a "cambios biológicos que ocurren en el rango de exposiciones humanas o a dosis que son inferiores a las típicamente utilizadas en el paradigma de tests estándar de la EPA para evaluar la toxicidad reproductiva y de desarrollo" (NTP, National Toxicology Program 2001). Varias publicaciones que revisan estudios a bajas dosis de BPA y otros EDCs los catalogan como relevantes para la evaluación del riesgo humano (Vom Saal y col., 2006; Welshons y col., 2006). En un estudio se revisaron 779 estudios de "low-dose" para BPA publicados *peer reviewed*, seleccionando 195 realizados con mayor rigurosidad (Teeguarden y col., 2013). Las principales conclusiones obtenidas fueron que la actual definición del término "low-dose" es una caracterización extremadamente inespecífica del campo de exposición, proporcionando insuficiente información (Teeguarden y col., 2013). En el centro de la controversia relativa a la exposición humana al BPA existen dos posiciones: una avalada por estudios de varios investigadores que afirman que el gran volumen de datos sobre la toxicidad del BPA a dosis muy bajas, inferiores a las consideradas con efectos hasta el momento, implica que los actuales niveles de exposición humana son suficientes para producir efectos endocrinos (Vom Saal y col., 2003; 2005, 2007, 2010; Vandenberg y col., 2010), mientras que la otra, principalmente en publicaciones financiadas por la industria, asegura que BPA solo tiene efectos a concentraciones superiores, es decir, que la exposición humana a BPA es muy inferior al nivel de exposición que causa efectos en los seres vivos (Dekant y col., 2008; Teeguarden y col., 2011). Aunque la US.EPA, la FDA, la EFSA y el AIST concluyen que la exposición humana a BPA es inferior a los niveles de exposición seguros, algunos estados de USA y países han prohibido algunos usos de BPA, reflejados en el adhesivo "BPA free", como por ejemplo la prohibición del uso de BPA en biberones. Sin embargo, varios estudios muestran que los compuestos bifenólicos que sustituyen al BPA también tienen actividad endocrina (Rochester y col., 2015).

4. Caracterización del riesgo: Combina las dos anteriores etapas para calcular el riesgo sanitario estimado, como el número previsible de personas o individuos que contraerán cierta enfermedad en una población determinada. Dadas las incertidumbres y variabilidades que rodean a las fases anteriores de la evaluación de riesgo de los EDCs, no parece posible obtener, con la fiabilidad deseable, una magnitud del riesgo que cabe esperar de la exposición a estas sustancias. La evaluación de riesgo y los valores límites de exposición a agentes químicos que de ella se derivan, no es, por tanto, un método adecuado para proteger la salud y el medio ambiente en el caso de los disruptores endocrinos. Al igual que los agentes cancerígenos, debemos entender que la presencia de un disruptor endocrino implica riesgo de contaminación, y por tanto, no es aceptable ningún límite de exposición. Por todo ello, debemos incidir en el principio de precaución y evitar el riesgo eliminando o minimizando al máximo la exposición a EDCs. Por otra parte, la dispersión de estos contaminantes en el medio ambiente a través de vertidos y emisiones industriales, utilización de productos de uso diario que los contienen ocasiona problemas de salud en la fauna y deja una herencia tóxica a las generaciones venideras. Para proteger la salud y el medio ambiente debemos aplicar el principio de precaución y buscar alternativas más seguras, eliminando o sustituyendo estas sustancias. Considerando las incertezas, los EDCs pueden y deben someterse a alguna evaluación del riesgo (Kortemkamp y col., 2009; Testai y col., 2013).

En conclusión, la evaluación del riesgo es una herramienta inestimable que ofrece la oportunidad de evaluar sistemáticamente el riesgo potencial generado por una clase de compuestos químicos que no es todavía bien entendido. Los puntos desconocidos e incertezas representan una evaluación del riesgo de los EDCs informativa difícil pero no imposible. Compartir información toxicológica, epidemiológica y sobre mecanismos de los EDCs en bases de datos cooperativas e internacionales puede ayudar a mejorar las RAs provisionales.

1.1.7. LEGISLACIÓN RELATIVA A LA CALIDAD DEL AGUA Y LOS EDCs

Ya en el año 1879 se establecía la "Ley de Aguas", derogada posteriormente por la entrada en vigor de la Ley 29/1985, de 2 de agosto, en donde se puso de manifiesto que "el agua es un recurso natural escaso, indispensable para la vida y para el ejercicio de la inmensa mayoría de las actividades económicas; es irremplazable, no ampliable por la mera voluntad del hombre, irregular en su forma de presentarse en el tiempo y en el espacio, fácilmente vulnerable y susceptible de usos sucesivos." Se trata de un recurso que debe estar disponible no sólo en la cantidad necesaria, sino también con la calidad precisa, en función de las directrices de la planificación económica, de acuerdo con las previsiones de la ordenación territorial y en la forma que la propia dinámica social demanda.

La legislación no solo establece el marco de actuación, sino que ordena y orienta decididamente las alternativas de gestión. Desde la publicación de la ley de Aguas 29/1985, y sobre todo, después de la incorporación de España a la Unión Europea (UE), en igualdad de derechos y deberes con el resto de los países miembros, han sido muchas las medidas legislativas que se han ido adoptando progresivamente con la finalidad de proteger los recursos hídricos existentes y de armonizar la legislación española con la europea.

Así pues, la normativa vigente en materia de aguas dispone de una amplia variedad de herramientas legislativas que presentan distintos niveles de competencia – europeo (directivas), nacional (real decretos, órdenes, etc) o autonómico (leyes, decretos legislativos) –, ámbitos de aplicación (aguas de consumo humano, aguas subterráneas, aguas destinadas a la producción de agua potable, etc.), y aspectos a regular (parámetros de calidad, frecuencias de muestreos y análisis, etc). Varias directivas establecen los niveles máximos de compuestos orgánicos en agua para garantizar la protección de la salud y el medioambiente.

En el Anexo (I) se presentan unas tablas resumen de la principal legislación en materia de aguas a nivel comunitario (directivas de la Unión Europea recogidas en el DOUE), estatal (real decretos, órdenes, y leyes nacionales publicadas en el BOE) y autonómico (leyes y decretos legislativos en Cataluña, publicados en el DOGC).

Entre la Normativa relativa al control de la contaminación en el medio acuático, destacamos por su importancia o relación con esta tesis las siguientes:

En lo que respecta a las sustancias peligrosas, durante décadas la distribución y el uso de plaguicidas y otros compuestos peligrosos ha sido un tema de preocupación, causando la reacción de la Comisión Europea, que publicó en 1976 la **Directiva 76/464/CE** del Consejo, de 4 de mayo, relativa a la contaminación causada por determinadas sustancias catalogadas como peligrosas, vertidas en el medio acuático de la Comunidad y que es necesario vigilar. En el anexo presenta:

- Lista I o Lista negra: 132 compuestos considerados peligrosos, selección basada principalmente en su toxicidad, persistencia y bioacumulación en el medio acuático. Incluye los plaguicidas organoclorados y organofosforados
- Lista II o Lista gris: compuestos seleccionados por tener un efecto perjudicial (pero menos nocivo que los de la Lista I) sobre el medio acuático. Incluye los biocidas y demás plaguicidas no citados en la lista 1.

Esta directiva tenía por objeto proteger el medio acuático de la contaminación y en 2006 fue actualizada y derogada por la Directiva 2006/11/CE.

En 1998, la **Directiva 98/83/CE** establecía el parámetro de calidad de plaguicidas: límite máximo de tolerancia de concentración de plaguicidas: 100 ng/L (individual) y 500 ng/L (total de plaguicidas) en las aguas destinadas al consumo humano, y posteriormente en 2006, se especificaban esos mismos límites para todas las aguas subterráneas (Directiva 2006/118/CE).

El año 2000, la Directiva Marco del Agua (DMA), **Directiva 2000/60/CE** de la UE, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas, actualizó y derogó la D. 76/464/CE. Esta Directiva será descrita más adelante con mayor detalle por la relevancia que tiene.

En 2005, la Decisión (UE) **Nº 2455/2001/EC**, modifica la DMA que establece la lista de las 33 sustancias prioritarias en el campo de la política de aguas. Esta lista incluye varios compuestos estudiados en esta tesis, como: los nonilfenoles, el 4-para-nonilfenol, los octilfenoles, el para-tert-octilfenol, el DEHP y los plaguicidas atrazina, simazina y alacloro.

Como complemento a la Directiva Marco del Agua se adoptó a nivel europeo la Directiva **2006/118/CE**, de 12 de diciembre de 2006, relativa a la protección de las aguas subterráneas contra la contaminación y el deterioro, y se propuso otra relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE (COM(2006) 397 final) y en la que se definen concentraciones máximas admisibles y medias anuales para las sustancias consideradas como prioritarias y otros contaminantes en aguas superficiales y biota.

En 2008, la **Directiva 2008/105/CE** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre, que establece los estándares de calidad medioambiental relativos al agua superficial, estableció las **Normas de Calidad Ambiental** (NCA o EQS, del inglés Environmental Quality Standards), asignando dos tipos de NCA o EQS para cada tipo de sustancia:

- un límite de concentración media anual (AA-EQS) con el objetivo de garantizar la protección contra la exposición a largo plazo a contaminantes presentes en el medio acuático y
- una concentración máxima admisible (MAC-EQS), o el valor máximo para una medida puntual, con el objetivo de garantizar la protección contra la exposición a corto plazo, es decir, a los picos de la contaminación.

Posteriormente, el **Real Decreto 60/2011**, de 21 de enero, relativo a las Normas de Calidad Ambiental en el ámbito de la política de aguas, traspuso la Directiva 2008/105/CE (relativa a las NCA) y la Directiva 2009/90/CE de la Comisión, de 31 de julio (por la que se establecen las especificaciones técnicas del análisis

químico y del seguimiento del estado de las aguas). Asimismo, adaptó a la legislación vigente la normativa de protección de las aguas frente a sustancias peligrosas desarrollada al amparo de la Directiva 76/464/CEE del Consejo, de 4 de mayo, relativa a la contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas vertidas en el medio acuático de la Comunidad. A continuación se incluye un extracto del Anexo I del **RD 60/2011**, que incluye las **NCA** para sustancias prioritarias y para otros contaminantes, con los valores establecidos para el DEHP, el nonilfenol y el octilfenol.

Tabla 1.4. Extracto del Anexo I del **RD 60/2011**, con los valores de **NCA** para sustancias prioritarias y otros contaminantes estudiados en esta tesis:

Nº	Nombre de la sustancia	Nº CAS	NCA-MA Aguas superficiales continentales	NCA-MA Otras aguas superficiales	NCA-CMA Aguas superficiales continentales	NCA-CMA Otras aguas superficiales
(12)	Di(2-etilhexil)ftalato (DEHP)	117-81-7	1,3	1,3	No aplicable	No aplicable
(24)	Nonilfenol 4-Nonilfenol	25154-52-3 104-40-5	0,3	0,3	2,0	2,0
(25)	Octilfenol	140-66-9	0,1	0,01	No aplicable	No aplicable

Unidad: [$\mu\text{g/L}$]

NCA: Normas de Calidad Ambiental; MA: Media Anual; CMA: Concentración Máxima Admisible

En 2013, la aprobación de la **Directiva 2013/39/UE** del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de agosto, 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, añadiendo 12 nuevas sustancias a la lista de 33, obliga a revisar el Real Decreto 60/2011, de 21 de enero, para adaptarlo a las nuevas exigencias derivadas de dicha modificación. Sus principales objetivos fueron:

- Modificar la lista de sustancias prioritarias mediante la identificación de nuevas sustancias para acciones prioritarias a escala de la Unión.
- Adoptar medidas para lograr el buen estado químico de las aguas superficiales mediante la adopción de normas de calidad ambiental (NCA) para las sustancias prioritarias y otros contaminantes determinados.

En 2014, la **Directiva (UE) 2014/101/UE**, modifica la Directiva 2000/60/CE por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas, para adoptar las nuevas normas para garantizar la calidad y comparabilidad de los métodos empleados para controlar los parámetros de cada tipo generados para efectuar el seguimiento del estado ecológico del agua.

Posteriormente, se ha publicado la **Decisión (UE) 2015/495/EC**, que establece una lista de observación de sustancias (*The Watch List*) 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. Entre otros compuestos, se incluyen la Estrona (E1), el 17- β -estradiol (E2) y el 17- α -etinil estradiol (EE2). Actualmente se está elaborando una segunda *Watch List* prevista para el 2019.

Estos estrógenos (E1, E2 y EE) también han sido incluidos junto a la noretindrona y el nonilfenol en la reciente **lista de candidatos a contaminantes (CCL4)** de la **EPA-US Environmental Protection Agency**, del 2015, que no supone un reglamento que limite las concentraciones de estos compuestos en el agua, pero puede anticiparse a futuras normativas. La estrona ya fue incluida en la anterior lista (CCL3).

A nivel nacional, el **Real Decreto 817/2015**, de 11 de Septiembre, establece los criterios de seguimiento y evaluación del estado de las aguas superficiales y las normas de calidad ambiental (NCA o EQS), para las sustancias prioritarias y para otros contaminantes con objeto de conseguir un buen estado químico de las aguas superficiales y el procedimiento para calcular las NCA de los contaminantes específicos para conseguir un buen estado ecológico de las aguas superficiales, así como las condiciones de referencia y los límites de clases de estado de los indicadores de los elementos de calidad biológicos, fisicoquímicos e hidromorfológicos para clasificar el estado o potencial ecológico de las masas de agua superficiales. También se incorporan las obligaciones derivadas de la Decisión 2015/495 de la Comisión.

Como complemento a la Directiva Marco del Agua también se ha adoptado a nivel español el **Real Decreto 140/2003**, de 7 de febrero, en el cual se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, que deroga el anterior Real Decreto 1138/1990 de 14 de septiembre por el que se trasladaba la Directiva comunitaria 80/778/CEE, de 15 de julio de 1980, y con el cual queda incorporada al ordenamiento jurídico español la Directiva comunitaria 98/83/CE.

En 2015 se ha publicado la **Directiva (UE) 2015/1787** relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano, por la que se modifican los anexos II y III de la Directiva 98/83/CE del Consejo, que establecen los requisitos mínimos de los programas de control de todas las aguas destinadas al consumo humano y las especificaciones para el método de análisis de los distintos parámetros.

El **Real Decreto 314/2016**, por el que se modifican el Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, Incorpora los criterios básicos para la protección de la salud en contra de los peligros derivados de las radiaciones ionizantes, en las aguas destinadas a consumo humano.

Recientemente, el 1 de agosto de 2018 se ha publicado el **Real Decreto 902/2018**, por el que se modifican el RD.140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, así como el RD 1798/2010 y el RD 1799/2010 relativos a aguas minerales naturales y envasadas para el consumo humano.

Adicionalmente, aunque fuera del marco de la política de aguas, también cabe destacar la legislación aprobada en los últimos años que restringe la comercialización y uso de algunos compuestos disruptores endocrinos, con el objetivo de la protección de la salud y el medioambiente:

La **Directiva 2003/53/EC** restringe la comercialización y el uso en la UE de los nonilfenoles y nonilfenoles etoxilados con concentraciones superiores a 0.1% para los usos específicos descritos en la Directiva. Entre los

sectores que han disminuido o eliminado el uso de NP y NPnEOs debido a esta directiva se encuentran los de papel y papel reciclado

El 1 de junio de 2007 entró en vigor el **Reglamento (CE) nº 1907/2006** (en adelante denominado **REACH**, acrónimo en inglés de Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de sustancias y mezclas químicas), cuyo objetivo principal es mejorar la protección para la salud humana y el medio ambiente frente al riesgo que puede conllevar la fabricación, comercialización y uso de las sustancias y mezclas químicas. Por tanto no podrá comercializarse ninguna nueva molécula sin que se haya comprobado previamente su inocuidad, teniendo que ser garantizado previamente por la industria. Apoyada por los científicos y con la oposición de la industria, constituye la legislación europea más compleja y restrictiva en materia de sustancias químicas, y contemplaba el registro de 30.000 sustancias químicas para el año 2018, habiendo de someter a los productos químicos a un proceso de evaluación sistemática para conocer y prevenir sus efectos en la salud. El cumplimiento del R. REACH obliga a los fabricantes a registrar las sustancias químicas fabricadas o importadas que superen 1 tonelada de producción o importación, permitiendo un mayor control de estos compuestos y los riesgos derivados. Actualmente (a 31.08.18), la ECHA ha registrado 21.274 sustancias químicas únicas (<https://echa.europa.eu/es/information-on-chemicals/registered-substances>). Dado el gran volumen de plaguicidas utilizados en el ámbito agrícola, el registro es obligatorio para la mayoría de estos compuestos, lo cual permite un mayor control de los mismos.

Adicionalmente, REACH establece una lista de sustancias extremadamente preocupantes (SEP) (SVHC, *Substances of Very High Concern*) (<https://echa.europa.eu/es/candidate-list-table>), que pueden tener efectos graves y a menudo irreversibles sobre la salud humana y el medioambiente y entre las cuales incluye los compuestos cancerígenos, reprotóxicos y/o mutagénicos (CMR) de categoría 1A o 1B, las sustancias persistentes, (muy) bioacumulables y tóxicas (PBTs, mPmB) y las sustancias disruptoras endocrinas entre otras que puedan alcanzar un nivel de peligro igual o superior al de las anteriores sustancias. El Reglamento REACH pretende garantizar el control de los riesgos derivados del uso de las SVHC y aconseja la sustitución de estas sustancias por otras alternativas más seguras siempre que sea posible. Las SVHC requieren una autorización de la Agencia Química Europea (ECHA) para ser comercializadas y utilizadas específicamente para los usos que se pretendan dar. De los EDCs estudiados en esta tesis, se incluyeron los ftalatos DEHP (primera SVHC autorizada), DBP y BBP (2008), el nonilfenol lineal y el ramificado (2012) y los nonilfenoles etoxilados lineales y ramificados (2013), obligando a un mayor control de estos compuestos y los riesgos derivados. En 2017 se incluyó en la lista el BPA por sus efectos disruptores endocrinos en el medioambiente y en 2018 por sus efectos disruptores endocrinos en humanos. A pesar del gran avance que supone el Reg. europeo REACH, se evalúa únicamente la toxicidad de los compuestos químicos individualmente, no de las mezclas y los efectos combinados que éstas pueden tener.

El **sistema globalmente armonizado** (GHS, *Global Harmonized System*) de las Naciones Unidas, define y clasifica los peligros de los productos químicos y comunica información sobre salud y seguridad en las etiquetas y las fichas de seguridad de los productos. El Reglamento (CE) nº 1272/2008 o CLP, acrónimo de sus siglas en inglés *Classification, Labelling and Packaging* (Clasificación, Etiquetado y Envasado), tiene por objeto garantizar una comunicación clara de los peligros que presentan las sustancias químicas a los trabajadores y a los consumidores de la Unión Europea por medio de la clasificación y el etiquetado de los productos químicos que utiliza el sistema GHS.

La Directiva Marco del Agua (2000/60/CE) y su implantación.

La denominada Directiva Marco del Agua (D. 2000/60/CE), en lo sucesivo DMA, trasladada al ordenamiento jurídico estatal, intenta dar un marco de actuación común sobre la gestión del agua en todos los Estados miembros de la Unión Europea.

El agua deja de considerarse exclusivamente como recurso y se contempla como un elemento básico de los ecosistemas acuáticos y una parte fundamental para el sostenimiento de una buena calidad ambiental que, a la vez, garantiza el recurso. En esta normativa, los aspectos biológicos, y también los hidro-morfológicos, adquieren relevancia en la diagnosis integrada de la calidad, junto con los ya tradicionalmente usados indicadores fisicoquímicos y las sustancias prioritarias o contaminantes tóxicos y persistentes (algunos de nueva inclusión). La Directiva Marco del Agua propone la regulación del uso del agua y de los espacios asociados a partir de la capacidad que éstos tienen para soportar diferentes tipos de presiones e impactos. De este modo, se pretende promover y garantizar la explotación y el uso del medio de manera responsable, racional y sostenible. El objetivo fundamental de esta directiva es la protección de todas las aguas de Europa (superficiales, subterráneas, de transición y costeras) para prevenir la pérdida de calidad y proteger el estado de los ecosistemas, promover un uso sostenible a largo plazo, conseguir una mayor protección y mejora del medio acuático, garantizar la reducción de la contaminación en las aguas subterráneas y disminuir los efectos de inundaciones y sequías, para garantizar el suministro y proteger las aguas territoriales y marinas. Para cumplir estos objetivos, la DMA estableció diferentes planes de control de las cuencas hidrográficas.

En la Directiva 2000/60/CE, que se caracteriza por presentar una visión global y un marco de acción local, se especifican las medidas a tomar para conseguir la protección integrada del agua y la calidad química y ecológica de esta, mediante la reducción progresiva de la contaminación existente y, en el caso de las denominadas sustancias peligrosas prioritarias, mediante el cese o la progresiva eliminación de vertidos, emisiones y fugas. Las sustancias que esta directiva establece como de interés prioritario en el agua (33 en total) se encuentran recogidas en una lista dinámica (Decisión No. 2455/2001/EC) que se revisa cada cuatro años. Aparte del control de los compuestos incluidos en esta lista, los aspectos biológicos e hidromorfológicos toman relevancia en la diagnosis integrada de la calidad.

El buen estado ecológico y químico de las aguas superficiales, y el estado químico y cuantitativo para las subterráneas es, a la vez que calidad de vida y sostenimiento ambiental, garantía de recurso.

La Directiva Marco del Agua tiene la virtud de integrar en un mismo ámbito de gestión (el Distrito de Cuenca Fluvial o Demarcación Hidrográfica) las aguas subterráneas, las superficiales epicontinentales y las costeras que están influidas por las aguas continentales de este distrito. La correcta implantación de los conceptos y disposiciones establecidos por la DMA da lugar a un complejo organigrama de actuaciones para conseguir las herramientas necesarias y los criterios adecuados para la nueva gestión del agua, basada en conceptos de sostenibilidad tanto desde el punto de vista ambiental, como económico, el mantenimiento de los recursos hídricos, y la plena transparencia y participación ciudadana en los futuros planes y programas de gestión.

Con el fin de conseguir el buen estado ecológico de las aguas para finales de 2015, objetivo fundamental de la Directiva Marco del Agua, este texto normativo estableció un conjunto de trabajos a realizar dentro de un calendario preestablecido.

El sistema de clasificación del estado ecológico de las **aguas superficiales** que establece la DMA incluye cinco categorías: muy bueno, bueno, aceptable, deficiente o malo. «Muy bueno» significa que la presión humana es inexistente o muy baja. Un estado «bueno» significa una desviación «ligera» de esta situación, un estado «aceptable» significa una desviación «moderada», y así sucesivamente.

Para definir el buen **estado químico**, se han establecido normas de calidad medioambiental para 33 nuevos contaminantes químicos, además de los ocho anteriormente regulados, ampliado posteriormente, que se consideran altamente preocupantes en toda la UE. La DMA está respaldada por otras disposiciones de la UE, tales como el Reglamento REACH sobre sustancias químicas y la Directiva sobre prevención y control integrados de la contaminación (PCIC) referida a instalaciones industriales.

Las sustancias que esta directiva establece como sustancias contaminantes prioritarias que constituyen un riesgo importante para el medio acuático (33 inicialmente), se encuentran recogidas en una lista dinámica (Decisión No. 2455/2001/EC) que debe revisarse cada cuatro años y que como hemos visto ha sido actualizada y ampliada en diversas directivas y reglamentos posteriores. Aparte del control de los compuestos incluidos en esta lista, los aspectos biológicos e hidromorfológicos toman relevancia en la diagnosis integrada de la calidad.

El concepto de Estado Ecológico, que se introduce por el texto normativo de la Directiva Marco del Agua, surge como elemento clave de medida para el análisis de la calidad de los sistemas acuáticos y su gestión, donde se integra una visión de su estado de salud (una expresión de la estructura y funcionamiento de los ecosistemas). Este concepto aparece en la legislación catalana sobre agua (Ley 6/1999), y el texto refundido de la legislación en materia de aguas de Cataluña (Decreto Legislativo 3/2003 de 4 de noviembre).

Estas listas contienen, como puede verse, una variedad de compuestos orgánicos, inorgánicos y metales, considerados como peligrosos para la salud humana y/o del medio ambiente. Muchos de estos compuestos, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, los plaguicidas, y la mayor parte de los metales, han sido objeto de estudio y regulación durante décadas. Otros, por el contrario, han sido incluidos en las listas de sustancias prioritarias recientemente. Éste es el caso, por ejemplo, de los alquifenoles (productos de degradación de detergentes de tipo alquifenol etoxilado) o de los difeniléteres bromados (utilizados fundamentalmente como retardantes de llama), considerados hasta hace poco como contaminantes emergentes.

Con la DMA, el agua deja de ser considerada exclusivamente como un recurso y se contempla como un elemento básico de los ecosistemas hídricos y una parte fundamental para el sostenimiento de una buena calidad ambiental. Con el objetivo de conseguir un buen estado de las aguas para finales del 2015, los Estados Miembros deben haber realizado un análisis de las características de cada distrito hidrográfico, definido todas las cuencas hidrográficas pertenecientes a su territorio e incluirlas en las correspondientes demarcaciones hidrográficas y elaborado un plan de gestión y un programa de medidas en cada distrito geográfico teniendo en cuenta los resultados de los análisis y estudios anteriores.

Sin embargo, a pesar de los avances experimentados en las últimas décadas en el ámbito de la mejora de la calidad medioambiental de los numerosos lagos, ríos, aguas costeras y fuentes de aguas subterráneas en Europa, y de los esfuerzos notables de los Estados Miembros para mejorar la calidad del agua, el 60% de las masas

de agua europeas siguen sin cumplir el objetivo mínimo de «buen estado» de la Unión Europea. Y la contaminación, estructuras como las presas y la extracción excesiva siguen siendo las principales amenazas para su salubridad a largo plazo, según un informe publicado recientemente (julio 2018) por la Agencia Europea de Medio Ambiente sobre el estado del agua. En conclusión, si bien las masas de agua subterránea de Europa, como los acuíferos, gozan de buena salud en la mayoría de los casos, solo el 40 % de los lagos, ríos, estuarios y aguas costeras vigilados alcanzaron el estado ecológico mínimo «bueno» o «muy bueno» fijado en la Directiva Marco del Agua de la UE durante el periodo de seguimiento 2010-2015, según el informe.

Legislación en aguas residuales. Tratamiento de las aguas residuales urbanas

Agua residual (AR) es aquella que ha sufrido algún tipo de contaminación de origen antrópico o natural que limita su uso posterior. Las aguas residuales urbanas (ARU) son aquellas generadas en un ámbito doméstico por los núcleos de población, residuos de la actividad agropecuaria, como son las aguas de escorrentía y, aguas residuales industriales.

La **Directiva europea 91/271/EEC** del Consejo, de 21 de mayo de 1991, relativa al tratamiento de las aguas residuales urbanas, posteriormente revisada para dar lugar a la 98/15/EC, que regula este tipo de aguas matiza esta definición e incluye como aguas residuales urbanas no sólo las procedentes de núcleos urbanos, sino también mezclas de aguas residuales domésticas con aguas residuales procedentes de la actividad industrial. Los vertidos de aguas residuales urbanas (ARU) constituyen, por su importancia, la segunda fuente de contaminación de medios acuáticos en forma de “eutrofización” (aumento de nutrientes en el agua, especialmente de los compuestos de nitrógeno y/o fósforo, que provoca un crecimiento acelerado de algas y especies vegetales superiores, con el resultado de trastornos no deseados en el equilibrio entre organismos presentes en el agua y en la calidad del agua a la que afecta [D.98/15/CEE]). Esta directiva va encaminada a armonizar al nivel comunitario las medidas de tratamiento de esas aguas. La Directiva 91/271/EEC tiene por objeto la recogida, tratamiento y vertido de aguas residuales urbanas y el tratamiento y vertido de las aguas residuales procedentes de ciertos sectores industriales, para proteger el medioambiente de los efectos negativos de los vertidos. El nivel de tratamiento tiene que ser primario, secundario o terciario en función de la vulnerabilidad de las aguas receptoras. Establece los plazos para construir las depuradoras y los tamaños de población que deben contar con una EDAR. Así mismo establece mecanismos y frecuencias de muestreo y análisis de las aguas residuales. La transposición de la Directiva 91/271/EEC, se ha traducido en la legislación española en el Plan Nacional de Saneamiento y Depuración de Aguas Residuales.

La **Directiva 98/15/EC** ha tenido gran repercusión en los Estados Miembros, dado que los principales requerimientos de esta legislación son asegurar los procedimientos adecuados para cada efluente, la gestión adecuada para los fangos producidos, los plazos de construcción de las depuradoras y los tamaños de población que deben contar con una EDAR. El objetivo de la Directiva es establecer requisitos sobre los vertidos de las depuradoras de aguas residuales urbanas con el fin de acabar con las diferencias de interpretación de los Estados miembros. La Directiva define los conceptos: aguas residuales urbanas; eutrofización; equivalente habitante.

El **Real Decreto 1620/2007**, de 7 de diciembre de 2007, establece el régimen jurídico de la **reutilización de las aguas depuradas** (de acuerdo con el artículo 109.1 del texto refundido de la Ley de Aguas, aprobado por el

Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio). En este decreto especifica que el Gobierno establecerá las condiciones básicas para la reutilización de las aguas, precisando la calidad exigible a las aguas depuradas según los usos previstos. Entre otros conceptos, define: Reutilización de las aguas, Aguas depuradas, Aguas regeneradas (aguas residuales depuradas que, en su caso, han sido sometidas a un proceso de tratamiento adicional o complementario que permite adecuar su calidad al uso al que se destinan) y estación regeneradora de aguas.

Orden MAM/85/2008, de 16 de enero, por la que se establecen los criterios técnicos para la valoración de los daños al dominio público hidráulico y las normas sobre toma de muestras y análisis de vertidos de **aguas residuales**.

Marco legal en política de aguas en Portugal. Ríos portugueses transfronterizos.

Desde el siglo XVIII, Portugal y España han realizado varios Tratados y Convenciones, con la intención de establecer una gestión y coordinación común del agua. En 1998, la Convención en Co-operación para la Protección y uso sostenible de las cuencas de los ríos Portugueses-Españoles (referida como la Convención de la Albufeira), definió el marco de co-operación bilateral para la gestión sostenible de las cinco cuencas de los ríos compartidas entre ambos países, estableciendo las bases para una gestión del agua basada en las cuencas y un proceso de decisión al respecto de estas cuencas. La directiva establecía un enfoque innovador para la gestión del agua basada en las cuencas de los ríos, las unidades naturales geográficas e hidrológicas y establecía fechas límite a los Estados Miembros para la protección de los ecosistemas acuáticos. La directiva se dirige a aguas superficiales internas, aguas transitorias, aguas costeras y subterráneas.

La legislación portuguesa en materia de aguas está enmarcada en la legislación internacional de la UE, los acuerdos bilaterales Luso/Portugueses-Españoles de ríos transfronterizos y la política de aguas de la Unión Europea, traspuesta a la legislación portuguesa.

Tabla 1.5. Transposición de la Legislación de la UE a las leyes Portuguesas.

Legislación UE	Legislación Portugal	Contenido
	Dec. Ley 47/90, 9 Febrero	Limita el uso y comercialización de ciertas sustancias peligrosas y preparados
Directiva 76/464	Dec. Ley 236/98, 1 Agosto	Define normas, criterios y objetivos de calidad para proteger el medioambiente acuático en función de sus usos (revoca la D. 74/90, 7 th Marzo)
	Dec. Ley 506/99, 20 th Noviembre	Define los objetivos de calidad para ciertas sustancias peligrosas incluidas en la Lista II del Anexo XIX a Dec. Ley 236/98, 1 ^o Agosto
	Dec. Ley 54/2005 1 Noviembre	Establece la titularidad de los recursos hídricos
Directiva 2000/60	Dec. Ley 58/2005 29 Diciembre (WATER LAW)	Traspone la DMA y establece la base y el marco institucional para la gestión Política integrada de los recursos del agua en Portugal

La Ley 58/2005 (Ley del Agua, *Water Law*), que traspone la Directiva Europea 2000/60/CE en ley aplicable en Portugal, establece la base y el marco institucional para la política de gestión del agua en Portugal. Entre otros, proporciona la creación de autoridades de gestión del agua regionales con territorios designados alrededor de las cuencas de los ríos, llamadas "River Basin Districts (RBD)", algunas de las cuales son de naturaleza internacional, ya que los ríos portugueses más largos tienen cuencas internacionales compartidas con España.

Los principales objetivos del régimen legal de gestión del agua en Portugal son: (a) proteger las aguas superficiales, costeras y subterráneas, con el fin de prevenir y reducir la contaminación acuática; (b) promover el uso sostenible del agua; (c) proteger el medioambiente acuático; (d) Mejorar el status de los ecosistemas acuáticos; y (e) mitigar los efectos de las riadas y sequías.

Los ríos transfronterizos son de gran importancia en la Unión Europea, donde representan el 60% del territorio, siendo muy relevante en el caso de la Península Ibérica, donde España y Portugal comparten 5 ríos: el Miño, el Limia, el Duero, el Tajo y el Guadiana. Las cuencas compartidas de los ríos Portugueses-Españoles, presentan características propias y cubren un área de 268 500 km², de la cual el 21% pertenece a Portugal y representa el 65% del territorio Portugués (Maia, 2006a). En el capítulo 4 de esta tesis se describe el PVA llevado a cabo en 10 ríos en Portugal algunos de los cuales son transfronterizos.

Normativa sobre plaguicidas

Los plaguicidas se encuentran bien caracterizados en cuanto a su presencia, destino, persistencia e impacto en el medio ambiente, y se hallan sujetos a legislación. La presencia de **plaguicidas** en el medio acuático está regulada en la Unión Europea (EU) a través de varias directivas:

La **Directiva 98/83/EC** relativa a la calidad del agua destinada al consumo público establece un límite máximo de 0,1 µg/L para plaguicidas individuales y de 0,5 µg/l para plaguicidas totales (en 0.10 µg/L para la concentración total de PAHs y 0.01 µg/L para el benzo(a)pireno), mientras que la **directiva 75/440/EC** relativa a la calidad del agua superficial destinada a la producción de agua potable establece un máximo de entre 1 y 5 µg/L para plaguicidas totales, dependiendo del tipo de tratamiento aplicado. Sin embargo, los valores establecidos por la EPA en el Registro Federal del 2002 (EPA 816-F-02-013) son para cada compuesto individual y superiores a los establecidos por la UE, como por ejemplo 3 µg/L para la atrazina, 2 µg/L para el endrin y 0.2 µg/L el benzo(a)pireno.

Otro grupo de compuestos incluidos en la DMA son los plaguicidas, sustancias ampliamente utilizados en agricultura para prevenir, destruir o repeler plagas e incrementar la productividad de las cosechas. Ara bien, la exposición crónica a plaguicidas presenta importantes riesgos tanto para el medioambiente como para la salud humana, ya que pueden causar, entre otras patologías, cáncer, disrupción endocrina y problemas de fertilidad (Baldi y col., 2001, Garry y col., 2002). Los plaguicidas más utilizados a nivel mundial pertenecen a diferentes clases químicas y tienen diferentes propiedades físico-químicas, lo cual comporta una diferente persistencia y capacidad de degradación en el medio. Hoy en día se tiende a utilizar pesticidas fácilmente degradables pero aún así representan un serio problema para los ecosistemas acuáticos, ya que en parte van a parar al agua superficial y/o subterránea, y por tanto representan un riesgo potencial para la vida acuática, así como para la calidad del

agua. Con el objetivo de controlar la contaminación por plaguicidas en las aguas, en diversas directivas se ha desarrollado legislación específica en la que se han establecido los niveles máximos permitidos. En España, aunque desde el 2004 se observa una disminución en la utilización de plaguicidas, todavía son muy utilizados y una evidencia es su presencia en las aguas superficiales, sobretodo en los ríos. La presencia de los pesticidas incluidos en la DMA en las aguas superficiales queda ampliamente demostrada en diferentes estudios publicados en todo el mundo. Destacan los niveles de los ríos de países como China (3.4-581 ng/L), o de países europeos como Francia, Suiza, Alemania, Reino Unido y Grecia (0.04-990 ng/L). En Cataluña se han detectado plaguicidas prioritarios a concentraciones del orden de los ng/L, tanto en el río Ebro (2.8-451 ng/L) como en el río Llobregat (29-110 ng/L). Se han detectado plaguicidas incluso en las aguas potables de consumo, como por ejemplo isoproturón (0.9 ng/L), diurón (2.8 ng/L), simazina (16 ng/L) y atrazina (8.9 ng/L) en aguas potables en Alemania (Asperger y col. 2002). Estos últimos compuestos también se han detectado en aguas potables de Canadá (entre 7 y 28 ng/L) (García-Ac y col. 2009), y a Barcelona (hasta 6.9 y 62 ng/L respectivamente) (Quintana y col. 2001, Kampioti y col. 2005).

Aproximadamente una tercera parte de la lista de 33 sustancias prioritarias establecidas en el campo de la política de aguas por la **Decisión nº 2455/2001/EC** son plaguicidas, entre los cuales incluye algunos considerados EDs como la atrazina, simazina, diurón, endosulfán, hexaclorobenceno, lindano, etc. Nuevos descubrimientos realizados en los últimos años han renovado el interés por los plaguicidas (por los nuevos compuestos o productos de degradación tóxicos descubiertos), así como por otros compuestos que ya estaban sujetos a legislación en el agua.

Adicionalmente, el **Reglamento (UE) nº 528/2012** del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de mayo de 2012, relativo al uso y comercialización de los biocidas, en vigor desde 2013, deroga la Directiva 98/8/CE. Posteriormente la Comisión ha publicado el **Reglamento de Ejecución (UE) nº 88/2014 de la Comisión** de 31 de enero de 2014, por el que se especifica un procedimiento para la modificación del anexo I del Reglamento (UE) nº 528/2012.

Normativa sobre Compuestos Disruptores Endocrinos

A pesar de la gran cantidad de estudios realizados en los que se han obtenido resultados que advierten de las consecuencias que tienen los EDCs para la salud, y aunque en algunos países se han creado comités de expertos, ningún estado miembro de la Unión Europea (UE) ni de los Estados Unidos ha desarrollado todavía una legislación específica para regular los EDCs. Algunos gobiernos y organizaciones internacionales e intergubernamentales han iniciado actividades destinadas a identificar y controlar el problema. Entre todas estas organizaciones pueden destacarse la Comisión Europea (CE), el Parlamento Europeo, la Agencia de Protección Medioambiental Americana de los Estados Unidos (EPA), la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), el Programa Internacional sobre Seguridad Química de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Comisión Económica para Europa de las Naciones Unidas (UNECE), el Programa de las Naciones Unidas para el Medioambiente (PNUMA), la Comisión del Convenio Oslo-París (OSPAR), la Agencia Europea del Medioambiente, la Agencia Química Europea (ECHA), organizaciones no gubernamentales y la industria química.

Recientemente la Comisión Europea (CE) ha perdido una oportunidad única de desarrollar un sistema normativo que establezca nuevos estándares en la protección contra los EDCs. Las enmiendas propuestas a la ley sobre plaguicidas de la UE y el criterio para la identificación de disruptores endocrinos que la CE publicó en junio de 2016, tras un retraso de aproximadamente 3 años, asegura que difícilmente los disruptores endocrinos utilizados como plaguicidas serán retirados de su comercialización.

Actualmente la Comisión Europea ha aplicado la Estrategia Comunitaria en materia de alteradores endocrinos y la EPA por otra parte, tiene establecido el programa de Investigación para alteradores endocrinos (EDSP-*Endocrine Disruptor Screening Program*).

Normativa relativa al Bisfenol A:

El bisfenol A (BPA) está clasificado en la UE como una sustancia que tiene efectos tóxicos para nuestra capacidad reproductora. Todos los fabricantes, importadores o proveedores de BPA deben clasificar y etiquetar las mezclas que contienen BPA como tóxicas para la reproducción de categoría 1B en 2018. Identificado como alterador endocrino para la salud humana y el medio ambiente: El BPA se incluyó en enero de 2017 en la lista de sustancias candidatas extremadamente preocupantes (SEP o SVHC) debido a sus propiedades de toxicidad para la reproducción. En junio de 2017, el Comité de los Estados miembros de la ECHA apoyó la propuesta francesa de identificar, además, el bisfenol A como sustancia extremadamente preocupante debido a sus propiedades de alteración endocrina, causantes de probables efectos graves en la salud humana que dan lugar a un nivel de preocupación equivalente a las sustancias carcinógenas, mutágenas o tóxicas para la reproducción (CMR, categoría 1A o 1B). En enero de 2018, la entrada del BPA se actualizó con objeto de recoger un motivo adicional para su inclusión en la lista de sustancias candidatas debido a sus propiedades de alteración endocrina que causan efectos adversos en el medio ambiente, con arreglo a la propuesta de Alemania. Esta inclusión del BPA en el Reg. REACH es un paso importante porque la UE reconoce la toxicidad del BPA como disruptor endocrino, con toda la controversia que ha comportado en los últimos años. Esto significa que las empresas estarán mejor informadas sobre los posibles efectos peligrosos y sobre cómo pueden protegerse los trabajadores.

La **Directiva (UE) 2011/8/UE** prohíbe el uso de bisfenol A en la UE en los biberones de plástico para lactantes. En referencia a el aspecto legislativo en España, se ha modificado el Anexo II del Real Decreto 866/2008 (RD, 2008), por el cual se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos de plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo, mediante la Orden PRE/628/2011. Esta modificación se basa en la inclusión en la normativa en referencia al BPA de: “no utilizar en la fabricación de biberones de policarbonato para lactantes” (RD 866/2008, 2008) (Juan-García y col., 2015). Actualmente, en la UE el BPA se considera un producto autorizado para la utilización como material destinado a entrar en contacto con los alimentos (Reglamento UE 10/2011). En el caso de su utilización como material destinado a formar parte de los biberones de plástico para lactantes, el uso de BPA fue prohibido en 2011 (Reglamento 321/2011, 2011).

Por otra parte, hay que destacar que en Francia tienen una normativa específica, bajo la Ley n° 2012-1442, (2012) en la que el queda suspendida la fabricación, importación, exportación y comercialización de cualquier envase de alimentos que contenga BPA (Loi N° 2012-1442, 2012).

Adicionalmente, basado en el principio de precaución, en diversos países de Europa se han tomado iniciativas voluntarias respecto a algunos compuestos disruptores endocrinos. Así, hay restricciones sobre el uso de BPA en barnices y revestimientos de comida enlatada y envasada para niños menores de 3 años en diversos países (Dinamarca desde julio de 2010, Bélgica y Francia desde enero de 2013, en Suecia desde Julio de 2013). En la normativa específica en Francia, en la Ley n° 2012-1442, (2012) queda suspendida la fabricación, importación, exportación y comercialización de cualquier envase de alimentos que contenga BPA (Loi N° 2012-1442, 2012). En Bélgica, Suecia y Dinamarca también está prohibido en otros materiales que entran en contacto con alimentos destinados a lactantes y niños menores de tres años. Francia ha prohibido el BPA en todos los envases de alimentos, contenedores y utensilios. Aunque el uso del BPA en materiales que están en contacto con alimentos está permitido en la Unión, hay una cantidad máxima que se permite que se desprenda del material. La EFSA está reevaluando los riesgos para la salud pública relacionados con la presencia de BPA en los alimentos.

En la publicación realizada por la EFSA en el 2015, se concluye que “los niveles estimados de exposición dietética y de exposición agregada del BPA, en relación con la población con más riesgo de exposición (bebes, niños y adolescentes) es menor al IDT establecido (4 µg/kg pc/ día)”. Se señala también, que el valor es temporal, ya que se espera analizar los resultados que se obtengan de nuevos estudios. Es importante tener en cuenta que en el informe de la EFSA se afirma que, “existen algunas incertidumbres que deben ser evaluadas y estudiadas en referencia a la evaluación de la exposición del BPA de fuentes no dietéticas, como son la exposición a través del papel térmico, cosméticos y polvo” como se ha señalado anteriormente (EFSA, 2015). Se espera dar respuesta a algunas de estas cuestiones mediante la investigación que está llevando a cabo el Programa Nacional de Toxicología de Estados Unidos (NTP) en un futuro próximo.

En 2016 el **Reglamento (UE) 2016/2235** modifica el anexo XVII del R.(CE) 1907/2006 (REACH), estableciendo una limitación a la comercialización del Bisfenol A en papel térmico con una concentración igual o superior al 0.02% en peso. Esta restricción será de obligado cumplimiento en enero de 2020.

En enero de 2018, la Comisión de Medio Ambiente, Salud Pública y Seguridad Alimentaria del Parlamento Europeo aprobó la propuesta de la Comisión de reducir el límite de migración específica (LME) aplicable a plásticos, recubrimientos y barnices para metales y otras fuentes de contacto del BPA de 0,6 mg/kg a 0,05 mg/kg. También se impuso una prohibición de la presencia de BPA en botellas de plástico y envases que contengan alimentos para bebés y niños menores de tres años de edad. Actualmente existe en la Unión Europea un límite en la cantidad de BPA que puede desprenderse de los juguetes para niños de hasta tres años y en cualquier juguete destinado a ser colocado en la boca de un niño. Ese límite de migración actualmente es de 0.1 mg/L de BPA. No obstante, a partir del 26 de noviembre de 2018 comenzará a aplicarse un límite más bajo, de 0.04 mg/L.

Respecto a los **ftalatos**, se ha aprobado la **Directiva (UE) 2005/84/EC** que limita la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos. En particular, establece los límites de 6 ftalatos en juguetes y productos de puericultura fabricados con PVC blando que pueda contener ftalatos, entre ellos el DEHP, el DBP y el BBP. Por tanto, los juguetes destinados a ser introducidos en la boca por niños menores de tres años y que contengan ftalatos, así como su importación, están prohibidos en toda la UE.

En enero de 2018, la Comisión de Medio Ambiente, Salud Pública y Seguridad Alimentaria del Parlamento Europeo aprobó la propuesta de la Comisión de reducir el límite de migración específica (LME) aplicable a plásticos, recubrimientos y barnices para metales y otras fuentes de contacto del BPA de 0,6 mg/kg a 0,05 mg/kg. También se impuso una prohibición de la presencia de BPA en botellas de plástico y envases que contengan alimentos para bebés y niños menores de tres años de edad. Actualmente existe en la Unión Europea un límite en la cantidad de BPA que puede desprenderse de los juguetes para niños de hasta tres años y en cualquier juguete destinado a ser colocado en la boca de un niño. Ese límite de migración actualmente es de 0.1 mg/L de BPA. No obstante, a partir del 26 de noviembre de 2018 comenzará a aplicarse un límite más bajo, de 0.04 mg/L.

Respecto a los **ftalatos**, se ha aprobado la **Directiva (UE) 2005/84/EC** que limita la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos. En particular, establece los límites de 6 ftalatos en juguetes y productos de puericultura fabricados con PVC blando que pueda contener ftalatos, entre ellos el DEHP, el DBP y el BBP. Por tanto, los juguetes destinados a ser introducidos en la boca por niños menores de tres años y que contengan ftalatos, así como su importación, están prohibidos en toda la UE.

1.2. COMPUESTOS DISRUPTORES ENDOCRINOS ESTUDIADOS

Los compuestos disruptores endocrinos estudiados en esta tesis, han sido seleccionados principalmente en base a su potencia estrogénica y su grado de uso o aplicación, y por tanto su posible presencia en el medio acuático. Incluyen compuestos alquilfenólicos, estrógenos naturales y sintéticos y algunos progestógenos, bisfenol A, ftalatos y algunos benzotiazoles y alcoholes etoxilados. La reciente incorporación de diversos EDCs estudiados en la legislación de contaminantes, como por ejemplo APs/APEOs, BPA, algunos ftalatos y estrógenos, confirma la relevancia y el acierto de la selección de los compuestos determinados en esta tesis. En las tablas 1.2.1. a 1.2.3. etc, se incluyen las estructuras químicas, peso molecular (g/mol) y N^o CAS de los principales EDCs analizados en esta Tesis Doctoral.

Los estrógenos naturales tienen en común una estructura formada por cuatro anillos: un fenol, dos ciclohexanos y un ciclopentano. Los estrógenos son esteroides de 17 carbonos, que contienen un anillo fenólico (A) y un grupo β -hidroxil o cetona en la posición 17 del anillo pentacetónico (D). Las diferencias estructurales se encuentran principalmente en la configuración del anillo D, en función del tipo de grupos funcionales que haya en el carbono de la posición 16 o 17. El estradiol (E2), la estrona (E1) y el estriol (E3) se conjugan por los grupos hidroxilo del carbono 3 y/o 17, en forma de sulfatos, de acetatos o de glucuronatos (17 β -estradiol-3-sulfato, 17 β -estradiol-17-sulfato, 17 β -estradiol-3,17-disulfato,...) que son los que más rápidamente son excretados por la orina, aunque también se excretan trazas de esteroides libres. Los esteroides conjugados inactivos pueden ser desconjugados por microorganismos a la forma libre de hormona esteroideal biológicamente activa (Gomes y col., 2009).

Los surfactantes no iónicos como los alquilfenoles polietoxilados (APnEOs), tienen una cadena de unidades de óxido de etileno (EO, *ethylene oxide*). Los compuestos estudiados en esta tesis, el nonilfenol monoetoxilado (NP₁EO) y el dietoxilado (NP₂EO), tienen respectivamente una y dos unidades etoxi. Los grupos éter le proporcionan polaridad, y cuantos más tenga la molécula, más solubles son y por tanto su carácter lipofílico disminuye. La estructura de los alquilfenoles (APs) consiste básicamente en un grupo alquilo que puede cambiar en tamaño y posición, con entre 1 y 12 átomos de carbono, enlazado a un anillo fenólico. La El nonilfenol (NP) y el octilfenol (OP) tienen un anillo fenólico y una cadena de nueve y ocho carbonos respectivamente en la posición para. Pueden unirse al fenol en diversos puntos del anillo, formando distintos isómeros que se diferencian en base a dos criterios: (i) la posición de la cadena carbonada con respecto al anillo fenólico (isómeros orto-, meta- y para-) y (ii) el grado de ramificación de la cadena carbonada (isómeros lineales y ramificados). NP es el producto de descomposición del surfactante no-iónico NPEs, ampliamente utilizado y vertido al medioambiente. Su forma comercial más común es el 4-NP (Giger y col., 1984; Sekela y col., 1999). La mezcla técnica final de NP está compuesta por más de 22 isómeros de 4 monoalquilfenoles sustituidos (Wheeler y col., 1997; Thiele y col., 2004).

Por lo que hace referencia a la estructura química de los bisfenoles, ésta consiste en dos anillos 4-hidroxifenoles unidos al átomo de carbono central de la cadena de isopropilideno. Los bisfenoles con grupos OH en la posición para, como el bisfenol A (BPA; 4,4'-(propano-2,2-diil) difenol) y una configuración angular son apropiadas para enlaces de hidrógeno al lado aceptor del receptor de estrógenos. Su estructura

química es similar a la hormona sintética dietilstilbestrol. Se ha comprobado que tiene una elevada actividad estrogénica a niveles entre 2-5 $\mu\text{g/L}$ (Sohoni y Sumpter, 1998).

Tabla 1.2.1. Estructuras químicas, peso molecular (g/mol) y N° CAS de las hormonas esteroideas estudiadas

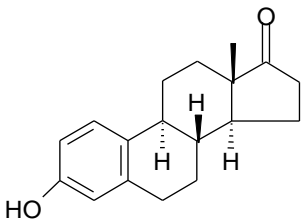
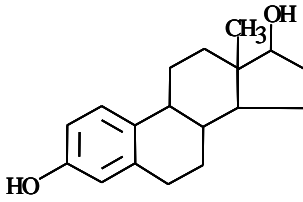
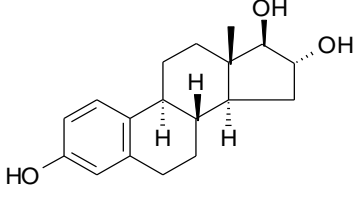
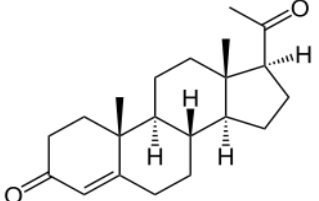
Nombre hormonas esteroideas	Acrónimo	Estructura Química Hormonas esteroideas	Estrógeno o Progestógeno	Peso molecular (g/mol)	N° CAS
HORMONAS ESTEROIDAS DE ORIGEN NATURAL					
ESTRONA	E1		E	270,37	53-16-7
17- β -ESTRADIOL	E2		E	272,39	50-28-2
ESTRIOL	E3		E	288,39	50-27-1
PROGESTERONA	PROG		P	314,46	57-83-0

Tabla 1.2.1. Estructuras químicas, PM (g/mol) y N° CAS de las hormonas esteroideas estudiadas (Continuación))

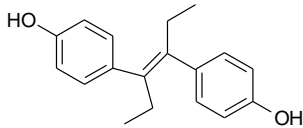
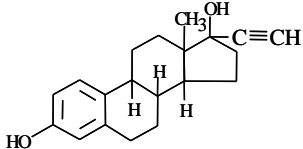
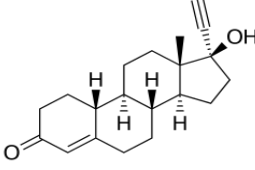
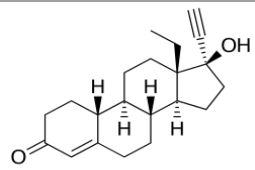
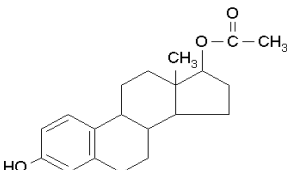
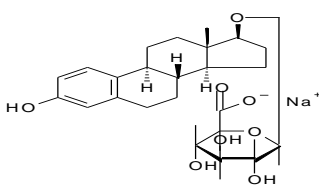
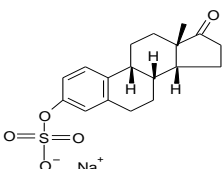
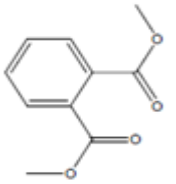
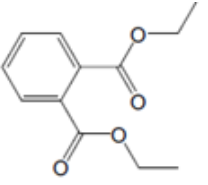
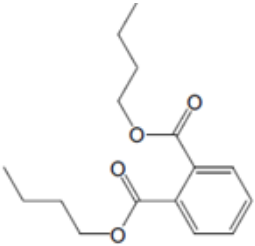
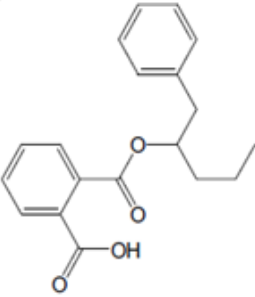
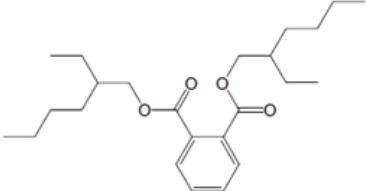
Nombre hormonas esteroideas	Acrónimo	Estructura Química	Estrógeno o Progestógeno	PM (g/mol)	N° CAS
HORMONAS ESTEROIDAS DE ORIGEN SINTÉTICO					
DIETILSTILBESTROL	DES		E	268,35	56-53-1
ETINILESTRADIOL	EE2		E	296,41	57-63-6
NORETINDRONA	NOR		P	298,419	68-22-4
LEVONORGESTREL	LEV		P	312,446	797,63-7
Hormonas esteroideas conjugadas					
β-Estradiol 17-acetato			E	314,42	1743-60-8
β-Estradiol 17-(β-D-glucuronido) *			E	470,50	15087-02-2
Estrona 3-sulfato *			E	372,40	438-67-5

Tabla 1.2.2. Estructuras químicas, peso molecular (g/mol) y N° CAS de los alquilfenoles, alquilfenoles etoxilados y el BPA estudiados.

Nombre compuesto alquilfenólico o BPA	Acrónimo	Estructura Química	Peso molecular (g/mol)	N° CAS
OCTILFENOL	OP		206	140-66-9
NONILFENOL	NP		220	84852-15-3
NONILFENOL MONOETOXILADO	NP ₁ EO		264	104-35-8
NONILFENOL DIETOXILADO	NP ₂ EO		308	85-68-7
NONILFENOL ETOXILADO	NPnEO n 3-15		352-748	117-81-7
BISFENOL A	BPA A		228	80-05-7

Los ftalatos (PEs) o ésteres de ácidos ftálicos (PAEs) son los ésteres dialquil o alquil aril del ácido 1,2-benzendicarboxílico (ácido ftálico). Por tanto, la estructura química básica de los ftalatos es un ácido benceno dicarboxílico con dos lados de la cadena, que pueden ser grupos alquil, benzil, fenil, cicloalquil o alkoxy. Varios estudios han demostrado que los ftalatos con cadenas ester más cortas como DMP, DEP, DBP y BBP pueden ser fácilmente biodegradados y mineralizados. Por otra parte, ftalatos con cadena larga como el DEHP son menos susceptibles a la biodegradación (Wang y col. 2000; Chang y col. 2004).

Tabla 1.2.3. Estructuras químicas, peso molecular (g/mol) y N° CAS de los ftalatos estudiados.

Nombre Ftalatos	Acrónimo	Estructura Química Ftalatos	PM (g/mol)	N° CAS
DIMETILFTALATO	DMP		194,2	131-11-3
DIETILFTALATO	DEP		222,2	84-66-2
DI-n-BUTILFTALATO	DBP		278,4	84-74-2
BUTILBENZILFTALATO	BBP		312,4	85-68-7
2-DIETIL-HEXILFTALATO	DEHP		390,6	117-81-7

1.2.1. ORIGEN, USOS Y APLICACIONES DE LOS EDCs ESTUDIADOS

Hormonas esteroideas: Las de origen natural se sintetizan mayoritariamente en el tejido suprarrenal, ovarios, testículos y placenta. La clasificación de estas sustancias se realiza en función a los receptores estrogénicos a los que se unen, existiendo 5 grupos bien diferenciados: (a) estrógenos, (b) andrógenos (c) mineralcorticoides, (d) glucocorticoides y (e) progestágenos (Raven y col., 2000). Los estrógenos naturales (17- β -estradiol (E2), estrona (E1) y estriol (E3)) derivan del colesterol y son predominantemente hormonas femeninas, cumpliendo con un rol determinante en el mantenimiento de diferentes procesos reproductivos y de desarrollo. Los andrógenos (testosterona, dehidroepiandrosterona y androstenediona) regulan diversos procesos implicados en la regeneración de tejidos musculares, óseos y en la piel. Los glucocorticoides (cortisol) se generan en las glándulas adrenales en respuesta a diferentes situaciones de estrés, como por ejemplo, durante la realización de ejercicio físico, trastornos emocionales, enfermedad o inanición. Los progestágenos participan en el balance hormonal, controlando los niveles de estrógenos y andrógenos en el organismo (Ying y col., 2002).

Las hormonas esteroideas sintéticas han sido empleadas desde hace décadas en el campo de la medicina humana y en la ganadería con diferentes propósitos, como por ejemplo, en distintos métodos anticonceptivos, como promotores del crecimiento, o en diferentes terapias clínicas (Ruggiero y col., 2002; Chen y col., 2008). Hoy en día, se considera que son los medicamentos más prescritos a nivel mundial. Dentro de este grupo de compuestos sintéticos, las hormonas esteroideas de mayor relevancia medioambiental son las de naturaleza estrogénica, como por ejemplo el 17 α -etinilestradiol (EE2), derivado del E2 y uno de los medicamentos más usados, utilizado en la mayoría de píldoras orales contraceptivas combinadas (Aris y col., 2014), el mestranol (MES), la noretindrona (NOR) o el dietilestilbestrol (DES), compuestos ampliamente utilizados como anticonceptivos, en el tratamiento de la menopausia y del cáncer de mama y de próstata (Ruggiero y col., 2002). El norgestrel (progestina) también se emplea en grandes cantidades como principio activo en algunos métodos anticonceptivos, como por ejemplo los implantes subcutáneos o los sistemas anticonceptivos de emergencia (píldora del día después o dispositivos intrauterinos) (Steyn y col., 2009). En el caso del estrógeno (DES), a pesar de la restricción y prohibición del uso de esta hormona estrogénica sintética, ha seguido detectándose en el medioambiente principalmente por su uso ilegal en el engorde de ganado (López de Alda y col., 2000).

Todas las hormonas esteroideas, bien sean endógenas o exógenas, naturales o sintéticas, están sujetas a una variedad de reacciones metabólicas en el interior de cualquier organismo vivo: oxidación, hidroxilación, metilación, o la conjugación con el ácido glucurónico o sulfúrico. No obstante, una cantidad significativa del esteroide original se excreta (bilis, orina y heces fecales) (Shemesh y col., 1994), tanto en su forma libre como en sus formas conjugadas (glucurónido y sulfatos). A modo de ejemplo, Johnson y col. (2000), realizó una estimación de las excreciones diarias de diferentes hormonas esteroideas en diferentes grupos poblacionales, observando que una mujer menstruando excreta aproximadamente el doble de E2 y E1 (3.5 y 8 $\mu\text{g}/\text{día}$) que un hombre (1.6 y 3.9 $\mu\text{g}/\text{día}$ respectivamente), y las mujeres embarazadas secretan 259, 600 y 6000 $\mu\text{g}/\text{día}$ de E2, E1 y E3 respectivamente, una cantidad muy superior al resto (Johnson y col., 2000).

Este tipo de excreciones supone la mayor fuente de emisión y entrada de hormonas esteroideas al medioambiente, las cuales, en su mayor parte, se canalizan a través de las EDARs (Hamid y col., 2012).

E2 es el primer metabolito con la mayor potencia estrogénica, mientras que 17R y E1 son los metabolitos secundarios con potencia reducida. Se considera que E3 es el metabolito final con la potencia menor. Los índices de excrección y tipos de estrógenos difieren en las distintas especies, por ejemplo, mientras que las vacas lecheras excretan 17R, E2, E1 y E3 y contienen una gran cantidad de 17R, pudiendo llegar 0.8-1.2 mg/día de 17R por vaca, otras especies animales excretan principalmente E2, E1 y E3 como en ganado porcino y aves de corral (Hanselman y col., 2003). Las hormonas esteroidales se encuentran asociados con sólidos, como fango municipal y abonos o estiércol del ganado. Así, en un artículo revisión (Lange y col, 2001). se reporta una actividad estrogénica total de 48.5 ton métricas de E2 y E1 EEQ por año por la excrección de ganado en USA.

Compuestos alquilfenolicos: Los surfactantes son un grupo diverso de compuestos químicos que están diseñados para tener propiedades de limpieza o solubilización: formación de emulsiones, dispersión, detergencia. Generalmente consisten en un grupo con cabeza polar (cargado o no), y una cola hidrocarbonada no polar, la cual no es fácilmente disuelta en agua. Por tanto, los surfactantes combinan propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas en una molécula. Son ampliamente utilizados en detergentes de limpieza domésticos, productos de higiene personal, textiles, pinturas, polímeros, formulaciones de plaguicidas, fármacos, minería, industrias de recuperación de aceite, papel y pulpa del papel. Hay tres tipos de surfactantes principalmente: aniónicos, no iónicos y catiónicos.

Los alquilfenoles etoxilados (APEOs) constituyen un 40% de los surfactantes a nivel mundial (Gallart y Ayala y col., 2009), siendo una parte importante de los surfactantes no iónicos en el mercado. La producción mundial de APEOs estimada en 1997 fue de 500.000 toneladas con 80% de nonilfenoles etoxilados (NPEOs) y 20% de octilfenoles etoxilados (OPEOs) (Renner, 1997, Loos y col., 2008). Las mezclas comerciales de APnEOs son mezclas polidispersas de isómeros (con diferente ramificación de las unidades alquil) y oligómeros (con diferentes números de unidades de óxido de etileno (Gallart y Ayala y col., 2009). Algunas aplicaciones de los APEOs son la fabricación de pinturas acuosas, productos agrícolas, cosméticos o industria textil. Sin duda, la más importante es como surfactantes no iónicos (componentes de los jabones y detergentes), debido a que los grupos etoxi de su estructura le proporcionan una elevada solubilidad en agua, lo que permite dispersar suciedad y grasa de la superficie de la misma (Ying y col., 2002).

Existe un gran número de APEOs en el mercado, que se distinguen por el número de grupos etoxi que presentan, que puede variar entre 1 y 50. Sin embargo, el nonilfenol etoxilado (NPEO) y el octilfenol etoxilado (OPEO) suponen un 80% del uso de todos ellos (Warhust,1995). El empleo de los APEOs como surfactantes alcanzó su máximo auge a mediados de la época de los 70. Sin embargo, ya en la década de los 80, su uso se restringió en algunos países europeos al determinarse la presencia de APs, considerados tóxicos, entre sus productos de degradación. En los años 90 aumentaron los estudios de toxicidad de APs y se demostró además su actuación como disruptores endocrinos, estableciéndose un control sobre la producción de los correspondientes etoxilados y aumentando la preocupación sobre el amplio uso de APEOs por sus productos de biodegradación relativamente estables, nonilfenol (NP) y octilfenol (OP). De

hecho, los alcoholes lineales etoxilados son utilizados como compuestos alternativos, aunque no siempre con éxito (Schmitz-Afonso y col., 2003).

Los alquilfenoles (APs) son compuestos químicos sencillos que tienen múltiples utilidades como productos industriales y domésticos, siendo los de mayor interés industrial los 4-octilfenoles y 4-nonilfenoles, cuya cadena carbonada (de ocho y nueve carbonos respectivamente) se sitúa en posición *para*- con respecto al anillo fenólico. Se emplean como herbicidas, surfactantes en la síntesis de detergentes o como aditivos antioxidantes de polímeros plásticos. De hecho, se añaden al polietileno de alta densidad (HDPE), al tereftalato de polietileno (PET) y al cloruro de vinilo (PVC) para proporcionar estabilidad y disminuir su fragilidad (Loyo-Rosales y col., 2004). Los derivados polietoxilados son utilizados también en la industria textil y papelera, en la fabricación de productos de limpieza y como espermicidas. Otra de sus aplicaciones más destacadas es como reactivo en la síntesis de los alquilfenoles etoxilados (APEOs), en la cual reaccionan con óxido de etileno.

El nonilfenol (NP) se utiliza en la fabricación de antioxidantes, aditivos de aceite lubricante y la producción de surfactantes NPEOs, el cual constituye su mayor uso (65%) (USEPA, 1990). NPEOs son surfactantes altamente rentables con un rendimiento excepcional y consecuentemente ampliamente utilizados en aplicaciones industriales, comerciales y domésticas, como detergentes, emulsionantes, agentes dispersantes, humectantes y antiestáticos, así como solubilizantes (Langford y col., 2002; Lorenc y col., 2003).

En 1996 se estimó que los vertidos o descargas directas de los compuestos derivados de NP por el sector industrial fueron el 0.5 % (96 ton) de la producción total anual en Canadá (Servos y col., 2003). Sin embargo, la principal fuente de NP en el medioambiente es la degradación de los NPEOs (Langford y Lester, 2002). Los NPEOs contienen una cadena etoxilada con una recalcitrancia que aumenta con la disminución del número de grupos etoxilados (Shao y col., 2003; Soares, 2005).

Bisfenol A (BPA): El bisfenol-A, fue sintetizado por primera vez en 1891 y es uno de los compuestos químicos más extensamente producido y usado en el mundo. Es utilizado principalmente (95%) en la industria como monómero en la producción de polímeros sintéticos incluyendo resinas epoxi y policarbonatos (Staples y col., 1998; Burrige 2003; Flint y col., 2012; www.bisphenol-a.org), que constituyen respectivamente un consumo de BPA de casi el 30% y el 70% respectivamente de la producción total de esta sustancia (Rikz 2001; Huang y col., 2012). A nivel mundial se produce más de un millón de toneladas de BPA anualmente (Vandenberg y col., 2009). Debido al incremento en la demanda de resinas de policarbonato y epoxi, la producción de BPA ha crecido constantemente en los últimos años. En 2003 la producción de BPA excedió 2.7 o 3.8 millones de toneladas (Michalowicz y col., 2014), en 2007 fue entre 4.7 y 6 toneladas anuales (Jiao y col., 2008), en 2011 se produjeron 5.5 millones de toneladas en USA (Rochester y col., 2013) y su producción continúa aumentando (Vandenberg y col., 2007). El mercado asiático, y en particular China, es el que registra un mayor consumo de BPA (Jiao y col., 2008; Huang y col., 2012). En España, la fábrica de Cartagena, tiene una alta producción de BPA (Olea y col., 2012). También se utiliza este compuesto en la fabricación de resinas de poliéster, polisulfona y poliacrilato y de retardantes de llama.

Las buenas propiedades mecánicas que confiere el BPA a los polímeros sintéticos, como adsorción de humedad y estabilidad térmica, hace que sean utilizados en la producción o fabricación de innumerables productos, incluyendo envases plásticos y recipientes de alimentos, botellas, tuberías de agua, juguetes, tetinas de biberones, equipamiento médicos, productos dentales, dispositivos electrónicos, materiales adhesivos, lentes ópticas, pinturas, materiales de construcción, discos CD/DVD, etc (Huang y col., 2012). BPA también es utilizado en plásticos de PVC como estabilizante y antioxidante en la producción de cloruro de vinilo (Nam y col., 2010), y en la masiva producción de papel térmico, utilizado en recibos, faxes, libros y etiquetas (Vandenberg y col., 2009) y después de reciclar, es también utilizado para producir folletos, tickets, sobres, periódicos, rollos de cocina, papel de wáter y cartones para alimentos (Liao y col., 2012; Nam y col., 2010). Adicionalmente, BPA también es utilizado en la producción de poliacrilatos, poliéster y capas de laca o barniz de latas, los cuales después de degradarse pueden ser importantes fuentes de BPA en el medioambiente y en los alimentos (Vandenberg y col., 2012; Michalowicz y col., 2014). El policarbonato se utiliza ampliamente en la fabricación de materiales en contacto con alimentos, como biberones, vajillas, utensilios de horno y microondas, envases de alimentos, botellas de agua, leche y otras bebidas, equipos de procesamiento y tuberías de agua. Las resinas epoxi se seleccionan con frecuencia debido a sus propiedades protectoras contra la corrosión, su estabilidad térmica y resistencia mecánica, empleándose fundamentalmente como recubrimientos para un gran número de aplicaciones industriales de consumo, tales como envases y latas de alimentos y bebidas y recubrimientos protectores, como el revestimiento de las tapas metálicas de jarras y botellas de vidrio, incluidos los envases de las preparaciones para lactantes. Los aditivos poliméricos generalmente no se encuentran enlazados a los polímeros y puede darse una migración hacia los alimentos o bebidas y aguas que se encuentran en contacto con el plástico. Estos usos provocan por tanto la exposición de los consumidores al BPA a través de la alimentación. Las ingestas alimentarias diarias, basadas en las concentraciones medidas en los alimentos, varían enormemente. En Europa la EFSA (*The European Food Safety Authority*) estableció la ingesta diaria de BPA en 50 $\mu\text{g}/\text{kg mc}$ (WHO y col., 2012). Posteriormente, en enero de 2015, la redujo de 50 a 4 $\mu\text{g}/\text{kg mc}/\text{día}$. Como ejemplo, se calcula que en Europa la ingesta diaria en los lactantes amamantados es de aproximadamente 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de masa corporal (mc) vs 2.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de mc en los lactantes alimentados con sucedáneos de la leche materna mediante biberones no fabricados con policarbonato. La Comisión Europea ha adoptado el principio de cautela y ha restringido el uso del BPA en biberones para lactantes a través de la Directiva 2011/8/UE.

Ftalatos: son compuestos químicos utilizados como plastificantes para dar flexibilidad y plasticidad (Skama, VP., 2016) en la fabricación de materiales plásticos y como antioxidantes en multitud de productos comerciales, muchos de ellos utilizados comúnmente para el empaquetado, conservación o almacenaje de artículos para el consumo humano. Pueden llegar a contribuir al 50% del peso final del producto. DEHP es el compuesto más ampliamente utilizado (>95%) como plastificante para polímeros (principalmente PVC, pero también otras resinas de vinilo y plásticos de éster-celulosa (NTP, 2011)). La función de los ftalatos como el DEHP es incrementar la flexibilidad y manejabilidad de los polímeros de gran peso molecular. El PVC flexible es ampliamente utilizado en dispositivos médicos (tubos intravenosos y bolsas de transfusión de sangre), juguetes, cables, materiales de construcción (Teil y col., 2007), cosméticos y productos de aseo personal (Romero-Franco y col., 2011; Koniecki y col., 2011), equipamiento de laboratorio (ATSDR, Agency

for Toxic Substances and Disease Registry), etc. También se utiliza DEHP como aditivo en materiales cerámicos para electrónica y en materiales estructurales, fármacos, en tintas de impresión, pinturas (Chen y col., 2008), adhesivos, sellantes y gomas. En la UE no está permitido para uso en juguetes y artículos de puericultura a concentraciones superiores a 0.1% a través de la Directiva 2005/84/CE. Posteriormente, algunos ftalatos, como por ejemplo el DEHP, DBP y BBP, han sido incluidos en el Reglamento (CE) 1907/2006 (REACH) y en USA *the Consumer Product Safety Improvement Act (2008)* prohibió el uso de seis ftalatos (DEHP, DBP, BBP, DINP, DIDP, NNOP) en algunos productos de puericultura y juguetes para niños.

Cada año, se producen mundialmente más de 2 millones de toneladas (t) de DEHP (Koch y col., 2003; Chan y col., 2007) y se estima una producción de ftalatos superior a los 5 millones t/año (Sharma, 2016), siendo alrededor de 1 millón t/año en la UE, donde aproximadamente el 50% corresponde a DEHP (Lin y col., 2009). Por ejemplo, en Alemania el 60% de la producción de ftalatos (250.000 t) se dedica a DEHP y alrededor de 100.000 t/año es emitido en el medioambiente a través de residuos que contienen DEHP (Koch y col., 2003). En USA, el uso de DEHP como plastificante registrado en 2005 fue referido ser 40% para dispositivos médicos, 30% para recipientes de comidas, y 30% para aplicaciones industriales (Bizzari y col., 2007).

Al no estar unidos a la matriz del material plástico, su migración es sencilla, lo que justifica que se encuentren con frecuencia en medios muy diversos. Así, la migración de DEHP de las superficies de los plásticos da lugar a la liberación en el medioambiente o en humanos a través de múltiples rutas (Koch y Calafat, 2009; Wittassek y col., 2011). Estudios recientes sugieren que el uso intensivo de materiales de plástico es responsable del incremento de la exposición de la población a DEHP (Chen y col., 2008; Lin y col., 2011). Conforme a estudios previos (Latini y col., 2003; Adibi y col., 2003; Wittassek y col., 2011), los humanos estamos expuestos al DEHP y otros ftalatos vía ingestión, inhalación y exposición dérmica. Wittassek y col., sugirieron que la comida es la mayor fuente de exposición a ftalatos ya que DEHP no está fuertemente unido al polímero y por tanto puede ser liberado a la comida (Wittassek y col., 2011) por migración, evaporación, lixiviación y abrasión directa de los productos donde son utilizados (Sioen y col., 2012). Se estima la ingesta diaria de DEHP en el rango de 3-30 mg/kg de masa corporal/día (NTP-CHRH, 2003) y la media a través de la comida específicamente de 2.4 mg/kg de mc/día (Fromme y col., 2007). PAEs y BPA son rápidamente metabolizados y excretados en orina, con vidas medias de eliminación inferiores a 24 horas (Sharma, VP., 2016). La liberación de los ftalatos en el medioambiente ocurre a través de volatilización y disolución durante la producción, transporte y almacenamiento (Sirivithayapakorn y col., 2008). También pueden lixiviar de los plásticos que son tirados en vertederos municipales.

Los ftalatos de menor peso molecular están siendo gradualmente reemplazados en varios países por ftalatos de alto peso molecular o plastificantes para minimizar las implicaciones adversas en la salud (Sharma VP., 2016). Adicionalmente, se están realizando esfuerzos para buscar o desarrollar plastificantes más seguros comparativamente, preferiblemente de fuentes naturales mediante la investigación de las sinergias entre los polímeros naturales y la ciencia de aditivos seguros (Sharma, VP., 2016).

Plaguicidas: Son contaminantes orgánicos frecuentemente detectados en el medioambiente acuático debido a su amplio uso en agricultura y a sus propiedades físico-químicas, que permiten su

transporte y persistencia en el medio. Su presencia se considera, por tanto, el principal factor de estrés químico para los organismos presentes en los ecosistemas acuáticos (Bunzel y col. 2013).

La estructura química del principio activo ayuda a predecir la reactividad de estas sustancias en las diversas matrices ambientales, a través de la evaluación de la polaridad, el tamaño de la molécula y de muchas otras propiedades que cada principio activo posee. La clasificación en base a su toxicidad contribuye a un uso más controlado de estos compuestos, pues indica el grado de peligrosidad de los plaguicidas para el medioambiente o las personas. Actualmente existen más de 500 ingredientes activos de plaguicidas solo en Europa, siendo España el país con mayor número de ingredientes activos de plaguicidas registrados en Europa. A continuación, se detallan las principales características y usos de los 10 plaguicidas seleccionados en esta tesis, objeto de estudio en Portugal (Capítulo 4), agrupados en familias (Lacorte y col., 2001; Köck, Tesis doctoral, 2014):

Triazinas (atrazina, simazina y TBA): este grupo de herbicidas es uno de los más conocidos y utilizados desde hace más de 40 años. La mayoría de las triazinas presentan una baja solubilidad en agua (a diferencia de sus productos de transformación), lo que indica una alta estabilidad y una mayor solubilidad en medios orgánicos. Ampliamente utilizados, su uso más habitual es como herbicidas para controlar malezas tanto de un modo preventivo como curativo. Una vez incorporadas en el suelo pueden ser absorbidas por las plantas o degradadas durante un periodo de días a meses, aunque en general se puede afirmar que son altamente persistentes (algunas hasta un año), lo que puede provocar contaminación de las aguas subterráneas cercanas.

Atrazina: es uno de los herbicidas más empleados a nivel mundial. Sin embargo, su uso está restringido en USA y ha sido prohibido en varios países de la UE debido a que se asocia con una relativamente elevada toxicidad crónica y potencial de acumularse como sustancia recalcitrante en agua superficial y subterránea. Es relativamente estable bajo condiciones medioambientales y en función de las características del suelo puede lixiviar. Se aplica a diversos cultivos; maíz, viñas, bananas, espárragos, piñas, etc.

Simazina: es un herbicida sistémico selectivo ampliamente utilizado en cultivos (maíz, alcachofas, espárragos, te, fresas, nueces, olivas, piñas, cítricos, etc.). La contaminación difusa debida a la simazina es medioambientalmente relevante, ya que las concentraciones son en algunos casos preocupantes, y en combinación con su persistencia en el medio pueden causar serios problemas debido a la contaminación difusa y la lixiviación en acuíferos. En los puntos en los que es detectada a niveles más altos debería incluirse en el estudio la determinación de su producto de degradación, la desetilsimazina.

Terbutilazina: uno de los principales metabolitos de la atrazina, es utilizado en algunos países reemplazándola.

Cloro acetanilidas: *Alacloro* y *metolacloro* son plaguicidas que inhiben la síntesis de proteínas afectando al crecimiento normal de la planta. Es por ello que se usan tanto en aplicaciones de pre-emergencia como de post-emergencia, incorporándolos al suelo desde donde se absorben por los brotes de las semillas germinadas o por vía radicular. Se aplican al maíz y a otros cultivos. Suelen ser bastante tóxicos, como en el caso del alacloro, incluido en la lista de las 33 sustancias prioritarias de la UE. Estos herbicidas son estables en el suelo por 6-8 semanas y en agua pueden ser degradados por acción microbiana a derivados de anilinas, también tóxicos. Por tanto, su determinación e inclusión en programas de vigilancia ambiental es muy importante.

Clorofenoles: se detectan a menudo en aguas superficiales y de bebida. Son generados en varios procesos industriales (fabricación de papel y pulpa, plásticos, textiles y en la industria del tinte) y detectados en efluentes a niveles que pueden causar efectos tóxicos (0,1 – 10 µg/L). Tienen una tendencia alta a acumular en la cadena trófica, debido a su toxicidad, efectos adversos para los humanos y la biota y su persistencia en el medioambiente (especialmente para los compuestos altamente clorados), lo cual justifica su inclusión en la lista prioritaria. Adicionalmente, son los productos de degradación de varios herbicidas clorados y pueden ser detectados tanto en zonas agrícolas como a distancia de estas zonas. Los clorofenoles seleccionados en el PVA en Portugal por haber sido detectados en más muestras han sido:

Pentaclorofenol (PCP), utilizado como fungicida en la preservación de la madera y en el control de las termitas, como bactericida en la industria del papel y el curtido, para eliminar moluscos en los circuitos de refrigeración de industrias, etc. La UE ha indicado la necesidad de controlar sus niveles en el medioambiente y reducir sus emisiones debido a su toxicidad y persistencia en el medio. En su síntesis se generan impurezas, que junto al PCP son responsables de la difusión de dioxinas en el medio ambiente. Las NCA (o EQS) establecidos para este compuesto son 2 µg/L para efluentes y 0,1 µg/L para aguas.

2,4,6, Triclorofenol (2,4,6-TCP) es un fenol clorado utilizado como fungicida, herbicida, insecticida y antiséptico desfoliante.

Compuestos de origen industrial: con origen en diversos procesos industriales:

Tributilfosfato, compuesto utilizado en varios procesos industriales, (textiles, curtidos, etc).

Diversos: se agrupan aquellos plaguicidas con diversos orígenes:

Irgarol 1051 es un agente anti-incrustante utilizado en las pinturas de los barcos, generalmente en los de eslora inferior a 25m, por lo que normalmente se detecta en puertos marinos o aguas costeras. En algunos países (ej: Dinamarca) ha sido prohibido por sus propiedades fitotóxicas.

Propanil es un herbicida selectivo, post-emergente de contacto, y de amplio espectro, para uso en cultivos de arroz riego y seco. Tiene bajo potencial de bioconcentración y su toxicidad varía de ligera a moderada (para aves, peces, anfibios, insectos, etc). Puede ser altamente fitotóxico si se mezcla con carbamatos u organofosforados.

1.2.2. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS EDCs.

Las propiedades físicas y químicas de los compuestos permiten entender su distribución en el medio ambiente y los posibles efectos que provocan sobre los organismos. De igual manera, estas propiedades han de ser consideradas a la hora de escoger y optimizar el método analítico para su determinación.

Debido a sus propiedades físico-químicas, la mayoría de EDCs tienden a adsorberse en superficies sólidas como sedimentos o en biota. La repartición de los EDCs en estas fases está definida por su solubilidad y coeficientes de partición. Los valores de coeficientes de partición octanol-agua ($\log K_{ow}$) aumentan con la lipofilidad y se correlacionan inversamente con su solubilidad. K_{ow} , K_{oc} y H_c pueden ser utilizadas para determinar la eficacia de la adsorción, degradación y volatilización durante el tratamiento. Normalmente se considera que aquellos compuestos con valores de constante de Henry inferiores a $1.0 \cdot$

$10^{-7} \text{ atm} \cdot \text{m}^3 / \text{mol}$ son poco volátiles. En las Tablas 1.2.4., 1.2.5. y 1.2.6. se indican las propiedades físico-químicas de los EDCs estudiados en esta tesis.

Tabla 1.2.4. Propiedades físico-químicas de EDCs estudiados en esta tesis

Compuesto	N. CAS	Solubilidad ^a agua a 25 °C (mg/L)	log K _{ow} ^a	pKa	Cte de Henry K _H a 25 °C (atm m ³ /mol)
E1	53-16-7	3 ^{d,g}	3.13 ^g	10.3-10.8	3.8×10^{-10}
E2	50-28-2	3.6 ^{d,g}	3.94 ^g	10.71	3.64×10^{-11}
E3	50-27-1	4.15 ^{d,g}	2.81 ^g	10.4	3.8×10^{-10}
EE2	57-63-6	4.8 ^{d,g}	4.15 ^g	10.3	7.94×10^{-12}
DES	56-53-1	3.32 ^c	5.64 ^g	9.73	
4-tOP	140-66-9	19.0	4.12 ^h		8.0×10^{-6c}
4-n-OP	1806-26-4	12.60 ^a	4.56	10.38	6.9×10^{-5c}
NP	84852-15-3	5.43 ^a	4.48	10.28	3.0×10^{-5c}
4-n-NP	104-40-5	4.90 ^a	4.76		1.5×10^{-5}
NP ₁ EO	27986-36-3	3.02 ^a	4.17		
NP ₂ EO	9016-45-9	3.38	4.21		
BPA	80-05-7	120	3,32	9,6 -11,3	4.1×10^{-9c}

Datos tomados de ^a(Ahel y Giger, 1993), ^b(Staples y col., 1998), ^c(Dachs y col., 1999), ^d(Ying y col., 2002), ^e(Ruggiero y col., 2002), ^f(Quintana y col., 2007), ^g(Briciui y col., 2009), ^h(Priac y col., 2017).

Tal y como puede observarse, la mayoría de los compuestos seleccionados presentan valores de coeficientes de partición octanol-agua (log K_{ow}) moderados. Este hecho indica que estas sustancias van a presentar una cierta tendencia a asociarse formando complejos orgánicos, o a adsorberse en parte al material particulado (PM) presente en las muestras y por tanto, a acumularse en los sedimentos (Campbell y col., 2006). El estudio de estos contaminantes en la fase sólida de muestras medioambientales ha ido ganado relevancia en la comunidad científica, dado que, una vez que estas sustancias se han asociado a la fracción sólida, su biodisponibilidad en el medioambiente aumenta considerablemente.

Las propiedades físico-químicas (FQ) de las familias de EDCs estudiadas son:

Hormonas esteroideas: Las propiedades físico-químicas más importantes a nivel medioambiental se muestran en la Tabla 1.2.4. Los estrógenos naturales muestran una solubilidad en torno a los 3-3.6 mg/L, mientras que la de los estrógenos sintéticos es significativamente inferior: 4.8 mg/L para el EE2, 3.32 mg/L para el DES y 0.3 mg/L para el MES (Ying y col., 2002). Por su parte, los log K_{ow} para las hormonas naturales están comprendidos entre 2.81 (E3) y 3.94 (E2). Los estrógenos sintéticos muestran valores superiores: 4.15 y 5.64 para el EE y DES respectivamente (Ruggiero y col., 2002) y muestran su tendencia a ser asociados con material particulado. Tanto las hormonas naturales como las sintéticas muestran bajos coeficientes de la ley de Henry (H_c) y presiones de vapor muy bajas ($2.3 \cdot 10^{-10}$ - $6.7 \cdot 10^{-10}$ mm Hg), lo cual indica que se trata

de compuestos muy poco volátiles, sin embargo la adsorción en partículas aéreas puede ocurrir y ha sido demostrada la actividad estrogénica mediante inmunoensayos para bajas concentraciones de β -estradiol en aire particulado, sin embargo su presencia en aire apenas ha sido estudiada. EE2, derivado del E2 con estructura química similar, es moderadamente soluble en etanol, pero tiene relativamente una baja solubilidad en agua (4.8 mg/L at 20 °C) comparado con los esteroides estrogénicos naturales. EE2 es un compuesto orgánico no polar e hidrofóbico con baja volatilidad y es más resistente a la biodegradación (Feng y col., 2010; Li y col., 2013). Se espera que la adsorción en suelos o sedimentos sea un factor significativo en reducir las concentraciones en la fase acuosa (Lai y col., 2000; Ying y col., 2002).

Los estrógenos libres (no conjugados), son moderadamente hidrofóbicos ($\log K_{ow}$ 2.81-5.64) y débilmente solubles en agua (3-4.8 mg/L). Los estrógenos conjugados, glucurónidos (GLU) y/o sulfatos (SUL) no tienen actividad biológica y se disuelven en solución acuosa en cantidades muy superiores a sus homólogos no conjugados, debido a la substitución del grupo hidroxilo original por grupos funcionales polares SUL/GLU, con mayor peso molecular.

Compuestos alquilfenólicos: Los alquilfenoles, con valores de $\log K_{ow}$ entre 4.12 (OP) y 4.48 (NP), son compuestos lipofílicos ($\log K_{ow} > 4$) y tenderán a distribuirse o estar asociadas en las fases sólidas en el medioambiente (fangos, sedimentos y material particulado). Por tanto, tienen gran tendencia a acumularse en los tejidos grasos de los organismos, lo cual supone un riesgo debido a sus propiedades estrogénicas. Por otra parte, estos contaminantes suelen aparecer asociados a los suelos y sedimentos, disminuyendo la capacidad de adsorción con la polaridad.

Los APs presentan una solubilidad en agua relativamente baja (de 5.4 mg/L (NP) y 12.6 mg/L (OP) (Ahel y Giger, 1993a, b), que disminuye a medida que aumenta el número de átomos de carbono en la cadena alquílica; para el mismo número n, los isómeros ramificados son más solubles en agua que sus correspondientes lineales. Este perfil físico-químico indica que NP y OP bioacumulan en los organismos.

En cuanto a su volatilidad, los APs son poco volátiles, como demuestran los valores de la constante de Henry ($H \sim 10^{-5}$) (Salgueiro y col., 2013). Sin embargo, los APs pueden encontrarse en la atmósfera debido a su volatilización en EDARs y su emisión industrial directa. Los estudios en aire sugieren que la volatilización debería ser considerada como un mecanismo de distribución cuando se investiga el comportamiento medioambiental del NP, especialmente en estaciones cálidas. Sin embargo, la partición del NP y su transporte en la atmósfera no está claro. En la Tabla 1.2.4. se resumen las propiedades físico-químicas más relevantes de los APs.

El nonilfenol a temperatura ambiente es un líquido viscoso, amarillo pálido, inmiscible con agua, con un peso molecular aproximado de 215 a 220 g/mol y una gravedad específica de 0.953 g/mL a 20 °C. Tiene una constante de disociación (pK_a) de 10.7 ± 1.0 . NP es un compuesto hidrofóbico con un alto valor de $\log K_{ow}$ de 4.48 y por tanto baja solubilidad en agua (Priac y col., 2014), y que se asocia preferentemente con sólidos en suspensión y en la materia orgánica (John y col., 2000; Langford y col., 2002) y tiene baja movilidad, limitando su capacidad para difundirse en la fase acuosa de suelos y sedimentos (Barber y col., 1988). Su solubilidad es dependiente del pH y la temperatura, mostrando valores de 6,350 $\mu\text{g/L}$ a pH 5 y 25

°C (Ahel y col., 1993). Priac y col., refirió que las solubilidades de OP₁EO y OP₂OE son significativamente mayores que aquellas de NP₁EO, NP₂EO y NP (Priac y col., 2014), indicando la influencia predominante de la longitud de la cadena hidrofóbica en la solubilidad de APnEO. La presión de vapor y la constante de la ley de Henry del NP son 2.07×10^{-2} Pa y 8.39×10^{-1} Pa m³/mol respectivamente, sugiriendo que es un compuesto orgánico semi-volátil capaz del intercambio agua/aire (Ney, 1990).

Bisfenol A: Las propiedades físico-químicas del BPA (detalladas en la Tabla 1.2.5.) son, en general, comparables a las de los APs, si bien la presencia de dos grupos –OH marca la diferencia en alguna de ellas. Por ejemplo, su solubilidad es uno a dos órdenes de magnitud mayor que la de los APs. Los valores de log K_{ow} y log K_{oc} del BPA son menores lo que justifica su menor presencia en suelos y sedimentos, así como su menor bioacumulación en organismos.

BPA es un sólido cristalino a temperatura ambiente, blanco, presentado un punto de fusión entre los 150 y los 157° C y un punto de ebullición de 220°C. El BPA es un fenol moderadamente hidrofóbico con un log K_{ow} = 3.32, que muestra su buena solubilidad en grasas y baja solubilidad en agua (120 mg/L) (alrededor de 200 mg/dm³ at 25 °C). En la bibliografía se han descrito diferentes valores de solubilidad para el BPA, habiéndose publicado valores comprendidos entre los 120-300 mg/L (Howard 1989; US-EPA, 1994; Bayer, 1993 y 2006), que indican que el BPA podría permanecer disuelto durante largo periodos. Un trabajo publicado por la USEPA afirma que el BPA presenta una mayor solubilidad a pH básicos como consecuencia directa de sus constantes de disociación o pKa (9.6-10.2) (US-EPA, 1994).

Los log K_{ow} se encuentran entre 2.20 y 3.40 en la bibliografía, indicando su lipofilidad y tendencia a enlazar en fases sólidas en el medioambiente acuático (Staples y col., 1998). Esta afirmación se halla en concordancia con los valores de las constantes de adsorción calculados por Howard y colaboradores para suelos y sedimentos (Howard 1989). Tanto los valores de K_{ow} como los de K_{oc} para suelos y sedimentos indican una ligera tendencia a asociarse con los sedimentos y el material particulado. Los valores de las presiones de vapor (con constante de Henry tres órdenes de magnitud inferior a la de los APs) (Salgueiro González y col., 2015) indican que el BPA es un compuesto poco volátil en el medioambiente (Howard 1989), dado que normalmente se considera que aquellos compuestos con valores de constante de Henry inferiores a $1.0 \cdot 10^{-7}$ atm · m³ / mol son poco volátiles.

Ftalatos: Los ftalatos son líquidos a temperatura ambiente sin olor y tienen un punto de ebullición bajo (-25°C) (Staples y col. 1997). Debido a su alto punto de ebullición (230-486 °C), los ftalatos son utilizados como fluidos de transferencia de calor y portadores de fluidos en industrias (Gani y col., 2017).

Tienen baja solubilidad (Fromme y col., 2002) y cuando son liberados en el medioambiente, tienen tendencia a adsorber fuertemente en las partículas en suspensión y los sedimentos (Harris y col., 2007). Como consecuencia, DEHP y DEP constituyen los ftalatos más ubicuos detectados en aguas residuales, lo cual correlaciona con su amplio uso (Gray y col., 1999). La longitud de la cadena influye ampliamente el comportamiento y destino de los ftalatos (PAEs) en el medioambiente. Así, la tasa de degradación parece disminuir con el incremento de la longitud de la cadena alquílica por el correspondiente incremento en el log K_{ow}, indicando mayor lipofilidad y menor solubilidad (Fromme y col., 2002). El coeficiente de

distribución (K_d) para ftalatos varía de compuesto a compuesto, y es mayor para los ftalatos de mayor peso molecular. Staples y col., ha citado los valores de K_d de 55–360 y 69–1726 L/kg para DEP y DBP, respectivamente (Staples y col. 1997). Para BBP y DEHP, se han descrito los valores de K_d de 68–350 y 87,420–51 × 10⁴ L/kg (suelo/sedimento), respectivamente (Fauser y col. 2003; EU RA DEHP 2008).

DEHP, el ftalato más utilizado y detectado en el medioambiente, tiene baja solubilidad en agua y es un compuesto lipofílico con un log K_{ow} alrededor de 7.5 (EC 2008) y baja volatilidad (Sharma, y col., 2016).

Tabla 1.2.5. Propiedades físico-químicas de los ftalatos estudiados en esta tesis

Compuesto	Solubilidad agua a 25 °C (mg/L)	Log K_{ow}	Punto ebullición (°C)	Log K_{oc} (mL/g)	P de vapor a 25 °C (mm Hg)	Cte de Henry K_H a 25 °C (atm m ³ /mol)
DEHP	1,7	7.6	3.9 E-5	124	2.21-2.75	4.37 E-5
DEP	1,7	2.42	2.94 E-6	115	1.51-2.26	6.10 E -7
DMP	2	1.64	0.15 E-3	306	3.02 -3.74	1.07 E -7
DBP		4.11	2.9 E-3	120	3.09-2.8	1.80 E-6

Datos tomados de ^a(Magdouli y col., 2013), ^b(Gani y col., 2017),

Plaguicidas: cada familia de plaguicidas presenta unas propiedades físico-químicas propias. Así, los plaguicidas pertenecientes a diversas familias tienen un amplio rango de valores, de prácticamente insolubles a solubilidad de 734 mg/L (25°C), log K_{ow} entre 0.5 y 5.84, K_{oc} entre 20 y 1000 cm³/g, etc.

Tabla 1.2.6. Propiedades físico-químicas de algunos plaguicidas estudiados (Barceló, D.; Hennion, M.C.;1993d).

Compuesto	Usos	pKa	Solubilidad a 20-25 °C (mg/L)	P de vapor a 20-25 °C (Pa)	Cte de Henry K_H (Pa m ³ mol ⁻¹)	K_{oc} (mL/g)	log K_{ow}	Vida media $t_{1/2}$ (días)	Índice GUS
<i>Triazinas</i>									
Atrazina	H	1,7	33	3.9 E-5	2.9 E-4	124	2.21-2.75	50	3.24 PL
Simazina	H	1,7	6,2	2.94 E-6	3.4 E-4	115	1.51-2.26	60	3.43 PL
Terbutilazina	H	2	8,5	0.15 E-3		306	3.02 -3.74	1145	3.11 PL
<i>Cloroacetanilida</i>									
Alaclor	H		242	2.9 E-3	6.2 E-3	120	3.09-2.8	18	2.4 TL
Metolaclor	H		488	4.2 E-3	9 E-4	175	2.9-3.28		3.52 PL
<i>Anilida</i>									
Propanil	H		130	2.6 E-5	3.6 E-3	149	2,8	1	
<i>Clorofenoles</i>									
Pentaclorofenol	I /F /H	4,71	80 (30°C)	16 (100°C)	4.4 E-2		3.6 -5.0		
<i>Diversos</i>									
Irgarol	H		7			1000		100	Irgarol

H: herbicida, I: insecticida, F: funguicida

1.2.3. TOXICIDAD Y ESTROGENICIDAD DE LOS EDCs

Hormonas esteroideas: Los principales efectos descritos son alteraciones en el sistema reproductor masculino y femenino. También se han descrito alteraciones en el sistema neuroendocrino, produciendo modificaciones en los niveles hormonales y en la producción hormonal de la tiroides. La concentración prevista sin efectos (*the predicted no effect concentration*) (PNEC) es 1 ng/L para E2 y 3–5 ng/L para E1 (Rodgers-Gray y col., 2000; Thorpe y col., 2003), mientras que la concentración más baja a la cual se observa efecto (*the lowest observable effect concentration*) (LOEC) afectando la producción de vitellogenina en la trucha juvenil *rainbow* ha sido publicada con valores de 14 ng/L para E2 y 3.3 ng/L para E1. Purdom y col. (Purdom y col., 1998) mostraron que menos que 1 ng/L de EE2 puede estimular al macho de trucha arco iris (*rainbow trout*) a producir vitellogenina, mientras Lange y col. (Lange y col., 2001) encontraron que una concentración de 4 ng/L de EE2 puede causar fallo en el macho del *fathead minnow* para desarrollar características sexuales secundarias normales. Kiyooki y col. (Kiyooki y col., 2009) refieren la producción de vitellogenina en machos Japoneses medaka a LOECs de 32 ng/L para E1 y 5.0 ng/L para E2. Otros estudios afirman que la exposición a niveles de estrógenos tan bajos como 1 ng/L puede causar el desarrollo de características intersexuales en cucarachas y peces (Colborn y col., 1993; Desbrow y col., 1998; Jobling y col., 1998; Tyler y col.a, 1998; Tyler y col.b, 1998; Harries y col., 1999).

Cambios en la reproducción de los peces que sean medibles pueden resultar en concentraciones de E2 y EE2 tan bajas como ng/L (Hansen y col., 1998; Routledge y col., 1998; Panter y col., 1998; Lister y col., 2001; Metcalfe y col., 2002). En un estudio realizado durante 3 años en un lago canadiense, se observó como estrógenos a una concentración de 5–6 ng/L feminizaron a los peces macho y terminaron con la población de peces entera (Pelley y col., 2003). Pájaros, reptiles y mamíferos también pueden experimentar alteraciones en el sistema endocrino-reproductivo en áreas contaminadas (Preziosi y col., 1998).

BPA, APs y ftalatos son no persistentes y no bioacumulan en organismos, pero son constantemente ingeridos a lo largo de la vida, y pueden producir efectos durante un largo tiempo después de su ingestión. Así que varios autores consideran estos compuestos como pseudo-persistent.

Compuestos alquilfenólicos: Los APs son disruptores endocrinos estrogénicos que afectan al sistema reproductor de los seres vivos, actuando sobre las hormonas naturales. En el caso del NP, el mecanismo de actuación se basa en la suplantación de la hormona 17- β -estradiol, uniéndose a los receptores hER α y hER β (Benijts y cols., 2004). Aunque el mecanismo de actuación del 4-tOP debería ser similar al del NP, todavía no se ha demostrado experimentalmente. Dodds y Lawson demostraron en 1936 el carácter estrogénico de los APs tras realizar diferentes experimentos, al observar alteraciones en el sistema reproductor de ratones (Dodds y cols., 1938). Posteriormente, estas hipótesis fueron confirmadas por Mueller y Kim, que obtuvieron los mismos resultados para otros compuestos de esta familia, lo que puso en evidencia que los isómeros para- eran los que exhibían estas propiedades (Mueller y col., 1978).

Los APs se consideran estrogénicos siempre y cuando la cadena alquílica contenga al menos cuatro átomos de carbono en posición para- con respecto al grupo hidroxilo, incrementándose la toxicidad a medida que aumenta el número de carbonos (Olea y col., 2001). Por tanto, el NP es más tóxico que el 4-

tOP, lo que se demuestra con los valores de toxicidad para determinadas especies en agua dulce (mg/L) mostrados en la Tabla 1.2.7., del dossier del Reglamento REACH (European-Commission, 2005a, b, Salgueiro-González Tesis 2015). Diversos estudios han demostrado su toxicidad para ambos tipos de especies, marinas y de agua dulce (Comber y col., 1993), así como inducir respuestas estrogénicas en peces (Jobling y Sumpter, 1993; Purdom y col., 1994).

Tabla 1.2.7. Valores de toxicidad (mg/L) de 4-t-OP, NP y BPA para distintas especies del medio acuático (European-Commission, 2005)

Especie	Grupo taxonómico	Duración	Índice	Compuesto	Valor (mg/L)
<i>Pimephales promelas</i>	Peces	96 h	LC ₅₀	NP	0,135
				4-t-OP	0,250
				BPA	4,60
<i>Daphnia magna</i>	Crustáceos	48 h	LC ₅₀	NP	0,190
				4-t-OP	0,270
				BPA	3,15
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Algas	96 h	EC ₅₀	NP	0,410
				4-t-OP	1,90
				BPA	2,73

LC₅₀ (concentración letal), concentración de contaminante que provoca la muerte al 50% de la población bajo estudio

EC₅₀ (concentración efectiva), concentración de contaminante que provoca efectos negativos en el 50% de la población bajo estudio

La principal vía de exposición en humanos es la ingestión de agua y/o alimentos que contengan estos compuestos, debido principalmente a su migración desde los envases de plástico (Olea y col., 2001). En el caso de personas que trabajan con estas sustancias, la exposición vía inhalatoria y vía dérmica también son relevantes. En la tabla 1.2.8. se observa que las concentraciones a las que se producen daños en las especies son de 10 a 20 veces mayores a las obtenidas en el caso de los APs, lo cual indica que la toxicidad en el medio acuático es menor para BPA que para los APs.

Tabla 1.2.8.- Ejemplos de toxicidad de diferentes metabolitos de APEO en diversas especies (c Soares y col., 2008).

Compuesto	Especies	end point	Concentración	Referencia
NP	bacteria (Azobacter sp.)	Densidad óptica después de 72h	18.8 - 112.8 mg/kg	Martensson y col., 1996
OP	bovine oocytes	24 h	0.0001 - 1 µg/mL	Pocar y col. 2003
NP	Invertebrado (Folsomia)	EC ₅₀ , 21 días	5 - 133 mg/kg	Scott-Forsmand y col.,2004, Sorenseny col.,
	Invertebrado (Folsomia candid)	EC ₅₀ , 21 días	5 - 133 mg/kg	Scott-Forsmand y col.,2004, Sorensen y col.,
NPEs	Fish (Promelas, Pimephales)	LC ₅₀ , 96h	190 mg/L	TenEyck y col., 2007
NPEs	Crustaceans (Arcatia tonsa)	LC ₅₀ , 48h	359 mg/L	Gonzalez y col., 2012,
				TenEyck y col., 2007
NP ₁₀ EO	<i>Vibrio fischeri</i>	Porcentaje inhibición bioluminisc		Karci y col., 2013
NP	<i>Cyclotella caspia</i>	EC ₅₀ , 96h	0.18 mg/L	Liu y col.,2013
OP	zebrafish embryos	LD ₅₀ , 3 días	1.0 µM	Saputra y col., 2015
NP	<i>Gracilaria lemaneiformis</i>	aumento porcentaje de cola DNA	0.2 - 1.0 mg/L	Zhong y col., 2017b

Por otra parte, los valores de toxicidad media de los APEs varían entre concentraciones de 0,1 y 20 mg/L dependiendo de la estructura molecular del compuesto. Estos valores son de hasta tres órdenes de magnitud mayores que los de los correspondientes productos de degradación, lo que demuestra su menor toxicidad. Por ejemplo, el NPE presenta un índice LC₅₀ (48 h) de 1,5 mg/L para la pulga de agua *Daphnia magna*, mientras que el del NP es de 0,19 mg/L (Warhust, 1995). En la tabla 1.2.9. se muestran algunos ejemplos de toxicidad de varios compuestos alquilfenólicos.

El potencial estrogénico de NP en mamíferos fue descubierto accidentalmente por Soto y col., (Soto y col., 1991) y confirmado mediante diversos ensayos *in vitro* (Expresión génica (White, 1994; de Weert y col., 2008; ter Veld y col., 2008)), *E*-screen (Soto y col., 1995; Preuss y col., 2006), Yeast screen (Routledge y Sumpter, 1996; Kim y col., 2004; Saito y col., 2007) y en estudios con bioensayos *in vivo* con ratas (Sharpe y col., 1993; Lee, 1998; Nagao y col., 2000; Laws, 2000), zebrafish (Saputra y col., 2015), *rainbow trout* (Jobling y col., 1996), y medaka Japoneses (Gray y col., 1997). Además de NP, también ha sido descrita actividad estrogénica en peces para OP, NP₂EO, NP₁EC y NP₂EC (White, 1994; Routledge y Sumpter, 1996; Jobling y col., 1996; Tanghe y col., 1999; Sumpter y Jobling, 1995; Wolff y col., 2015). Los estrógenos tienen el potencial de enlazar con los receptores de progestógenos y estrógenos (ER), con subtipos ER α or ER β (Sato y col., 2002; Amaro y col., 2014). En la tabla 1.2.9. se observan diferentes valores de potencia relativa del NP respecto al E2 determinado con diversos ensayos *in vivo* y *in vitro*.

Tabla 1.2.9. Potencia relativa del nonilfenol al 17 β -estradiol en bioensayos *in vitro* y *in vivo* (Soares y col., 2008)

Sistema/especies	Potencia relativa	Referencia
Levadura Recombinante <i>in vitro</i>	0.0001	Routledge y Sumpter 1996
Levadura Recombinante <i>in vitro</i>	0.0002	Gaido y col., 1997
Levadura Recombinante <i>in vitro</i>	0.00089	Metcalfe y col., 2001
Levadura Recombinante <i>in vitro</i>	0.0000072	Folmar y col., 2002
Hepatocitos trucha primaria <i>in vitro</i>	0.000009	Jobling y Sumpter 1993
Linea celular MCF-7 <i>in vitro</i>	0.001–0.0001	Villalobos y col., 1995
Linea celular MCF-7 <i>in vitro</i>	0.0001	Blom y col., 1998
Media <i>in vitro</i>	0.0003	
Peso uterino <i>in vivo</i>	0.001	Lee y col., 1996
<i>Sheepshead minnow</i> <i>In vivo</i>	0.019	Hemmer y col., 2001
<i>Medaka</i> <i>in vivo</i>	0.050	Tabata col., 2001
Media <i>in vivo</i>	0.023	

Teniendo en cuenta que nonilfenol es un disruptor endocrino complejo que consiste en muchos isómeros, con diversos potenciales estrogénicos (Gabriel y col., 2008; Kim y col., 2004; Kim y col., 2005; Uchiyama y col., 2008; Preuss y col., 2006), es importante cuantificar e identificar los isómeros individuales.

Bisfenol A: El bisfenol A es un disruptor endocrino estrogénico que actúa sobre los receptores del 17- β -estradiol (hER α y hER β), sustituyendo a la hormona natural (Vandenberg y col., 2007), de igual forma a los alquilfenoles (Olea y col., 2001). La capacidad del BPA para mimetizar las hormonas femeninas fue también mostrada por Dods y Lawson mediante experimentos con ratones (Olea y col., 2001). Inicialmente fue calificado como un estrógeno medioambiental débil. Sin embargo, posteriores investigaciones han mostrado que el BPA ejerce efectos multidireccionales en funciones fisiológicas incluso a concentraciones muy bajas (pico y nanomolar).

BPA muestra toxicidad aguda moderada a los vertebrados, con dosis de LD₅₀ de 3250, 841 y 35.26 mg/kg mc en rata *via* oral, intraperitoneal e intravenosa respectivamente (Sigma-Aldrich, 2004; Michalowitz y col., 2015). BPA se considera tóxico para el medio acuático a concentraciones del orden de 1-10 mg/L (Kang y cols., 2005). En la Tabla 1.2.7. se muestran algunos valores de toxicidad asociados a este compuesto para distintas especies en agua dulce (EC., 2005).

Las alteraciones endocrinas sufridas en seres humanos a causa de BPA son más conocidas. El organismo humano (mamíferos) es más sensible a los efectos tóxicos que los roedores (Michalowicz y col., 2015). La principal vía de exposición es la ingestión de alimentos o agua que contienen BPA, principalmente a través de los alimentos envasados. Existen numerosos estudios que demuestran la presencia de BPA en estas matrices, debido posiblemente a su migración desde las paredes de los recipientes de plástico que los contienen (PerezPalacios y col., 2012). La autorización y utilización de BPA en la industria alimentaria se encuentra regulado a través del Reglamento 10/2011 del 14 de enero de 2011, en la que se establece que el límite de migración del envase al alimento es de un máximo de 0,6 mg/kg de alimento/día, mientras que la ingesta diaria tolerable establecida es de 4 µg/kg pc/ día. Un claro ejemplo de esta problemática es la surgida con los biberones en el año 2010. El Reglamento-321/2011 prohibió BPA en su composición, porque se demostró que bebés que habían sido expuestos a BPA durante la lactancia en biberones, presentaban valores bastante superiores de BPA y alteraciones en el sistema hormonal. Sin embargo, la EFSA comunicó en enero de 2015 que este EDC no supone riesgo para la salud pública (ni para aquellas personas más sensibles o vulnerables) (EFSA, 2015).

Los efectos producidos por el BPA se relacionan con cáncer, alteraciones en el desarrollo y a nivel neuronal, daño en el material genético por la producción de especies reactivas de oxígeno, enfermedades metabólicas y cardiovasculares, así como con alteraciones en el sistema reproductor, relacionadas la mayoría, con la afectación de la fertilidad. Los efectos del BPA al sistema metabólico es uno de los campos más estudiados. Diversos estudios sugieren que la exposición a BPA altera el metabolismo o parámetros metabólicos de importante regulación, provocando enfermedades metabólicas, como pueden ser la obesidad, diabetes o el síndrome metabólico.

Ftalatos: Los ftalatos pueden bioacumular en invertebrados, peces y plantas, pero no biomagnifican, ya que los animales superiores metabolizan y excretan eficientemente estos compuestos. PAEs y BPA son rápidamente metabolizados y excretados en orina, con vidas medias de eliminación inferiores a 24 horas (Sharma, VP., 2016).

En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios de toxicidad *in vitro* e *in vivo* para estudiar las implicaciones mutagénicas, en el desarrollo, reproductivas y neuroconductuales. Se ha referido que los ftalatos y sus metabolitos son potencialmente nocivos para el ser humano y la fauna silvestre debido a sus características hepatotóxicas y carcinogénicas (Matsumoto y col., 2008) y a sus efectos teratogénicos en la reproducción, incluyendo problemas de fertilidad y el nacimiento de bebés prematuros (Howdeshel y col., 2008). En seres humanos hay pocos datos y a menudo contradictorios. DEHP ha sido responsable de la disrupción del desarrollo reproductor de varones y alteración de parámetros endocrinos en niños a través de la lactancia (Main y col., 2006).

Los PAEs son tóxicos para varias especies incluyendo algas, protozoos, moluscos, crustáceos, peces en invertebrados (Staples y col. 1997; Chen y col., 2014). El efecto tóxico de DEHP en el sistema reproductor en ratas ha sido revisado por diversos autores (Gray y col., 2000; Liu y col., 2005; Zhang y col., 2006). DEHP ha sido descrito como el ftalato de mayor toxicidad en roedores, en este orden: DEHP > DBP > BBP (Foster y col., 2005).

1.2.5. PRESENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS EDCs EN EL MEDIOAMBIENTE

El comportamiento, partición y transporte, y el destino final de los disruptores endocrinos en diferentes compartimentos del medio ambiente (agua superficial, sedimentos, agua subterránea, suelo y aire) está controlado predominantemente por sus propiedades físico-químicas una vez liberados en el medio ambiente. Algunos EDCs son transportados largas distancias a medioambientes remotos, vía el aire o corrientes de agua. Las vías atmosféricas son particularmente importantes para EDCs semi-volátiles altamente persistentes, como PCBs, DDTs, PentaBDEs, pesticidas de uso actual (ej: endosulfán), así como precursores de PFOS y PFCA (WHO, 2012). Otros compuestos tienen una vida media más corta.

En la Figura 1.2.1. se muestra un completo esquema del comportamiento de los EDCs en el medioambiente y como interactúan con biota, publicado en el último informe de la OMS sobre compuestos disruptores endocrinos (WHO, 2012):

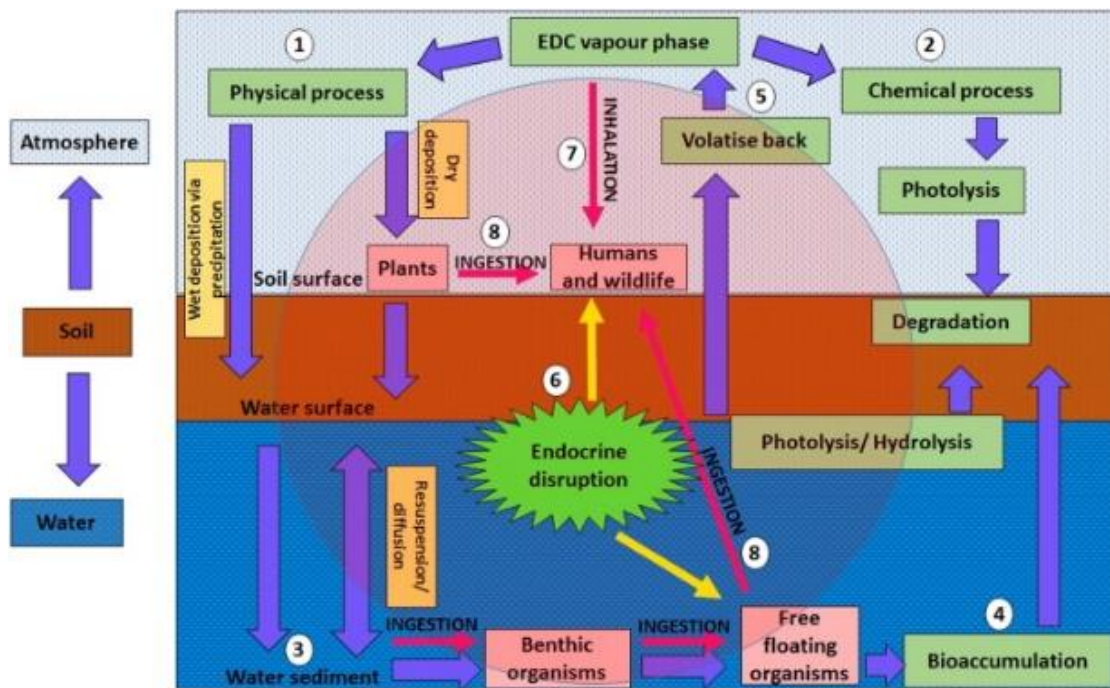


Figura.1.2.1. Comportamiento de los EDCs en el medioambiente e interacción con biota (WHO, 2012).

Desde la atmósfera, los EDCs en fase vapor son transferidos a la superficie del suelo mediante procesos físicos o químicos. (1) Los procesos físicos implican deposición seca y húmeda, mientras que (2) los procesos químicos implican fotólisis, tal y como puede verse en la Figura 1.2.1. Ambos procesos pueden derivar en degradación o transferencia de los EDCs al medio acuático (3), donde sucede resuspensión o difusión. Ciertos EDCs son adsorbidos en los sedimentos. Los EDCs persistentes se bioacumulan en organismos acuáticos (4) y ciertos EDCs son volatilizados de nuevo hacia la atmósfera (5). En este ciclo, la exposición humana y de la fauna a los disruptores endocrinos sucede especialmente vía inhalación (6) de los EDCs de la atmósfera y consumo (7) de los EDCs depositados en los productores primarios (8) (WHO, 2012).

En el caso particular de los plaguicidas (solamente algunos de ellos son EDCs), su comportamiento en el medio ambiente y su transporte desde la fuente de emisión hasta los puntos donde existe exposición para el ser humano o biota es complejo. Los plaguicidas liberados pueden moverse hacia distintos medios de acuerdo a las condiciones climáticas, características físicas y químicas del plaguicida y de los receptores ambientales. Su persistencia quedará determinada, tanto por sus propiedades intrínsecas, como por factores ambientales y de las propiedades del compartimento ambiental en el cual está depositado.

El objetivo del análisis de la distribución y el destino de una sustancia es identificar donde terminará una vez entre en el medioambiente y cuánto tiempo residirá allí. Implica examinar como una sustancia se reparte en varios compartimentos medioambientales de acuerdo a sus propiedades físicas y químicas (p.ej., volatilidad, solubilidad en agua, potencial de adsorción), así como de qué forma es emitida en el medioambiente (p.ej., vía agua o aire), para determinar que compartimentos medioambientales deberían ser incluidos en una evaluación ecológica o caracterización química (p.ej., aire, agua, suelo, sedimento) y proporciona información para determinar que organismos estarán en contacto con la sustancia y cuánto tiempo estarán expuestos a ella.

Los EDCs se liberan al agua, suelos y la atmósfera durante la producción, uso y eliminación de materiales y productos, durante la producción y procesamiento de comida y a través de procesos naturales (WHO, 2012). Son introducidos en el medioambiente acuático principalmente por las descargas de las EDARs urbanas y tienen un amplio rango de comportamientos en el medioambiente: algunos son persistentes y tienden a acumularse en sedimentos, suelos, biota o tejidos grasos debido a su carácter hidrofóbico, mientras que otros son más solubles en agua y por tanto se encontrarán en el medio acuático. Pueden bioconcentrarse a lo largo de la cadena alimentaria, dañando la salud humana. La presencia de los EDCs en el medioambiente acuático y muestras biológicas ha sido ampliamente referenciada (Hamelin y col., 2008; Gomes y col., 2011; Zhang y col., 2011; Salgueiro-González y col., 2012; Yu y col., 2013; Smichdt y col., 2013). Se han encontrado EDCs incluso en muestras procedentes de acuíferos y de fuentes de aguas minerales, lo cual sugiere algún tipo de transporte en la fracción soluble (Petrovic y col., 2003). Dentro de las posibles hipótesis para este tipo de transporte se incluyen: (a) el transporte de los EDCs en forma coloidal, (b) la formación de metabolitos o precursores más solubles que los compuestos de origen, como por ejemplo los alquilfenoles carboxilados, (c) el incremento de la solubilidad de los compuestos debido a un elevado pH en el medio (considerando que la mayoría de los EDCs en estudio tienen un pKa en torno a 10), y (d) la formación de micelas, las cuales aumentarían la estabilidad de los EDCs en la fase disuelta (Brix y col., 2001).

Por otra parte, varias publicaciones se han centrado en el estudio de la degradación y el tiempo de residencia de los EDCs en diferentes compartimentos medioambientales. Se han estudiado la degradación del BPA, E2, E1, EE, NP y OP en diferentes tipos de suelo (Ying y col., 2005) y en agua de mar y sedimentos marinos (Campbell y col., 2006). Los trabajos concluyen que bajo condiciones aeróbicas todos los EDCs analizados, incluyendo el producto de degradación E1, fueron rápidamente degradados, mostrando tiempos de vida media ($t_{1/2}$) comprendidos entre 4 y 20 días. Sin embargo, bajo condiciones anaeróbicas (fácilmente alcanzadas en los sedimentos adyacentes a los efluentes de la EDARs o en los vertederos), se

observó poca degradación de los EDCs; el E2 mostró una ligera degradación de aproximadamente el 50% que fue biotransformado a E1, tanto en ambientes aeróbicos como anaeróbicos (Ying y col., 2005).

Las fuentes de EDCs son muy diversas e incluyen ambos tipos de emisiones: puntuales (e.g. descargas de efluentes) y difusas (e.g. escorrentía agrícola, emisiones urbanas, transporte de largo rango vía corrientes de viento y océanos) (WHO 2012). Las fuentes puntuales se hallan focalizadas en puntos localizados (o “hot spots”) de descarga, como por ejemplo los efluentes de las EDARs, o las aguas de escorrentía procedentes de vertederos o de suelos dedicados a la agricultura intensiva. De hecho, hoy en día se estima que las EDARs representan las principales fuentes de contaminación de EDCs (Kolpin y col., 2002; Legler y col., 2002; Koh y col., 2005), dado que en ellas confluyen diferentes tipos de aguas cuya procedencia puede: (1) Por un lado, las aguas domésticas son la mayor fuente de fármacos en el medioambiente (Monteiro y col., 2010; WHO 2011) y pueden aportar hormonas naturales, compuestos farmacéuticos estrogénicos como el etinilestradiol, (EE o EE2), detergentes que contengan alquilfenoles (APs), desechos plásticos que contengan ésteres de ftalatos o bisfenoles, etc. (2) Por otro lado, las aguas procedentes de actividades industriales y agrícolas pueden aportar la mayor parte de compuestos químicos catalogados como EDCs. De tal forma, los vertidos de procesos industriales que emplean por ejemplo surfactantes, plastificantes, productos agroquímicos, o pesticidas, liberan estas sustancias a los torrentes de agua que terminan por entrar en las EDARs. El principal problema atribuible a las EDARs con respecto a los EDCs es la incapacidad mostrada por la mayoría de ellas para eliminar este tipo de contaminantes, de manera que, en la mayoría de los casos, los efluentes de las plantas de tratamiento suponen una entrada continua de estos compuestos en el medio ambiente (Petrovic y col., 2003). Este fenómeno es especialmente plausible en EDARs carentes de tratamientos terciarios. Adicionalmente, los EDCs se encuentran presentes en las aguas residuales en forma del compuesto precursor (*parent*) o sus metabolitos. Transformaciones microbianas durante el tratamiento del agua residual pueden convertir compuestos metabolizados de nuevo a sus precursores, resultando en la liberación de EDCs químicamente activos, como por ejemplo el estrógeno sintético EE2, excretado por mujeres que toman píldoras anticonceptivas y que es convertido de nuevo a su forma precursora durante el tratamiento del agua residual (WHO, 2012).

Las fuentes de contaminación de EDCs no localizadas se encuentran fundamentalmente asociadas al uso del terreno para la agricultura y la ganadería. Las escorrentías de tormentas (*Storm runoff*) de campos agrícolas es una importante fuente de EDCs (pesticidas, hormonas, fármacos, etc) en el medioambiente acuático. Otros EDCs son encontrados en fangos (biosólidos) que permanecen después de su tratamiento. Las fuentes procedentes de las actividades agrícolas, la excreción de hormonas por parte de organismos vivos y el uso de fertilizantes y pesticidas, sustancias ampliamente utilizadas, contribuyen notablemente a la contaminación química difusa (Ying y col., 2002; Soares y col., 2008). Dichas fuentes incluyen a las emisiones procedentes, por ejemplo, de las granjas de ganado y de industrias lácteas o de la acuicultura (Hanselman y col., 2003), que se ha demostrado que pueden ser una fuente potencial de compuestos estrogénicos en las aguas. En el caso de la acuicultura por el desove de los peces a nivel local (Kolodziej y col., 2004) y en el caso de las granjas de ganado e industrias lácteas, debido al alto nivel de hormonas esteroideas presente en la orina y en el estiércol (Tashiro y col., 2003; Soto y col., 2004).

1.2.5.1 Compuestos Disruptores Endocrinos en aguas superficiales y medio acuático en general

La partición, el transporte y el destino final de los EDCs en el medioambiente están estrechamente ligados con las propiedades físico-químicas de los mismos. A continuación, se describe el comportamiento en el medioambiente de cada una de las familias estudiadas:

Hormonas esteroideas: El aumento en el uso y demanda de ambos, estrógenos naturales y sintéticos, como por ejemplo el amplio uso de EE2 en medicina humana y actividades agrícolas y ganaderas, ha producido un incremento de la presencia de estos compuestos en el medioambiente. Debido al crecimiento estable en la demanda, se ha detectado una distribución irregular de estos contaminantes. En particular, se ha otorgado mayor atención a las áreas "hot spot", donde se han detectado altos niveles, como por ejemplo en áreas adyacentes a granjas agrícolas y de animales (Kuster y col., 2005). Debido a los efectos estrogénicos que pueden causar a niveles de 1 -10 ng/L, han de ser determinados a niveles traza y ultra traza en diferentes tipos de matrices acuosas: aguas superficiales (Gentili y col., 2002; Liu y col., 2011), aguas residuales (Laganá y col., 2000; Nasu y col., 2000; Muller y col., 2008), e incluso en aguas subterráneas (Peterson y col., 2001). Un sondeo de 139 riachuelos de 30 estados llevado a cabo por el *United States Geological Survey* (USGS) en 1999-2000 reveló que los ríos estudiados contenían EDCs, incluyendo estrógenos, con concentraciones de E2 y E1 tan altas como 200 y 112 ng/L, respectivamente. Los valores relativamente altos de las constantes de partición ($\log K_{ow}$ y $\log K_{oc}$) sugieren que la fracción sólida (biota, sedimentos y material particulado) puede actuar como un sumidero para estos compuestos, especialmente para los esteroides sintéticos como EE2, con los valores de K_{ow} mayores y por tanto mayor tendencia a ser adsorbidos en sedimentos (Kuster y col., 2004), reduciendo así la concentración en la fase acuosa e incrementando la biodisponibilidad. También se ha demostrado la bioacumulación de estas sustancias en varios artículos (Ahel y col., 1993). Estas sustancias presentan tiempos de vida medio ($t_{1/2}$) relativamente cortos en ambiente aeróbico (entre 4 y 20 días), tanto en aguas como en sedimentos (Ying y col., 2003; Ying y col., 2005), pero una degradación casi nula bajo condiciones de anoxia, lo cual aumenta sus tiempos de residencia en el medio.

Numerosos artículos coinciden en calificar a las EDARs como las principales fuentes de emisión de estos contaminantes al medioambiente (Khanal y col., 2006; Lara-Martín y col., 2008). También se han descrito otro tipo de vertidos de menor relevancia medioambiental asociados a residuos ganaderos, de acuicultura y a otros vertidos incontrolados (Ying y col., 2002; Khanal y col., 2006; Magdouli y col., 2013).

Un número relativamente amplio de estudios incluyen la determinación de estrógenos en diversas matrices en el medioambiente. La tabla 1.2.10. resume los niveles de concentración de los principales estrógenos (E1, E2, EE2, E3) en aguas, sedimentos y biota citados en estudios en diversos países alrededor del mundo. Se observa que los niveles de estas sustancias varían desde las unidades a las decenas de ng/L en muestras líquidas, y desde las unidades ng/g de hasta centenas de $\mu\text{g/g}$ en muestras sólidas.

Tabla 1.2.10. Concentraciones de los estrógenos E1, E2, E3 y EE2 en agua, sedimentos y biota

Matriz / muestra País	Concentraciones compuestos estrogénicos (ng/L)				Referencias
	E1	E2	E3	EE2	
Agua (ng/L)					
Río Elba y afluentes, R. Checa y Alemania	0.20	0.20	n.a	0.20	Stachel y col., (2003)
Agua superficial, España	0.33-22				Rodríguez-Mozaz y col., 2004
Agua superficial, Holanda	0.30–7.20	0.80–1.00	n.a	0.30–0.40	Vethaak y col. (2005)
Río Lambro, Italy	0.05	0.00	0.05	0.00	Viganò y col. (2006)
Estuario río Acushet, USA	0.73–1.20	0.56–0.83	n.a	3.01–4.67	Zuo y col. (2006)
Laguna Venice	1.20–10.00	1.00–175.00	n.a	0.80–34.00	Pojana et al. (2007)
Agua superficial, España	nd-11.6				Kuster y col., 2008
Agua superficial (Hamadam), Irán	9.00–2.00	10.00–3.00	n.a	2.00- 0.01	Jafari y col. (2009)
South East Queensland, Australia	0.55–20.91	0.39–3.77	n.a	0.00–0.52	Ying y col. (2009)
Sur Florida, USA	0.88–5.20	n.d–1.80	n.a	n.a	Singh y col. (2010)
Agua superficial, Brazil	n.d–39.00	n.d–7.30	n.d -2.30	n.d–25.00	Sodré y col. (2010)
Buyukcekme, Estambul, Turkía	1.40–5.74	1.10–5.39	2.15–5.20	11.70–14.00	Aydin y col. (2013)
Agua superficial, España	nd-5.34				Gorga y col, 2015
Bahía del mar Adriatico					
Río Würm, Alemania	0.30–2.00	0.30–0.70	n.a	0.30–0.70	Bögi y col. (2003)
Río Dan-Shui, Taipei, Taiwán	22.40–66.20	1.40–33.90	12.40– 73.6	7.53–27.40	Chen y col. (2007)
Guangzhou, Sur de China	n.d–50.00	n.d–2.00	n.d–1.00	n.d	Peng y col. (2008)
Área Tiajin, Norte de China	0.64–55.30	n.d–21.20	n.d–46.40	n.d–24.40	Lei y col. (2009)
Bahía Jiaozhou Bay, Qingdao, China	14.00–180.00	n.d -134.00	4.00–94.00	7.00–24.00	Zhou y col. (2011)
Laguna Yundang, China	n.d–5.34	n.d–1.56	n.a	n.d–0.43	Zhang y col. (2011a)
Río Yellow, China	n.d–15.60	n.d–2.30	n.a	n.a	Wang y col. (2012)
Lago Dianchi, China	n.d	1.90 ± 0.30	n.d	n.d	Liu y col. (2012b)
Sedimentos (ng/g peso seco)					
Río Ouse, UK	0.40–3.30	0.03–1.20	n.a	n.d (0.04)	Labadie y col. (2007)
Río Europeo	0.50	1.00	0.05	0.10	Schmitt y col. (2010)
Norte de Francia	0.30–1.28	0.18–1.58	n.d–1.26	n.d	Kinani y col. (2010)
Laguna Venice	2.00–41.00				Pojana y col. (2007)
Itacorubi mangrove, Brazil	0.71–50.75	0.87–40.96	n.a	133.64	Froehner y col. (2012)
Malabar, Sydney, Australia	0.16–1.17	0.22–2.48	n.a	0.05–0.50	Braga y col. (2005)
Bahía Tokyo, Japan	0.08–3.60	n.d–0.59	n.a	n.d–0.34	Isoe y col. (2006)
Área Tianjin, Northern China	0.98–21.60	n.d–9.70	n.d–7.29	n.d–9.26	Lei y col. (2009)
Delta río Pearl Delta, China	1.30–10.90	0.90–2.60	n.a	n.d	Gong y col. (2011)
Bahía Xiamen, China	n.d–7.38	n.d–2.35	n.a	n.d–2.18	Zhang y col. (2009)
Laguna Yundang, China	4.61–11.22	n.d–3.71	n.a	n.d–2.48	Zhang y col.(2011b)
Río Yellow, China	n.d	n.d	n.a	n.a	Wang y col. (2012)
Río Licun, China	3.00– 10.80	n.d–1.20	1.00– 7.60	n.d–5.10	Zhou y col. (2011)
Biota (ng/g peso lípidos)					
Yundang Lagoon, China					Zhang y col. (2011b)
Short-necked clam (<i>Ruditapes philippinarum</i>)	3.14	3.62	n.a	3.42	
Black seabream (<i>Acanthopagrus schlegel</i>)	2.21	3.44	n.a	3.03	
Yellow fin seabream (<i>Sparus latus</i>)		bn.d	bn.d	n.a	2.71
Tilapia		bn.d	bn.d	n.a	bn.d
St. Clair River, Canada					
Shorthead redhorse suckers (<i>Moxostoma macrolepidotum</i>)	n.a	na.n.a	20.27–78.15		Al-Ansari y col. (2010)
	3.14	3.62	n.a	3.42	
Laguna Venice					
Mussels (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	n.a	n.a	n.a	b3.00–38.00	Pojana y col., (2007)

E1: estrona; E2: 17β estradiol; E3: estriol; EE2: 17α-etinilestradiol. n.d: no detectado; n.a: datos no disponibles.

En la tabla 1.2.10. se observa que se han detectado principalmente E1, E2 y EE2, y solo en algunos casos E3 en aguas o en sedimentos. Se han obtenido los niveles de estrógenos más altos en China (Lei y col., 2009; Zhou y col., 2011), en Taiwan (Chen y col., 2007) y en Brasil (Sodré y col., 2010), siendo inferiores en Europa, aunque Pojana y col., han detectado niveles superiores de E2 en aguas, E1 en sedimentos y EE2 en mejillones (Pojana y col., 2007).

Debido a sus propiedades hidrofóbicas, EE2 se acumula en los sedimentos de ríos, estuarios y medioambientes marinos, con concentraciones hasta 1000 veces superiores en sedimentos que en la columna de agua. El proceso de adsorción de los estrógenos en sedimentos está afectado por la materia orgánica (Lai y col., 2000). Labadie y Hill (2007) refieren que los niveles de compuestos estrogénicos en sedimentos oscilan entre 0.12–22.80 ng/g en ríos, 0.05–2.52 ng/g en estuarios y 0.05–3.6 ng/g en áreas marinas costeras. En la tabla 1.2.10. se observan valores más altos en sedimentos (Sodré y col., 2010),

Se ha detectado EE2 en diversos organismos acuáticos. Debido a su relativa alta lipofiliidad y persistencia, la mayoría de estrógenos, incluyendo EE2, pueden bioacumular y biomagnificar en organismos acuáticos (Mazotto y col., 2008). Dussault y col. (2009) investigaron la bioacumulación de EE2 en invertebrados bénticos en agua y en ensayos en sedimentos fortificados. Los resultados sugieren que el consumo de artículos de comida de invertebrados podría proporcionar una fuente adicional de exposición a sustancias estrogénicas en depredadores vertebrados (Dussault y col., 2009; Aris y col., 2014).

Compuestos alquilfenólicos: El origen de los alquilfenoles es antropogénico; es decir, no existen en la naturaleza y por tanto su presencia en el medioambiente es la consecuencia de actividades humanas (Cincinelli y col., 2003).

Los APs se liberan a las aguas superficiales por medio de dos vías principales: directamente, a través de descargas de aguas residuales industriales y domésticas, o bien a través de los efluentes de las EDARs, en las que surgen como productos de degradación de los APEs, donde no son totalmente eliminados (Schmitz-Afonso y col., 2003). En estas depuradoras, el 80% de los APEs que se eliminan se degradan por la acción microbiana, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Aunque el mecanismo de degradación es complejo, se basa en la pérdida de la cadena polietoxilada, dando lugar a compuestos más persistentes y de mayor toxicidad, como son los alquilfenoles, alquilfenoles etoxilados de cadena corta (monoetoxilados) y alquilfenoxi carboxilados (APECs) (Martínez y col., 2004). De 500.000 toneladas de APEs producidas anualmente, se estima que el 60% llega al medio acuático en una de las formas anteriormente comentadas (Ying y col., 2002). Desde las aguas superficiales, los APs pueden alcanzar los mares y océanos, o bien degradarse debido a distintas reacciones. En el caso del NP, la fotólisis es el mecanismo más común. En cuanto a los tiempos de vida media, se establecen valores de 10 a 150 días para el NP y de 35 días para el 4-tOP (European-Commission, 2005).

Por otra parte, los alquilfenoles tienden a adsorberse con facilidad a los sedimentos y suelos desde donde pueden alcanzar las aguas subterráneas por lixiviación (Ying y col., 2002). Además, su empleo en productos de uso agrícola contribuye a una mayor presencia en estos compartimentos (Liu y col., 2010). El hecho de que presenten cierto carácter lipofílico facilita su penetración en las membranas de los organismos vivos del medio acuático (Careri y col., 2003). Los factores de bioconcentración (BCF) o

bioacumulación (BAF), calculados dividiendo la concentración del compuesto en el ser vivo entre la concentración del mismo en el agua, son del orden de 10.000 en algas y de 3-1.300 en peces para el NP (Cox, 2003). El 4-tOP presenta factores similares al NP, que varían entre 600 y 6000.

La principal fuente de los APs en el medioambiente es la degradación de los APEOs (Langford y Lester, 2002), compuestos inestables en el medioambiente que contienen una cadena etoxilada con una recalcitrancia que aumenta con la disminución del número de grupos etoxilados (Shao y col., 2003; Soares, 2005), y cuya degradación da lugar a metabolitos a menudo más estables y persistentes y en algunos casos tóxicos, con mayor estrogenicidad. Varias publicaciones revisan la biodegradación de APEOs (Ahel y col., 1994; Di Corcia y col., 1998; 2000; Jonkers y col., 2001; Staples y col., 2001; Knepper y col., 2003; Petrovic y col., 2003). En la figura 1.2.2. se muestra la ruta de degradación de los APEOs en el medio ambiente.

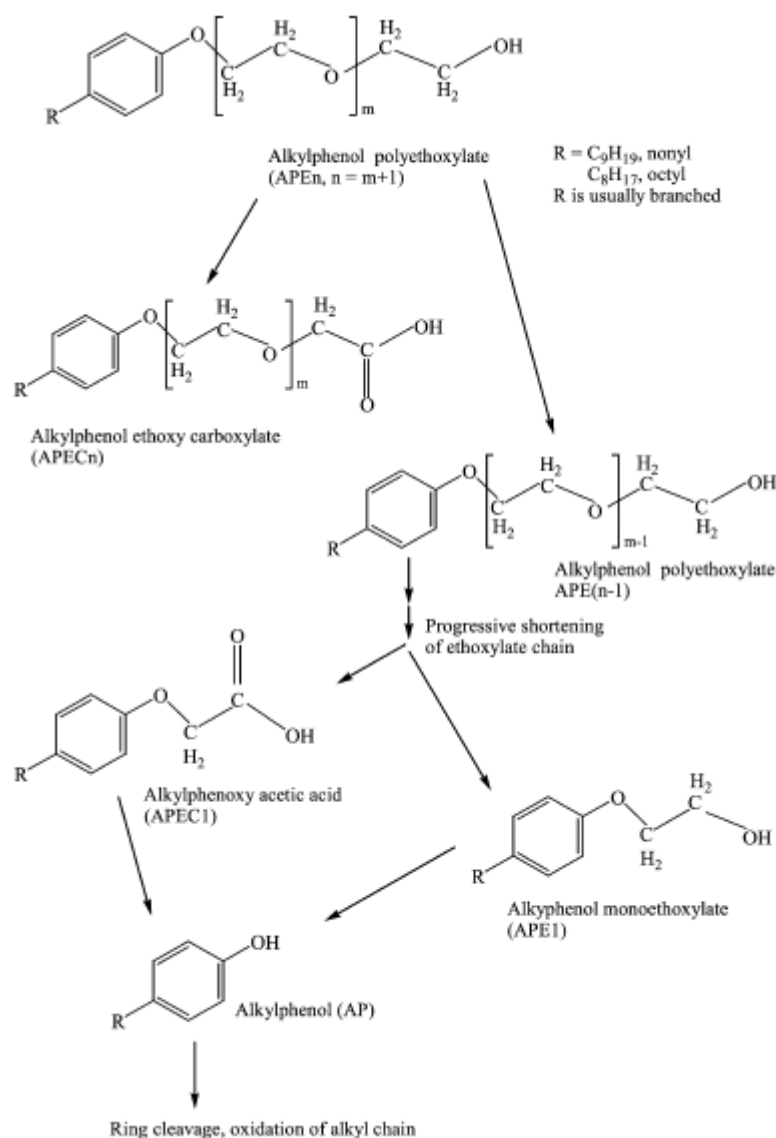


Figura 1.2.2. Ruta de degradación de los APEOs en el medioambiente y formación de los metabolitos de los APEOs (adaptado de Renner, 1997 y Acir y col., 2018)

Los productos de degradación de APE han sido ampliamente detectados en diferentes compartimentos medioambientales (aire, agua, sedimentos) (Ahel y Giger, 1985; Bennie y col., 1997; Ying et al., 2002; Berryman y col., 2004). Aunque la legislación relativa al uso de APs y sus derivados cada vez es más restrictiva (ej: Directiva 2003/53/CE), estos compuestos continúan detectándose en el medio acuático, consecuencia de su no eliminación total en las EDARs.

Los APs pueden también encontrarse en la atmósfera (Dachs y col., 1999), debido a su volatilización en EDARs y su emisión industrial directa, aunque una vez el NP alcanza la atmósfera, puede ser transportado a los ecosistemas acuático y terrestre por deposición húmeda (Fries y col., 2004). En la capa superficial de las aguas naturales, la concentración de NP puede disminuir debido a la fotólisis inducida por luz solar (Ahel y col., 1994), pero en sedimentos tiene una vida media estimada de más de 60 años (Shang y col., 1999). La biodegradación del NP puede tener lugar también a través de la acción de microorganismos, pero es limitada para el suministro de oxígeno (Topp y col., 2000; Hesselsoe y col., 2001) y biodisponibilidad (Bosma y col., 1997; Kelsey y col., 1997). Se ha visto que las áreas contaminadas de NP contienen organismos capaces de degradar NP cuando la microflora autóctona se adapta a la presencia del contaminante (Ahmed y col., 2001; Saagua y col., 2002; Soares y col., 2003).

Nonilfenol: NP es un contaminante ubicuo en el medioambiente y se ha referido su presencia alrededor del mundo a concentraciones que varían ampliamente en aguas, sedimentos, fangos, aire y suelos. Aunque está presente a bajas concentraciones, el riesgo de exposición a largo plazo a bajas concentraciones permanece en gran parte desconocido. Así, se ha detectado 4-nonilfenol y en algunos casos 4-tert-Octilfenol en diversas matrices en el medio acuático: en agua superficial (Bolz y col., 2001; Esteban y col., 2014; Gorga y col., 2015), sedimentos (Bennie y col., 1997; Bolz y col., 2001; Isobe y col., 2001; Fromme y col., 2002; Wu y col., 2013; Gorga y col., 2015), agua subterránea (Lacorte y col., 2002; Loos y col., 2010; Félix-Cañedo y col., 2013), aguas residuales (Isobe y col., 2001; Leiseweitz y col., 2003), fangos de depuradora (Bolz y col., 2001; Leiseweitz y col., 2003), agua marina (David y col., 2009), agua de lluvia (Borge y col., 2012), suelos (Gibson y col., 2010) e incluso en agua de lluvia y nieve (Bergé y col., 2012). En algunos estudios también se refiere la detección de OP y NP en biota acuática (Tsuda y col., 2000; Wenzel y col 2004). Adicionalmente, se ha detectado NP en agua potable de fuentes (Maggioni y col., 2013), en agua embotellada (Loyo-Rosales y col., 2004; Maggioni y col., 2013), en comidas (Shao y col., 2007; Lu y col., 2013), en alimentos empacados (Cacho y col., 2012) y en aire (Dachs y col., 1999; Mao y col., 2012). La Tabla 1.2.11. muestra la presencia y distribución de NP en agua superficial y sedimentos, agua residual y fangos en diversos países. Los niveles de NP generalmente varían bastante en el medioambiente acuático.

En **agua superficial**, se ha detectado NP en diversos estudios (Bennie y col., 1997; Bolz y col., 2001; Heemken y col., 2001; Stachel y col., 2003; Rice y col., 2003; Jin y col., 2004; Kolpin y col., 2004; Vethaak y col., 2005; Vousta y col., 2006; Patrolecco y col., 2006; Loos y col., 2007; Luo y col., 2014; Esteban y col., 2014; Gorga y col., 2015), a niveles desde ng/L (Cailleaud y col., 2007; Brix y col., 2010) a docenas de mg/L (Peng y col., 2008). Debido a la implementación de la Directiva Europea 2003/53/EC, las concentraciones de NP en países europeos fueron mucho más bajas que en Asia. Duong y col., estimaron la presencia y

distribución de NP en ocho países asiáticos. Los resultados obtenidos muestran que las concentraciones de NP en muestras de la mayoría de países asiáticos son superiores en comparación a las referidas en países europeos, América y Japón (Duong y col., 2006).

El **agua residual** doméstica e industrial, así como la escorrentía superficial, podrían ser posibles fuentes de NP en el medioambiente acuático. Hay una relación directa entre las concentraciones de NP y la presencia de actividades urbanas o industriales a lo largo del río, cerca del punto de muestreo. Se conoce poco sobre la eficacia de las técnicas de eliminación de APs y sus derivados en EDARs cuando se aplican a los actuales efluentes domésticos e industriales. El agua residual doméstica tratada inadecuadamente causa altas concentraciones de NP en el medioambiente acuático. Incluso un pequeño río sin un tratamiento adecuado de aguas residuales, puede causar altas descargas de NP. Sin embargo, se ha detectado la presencia de NP con la misma frecuencia en América del Norte, en Europa o Asia, y una vez ha alcanzado el medioambiente acuático, se han detectado concentraciones más altas de NP asociados a sedimentos, que disueltos en la fase acuosa. En el río Amarillo en Asia, las concentraciones también fueron superiores en las estaciones más cálidas, confirmando la relación entre la contaminación del NP y descargas de aguas residuales en el agua superficial de ríos, porque se utilizaron más detergentes, geles de baño y plásticos en verano que en invierno. Adicionalmente, las concentraciones de NP fueron mayores en periodos de menor flujo debido a un bajo factor de dilución. Sin embargo, en el estuario del río Sena, se observaron niveles máximos de NP en la fase disuelta y en el material particulado suspendido durante periodos de invierno, mientras que se observaron disminuciones significantes durante los periodos de primavera y otoño, que podrían ser atribuidos a actividades biológicas máximas durante estos periodos.

Debido a sus propiedades hidrofóbicas, el NP en agua superficial tiende a ser absorbido por partículas de **sedimentos**. Por tanto, las concentraciones de NP en sedimentos son más altas que en agua superficial, variando de unos pocos $\mu\text{g}/\text{kg}$ en peso seco (ms) hasta varios cientos mg/kg ms (Bennie y col., 1997; Bolz y col., 2001; Isobe y col., 2001; Heemken y col., 2001; Fromme y col., 2002; Stachel y col., 2003; Rice y col., 2003; Li col., 2004; Wu y col., 2013; Gorga y col., 2015), tal y como puede verse en la tabla 1.2.11. En general son más altas las concentraciones de NP en sedimentos en países en desarrollo que en países desarrollados, observando niveles más altos en China (Wu y col., 2007; Fu y col., 2007). El sedimento más contaminado fue detectado en el Río Huangpu, China en 2013, con concentraciones a $337.73 \mu\text{g}/\text{kg}$ ms (Wu y col., 2013), con niveles similares en otros ríos y lagos urbanos en Asia. Actualmente, las concentraciones de NP en sedimentos son muy altas incluso en algunas áreas europeas. Por ejemplo, en el río Danubio las concentraciones máximas de NP en sedimentos fueron $2.830 \mu\text{g}/\text{kg}$ ms).

Una investigación en los procesos de adsorción controlando la distribución de los NPEOs a los sedimentos demostró que el contenido orgánico de los sedimentos fue uno de los determinantes importantes del proceso de adsorción, especialmente para los NPEOs de cadena corta, los cuales indican la importancia de sus interacciones hidrofóbicas (John y col., 2000). También se observó adsorción libre de material orgánico en sedimentos, indicando que no solo el contenido orgánico es relevante para el NP, sino que hay múltiples interacciones a tener en cuenta. Por tanto, es evidente que la adsorción de NP está controlada por dos interacciones principales: hidrofílica con componentes minerales y hidrofóbica con la materia orgánica (John y col., 2000). Un estudio refiere la partición de NP en sedimentos con un factor de concentración alto (1.76 después de 28 días) y se encontró ser resistente a la biodegradación en sistemas

agua/sedimentos en lagos, mostrando solamente ligeras pérdidas de 9% (tras 56 días) y 4.2% (tras 28 días) (Lalah y col., 2003). Una vez los compuestos nonilfenólicos entran en los sedimentos, la vida media estimada de degradación de estos compuestos estimada ha sido superior a 60 años (Shang y col., 1999).

El **agua subterránea** es de especial interés porque representa alrededor del 20% del agua fresca suministrada en el mundo y es extraordinariamente vulnerable a la contaminación por una variedad de compuestos debido a actividades urbanas (Tubau y col., 2010). La eliminación o degradación de los contaminantes en agua subterránea es generalmente muy lenta, debido a que las características químicas y biológicas en los acuíferos no son favorables para asegurar la degradación (Langwaldt y col., 2000), permitiendo a los contaminantes dispersarse a varios km de la fuente de contaminación y existir por décadas (Barber y col., 1988). La adsorción y la biodegradación son los procesos que controlan la entrada de contaminantes en el agua subterránea. Las concentraciones detectadas en el agua subterránea generalmente son muy bajas y en algunas zonas no se ha detectado NP (Hildebrandt y col., 2007). Loos y col., (Loos y col., 2010) han analizado 164 muestras subterráneas correspondientes a 23 países europeos. NP fue detectado en el 11% de las muestras (con un LOD de 30 ng/L), con una concentración máxima de 3.8 µg/L, excediendo la concentración estándar de calidad subterránea e Europa para pesticidas de 0.1 µg/L en varias muestras. En Austria, NP fue el compuesto químico industrial más abundantes detectado en aguas subterráneas, estando presente en alrededor de la mitad de las muestras. La concentración máxima de NP fue 1.500 ng/L, y el percentil 90 fue 424 ng/L (Hohenblum y col., 2004).

Respecto al NP, su presencia en acuíferos está relacionada con actividades antropogénicas, como la descarga de efluentes de EDARs con una media de concentraciones de 0.79 µg/L (Barber y col., 1988); en las proximidades de ríos contaminados 0.1–0.8 mg/L (Ahel y col., 1996; Zoller y col., 1990); sistemas sépticos 1.2 g/L (Rudel y col., 1998), pero también puede ser debido a actividades agrícolas 0.16–0.38 µg/L (Latorre y col., 2003), lixiviados de vertederos y la descarga de agua residual industrial 0.10–0.28 µg/L (Ahel, 1991). Por tanto, la biodegradación es una etapa crítica regulando la infiltración de NP en el agua subterránea (Ahel, 1991; Ahel y col., 1996). En las zonas previas al acuífero (lechos del río, vertederos, suelos cultivados, etc), generalmente hay una abundancia de nutrientes y microorganismos los cuales constituyen una gran barrera para la entrada de contaminantes en los acuíferos.

También se ha observado que la presencia de oxígeno es un factor muy importante en la presencia del NP en los acuíferos (Montgomery- Brown y col., 2003). En condiciones anóxicas el NP no parece que se biodegrade. Este hecho es relevante, ya que a profundidades mayores a 1.5 m y en áreas inundadas, predominan condiciones anóxicas. Otro factor importante son las características hidrológicas de los sitios. Se observa una rápida infiltración en sitios con sedimentos altamente permeables. En el caso del NP, debido a su baja solubilidad, su transferencia de masa es más baja que compuestos más solubles, dando incrementos a plumas menores, (Barber y col., 1988), pero su adsorción está controlada por el contenido de carbón orgánico de los sedimentos (Zoller y col., 1990).

Las concentraciones de NP medidas en el **agua de consumo** tratada, varían de 85 ng/L en España (Petrovic y col., 2003) a 15 ng/L en Alemania (Kuch y col., 2001). Recientemente Valcárcel y col., han llevado a cabo un estudio para determinar 60 compuestos con conocida o supuesta actividad endocrina en agua de consumo de Madrid, y han detectado concentraciones diarias máximas de 0,126 µg/L de NP. Adicionalmente, los 3 ensayos *in vitro* realizados concluyen que no hay actividad estrogénica en las

muestras de agua (Valcárcel y col., 2018). Estas concentraciones significan que el agua de consumo no representa una fuente significativa de NP para los seres humanos comparado con otras como materiales de embalajes de comidas (Guenther y col., 2002), productos de limpieza y varios productos de cuidado para la piel, los cuales se estima que son fuentes de exposición más importantes, ya que las concentraciones de NP son varios órdenes de magnitud mayores que en agua de bebida (CEPA, 2000).

También se ha llevado a cabo la determinación de APs en **agua de lluvia y nieve** (Bergé y col., 2012), detectando concentraciones de NP entre 0.03 y 1.20 µg/L, sugiriendo que debe considerarse la deposición húmeda como una fuente mayor de NP en el medioambiente. En Europa, las concentraciones de NP en agua de lluvia disminuyen, lo cual implica que hay un descenso en la contaminación en el medioambiente (Berge' y col., 2012).

La presencia de NP en **suelos** no está tan bien documentada como en el medio acuático. Sin embargo, también está estrechamente relacionada con las actividades antropogénicas, como la aplicación de fangos, lixiviación de vertederos y vertidos accidentales (CCME, 2002; Vikelsoe y col., 2002). Una vez que el NP alcanza el suelo, está sujeto a varios factores que influyen su concentración como: biodegradación, adsorción y volatilización. Los estudios de biodegradación realizados principalmente a pequeña escala, sugieren que la recalcitrancia del NP está controlada principalmente por la limitación de oxígeno (Topp y col, 2000; Hesselsoe y col., 2001). La tasa de volatilización de NP en suelos no es significativo. Por tanto, la profundidad de la capa de fango, disponibilidad de oxígeno y biodisponibilidad del contaminante son de gran importancia en la degradación del NP en suelos. Al aplicar NPEOs al suelo, se observó que una porción significativa de estos compuestos fue transformada en NP, resultando en altas concentraciones en el suelo que podrían alcanzar los acuíferos (Montgomery-Brown y col., 2003). Se han identificado altas concentraciones de NP en suelos con alta adición de fango de depuradora (1.4–1.6 mg/kg) y puntos de escorrentías y vertidos (*run-off*) (34–14 µg/kg) (Vikelsoe y col., 2002; Falkenberg y col., 2003) y también se ha identificado NP en lixiviados de vertederos a concentraciones entre 10 y/o 170 µg/L (Oman y col., 1993). En la tabla 1.2.11.se observan valores de NP superiores en suelos modificados con fango (CCME 2002; Vikelse y col., 2002).

Debido a la baja volatilidad de estos compuestos son pocos los estudios relacionados con la calidad del **aire**. Sin embargo, se ha evidenciado la presencia del NP en aire (Mao y col., 2012), tanto en fase vapor como asociado al particulado atmosférico (Dachs y col., 1999; Salgueiro-González y col., 2013).

Tabla 1.2.11. Concentraciones de NP en varias matrices medioambientales alrededor del mundo. Adaptado de (Soares 2008) y (Careghini y col., 2015).

Matriz /muestra	País	Concentraciones (µg/L)	Media	Referencias
Agua superficial				
Agua Río	Suiza	0.015–2.25		Ahel y col., (1994b)
Grandes lagos y río St. Lawrence (1995)	USA y Canadá	<0.01–0.92	0.21 (24 %)	Bennie y col., 1997
Río Fraser: por encima de una EDAR	Canadá	0.0066–0.0074		Sekela y col., 1999
Río Fraser: por debajo de una EDAR	Canadá	0.032–0.13		
Aguas ríos y océano	Portugal	b10		Azevedo y col., 2001
Aguas de río y costeras	Portugal	<0.01–30	1.2 (79 %)	Azevedo y col., 2001
Bight del Mar de Norte	Alemania	0.0007–0.033		Beste y col., 2001
Río Elba y sus afluentes	Alemania	0.0008–0.221	0.059	
Mar del Norte		0.0003–0.084		Heemken y col., 2001
Agua Río	Japón	0.051–1.08		Isobe y col., 2001
Agua Río	Alemania	0.0006–0.135		Kuch y col., 2001
Agua Océano	España	.15-4.1		Petrovic y col., 2002a
Agua afluentes Río Llobregat	España	15		Petrovic y col., 2002b
Ríos Rhine, Elbe, Main, Oder, Nidda y Sch.	Alemania	<0.025–1.22	0.43	Fries y col., 2003
Estuarios Western Scheldt y Rhine	Holanda	0.031–0.934	0.17	Jonkers y col., 2003
Río Kalamazoo	USA	<2.6		Kannan y col., 2003
Río Cuyahoga	Ohio (USA)	0.1–0.5	0.24	Rice y col., 2003
Río St. Lawrence	Canadá	b0.092		Sabier y col., 2003
Agua costera superficial	Singapur	0.02–2.76	0.95	Basheer y col., 2004
Aguas estuario y marinas: islas Okinawa y Ishigaki.	Japón	<0.05–0.17	0.14 (29%)	Kawahata y col., 2004
Río	Korea	0.0232-0.1876		Li y col., 2004
Distrito Rieti	Italia	<0.1–1.6		Vitali y col., 2004
	Holanda	<0.11–4.1	0.99 (10%)	Vethaak y col., 2005
Río Tiber	Italia	0.13–0.58	0.28	Patrolecco y col., 2006
Río Glatt	Suiza	0.068–0.326		Vousta y col., 2006
Agua marina de la bahía Jiaozhou	China	0.02–0.269		Fu y col., 2007
Bahía Jiaozhou Bay y ríos afluentes	China	0.0906–28.6		
Agua de río	Bélgica	0.32–2.50	1.44	Loos y col., 2007
Agua de río	Italia	0.46–0.70	0.56	Loos y col., 2007
Laguna Venice	Italia	<0.0005–0.21		Pojana y col., 2007
Lagos Urbanos en la ciudad de Wuhan	China	1.94–32.85	11.96	Wu y col., 2007
Río Danubio	Alemania	<0.1–0.13 (18 %)		Micic y col., 2009
Agua superficial (presas), Ciudad de Méjico, col., 2013	Méjico	<0.001–0.655 (75 %)		Félix-Cañedo y
Bahía de San Francisco	USA	<0.00252–0.0729 (60 %)		Klosterhaus y col.,
				2013
Río Huangpu y sus afluentes - Jul. 2010	China	0.0202–0.1075	0.074	Wu y col., 2013
Río Huangpu y sus afluentes - Nov. 2010	China	0.0926–0.3317	0.1606	
Ríos Manzanares y Jarama	España	0.096–1.483		Esteban y col., 2014
	China	0.036–33.231		Luo y col., 2014
	Grecia	0.558–2.704		
	Korea	0.115–0.336		
Agua de mar de la reserva marina de Cape D'Aguilar				
Estación húmeda	Hong Kong	0.14–0.50	0.39	Xu y col., 2014
Estación seca	Hong Kong	0.061–0.33	0.11	
Cuenca del lago North Tai, Este	China	0.089–1.189	Mean 0.388	Zhang y col., 2014
Ríos Ebro, Llobregat, Júcar y Guadalquivir	España	<0.00013–0.391		Gorga y col., 2015
Agua subterránea				
Área agrícola en Cataluña	España	<0.01–0.35		Lacorte y col., 2002
Área agrícola en Cataluña	España	<0.036–0.9 (92 %)		Latorre y col., 2003
Água subterránea en la Ciudad de Méjico,	Méjico	<0.001–0.047 (43 %)		Félix-Cañedo y col., 2013

23 países europeos Europa <0.030–3.85 0.083 (11 %) Luo y col., 2014

Tabla 1.2.11. Concentraciones de NP en varias matrices medioambientales alrededor del mundo. Adaptado de (Careghini y col., 2015).

Matriz /muestra	País	Concentraciones (µg/kg m.s.)	Media	Referencias
Sedimentos				
Río	Suiza	3520		Ahel y col., (1994b)
Grandes Lagos	USA y Canadá	<46–37.800	3000	Bennet y col., 1997
Grandes lagos y río St. Lawrence,	USA y Canadá	170–72.000	10.600	Bennie y col., 1997
Río	USA	b1240		Hale y col., 2000
Bahía de Tokyo	Jaóan	<10–5540		Yamashita y col., 2000
Bahía en el Mar del Norte	Alemania	10–153	55	Bester y col., 2001
Mar abierto, Mar del Norte	Alemania	<10–55	34 (40 %)	Bester y col., 2001
Río	Japón	.5–13.0		Isobe y col., 2001
Río	USA	10–60.000		Kannan y col., 2001
Río Elba y algunos afluentes	Alemania	367–1378	640	Heemken y col., 2001
Puerto	España	8-1050		Petrovic y col., 2002a
Agua Río	España	22-645		Petrovic y col., 2002b
Western Scheldt y estuarios del Rin,	Holanda	<0.4–1080	19.5 (94 %)	Jonkers y col., 2003
Río Kalamazoo	USA	<5.5–15.3		Kannan y col., 2003
Río Cuyahoga	Ohio, USA	75–340	180	Rice y col., 2003
Sedimentos Río	Canadá	40.3-293		Sabik y col., 2003
Sedimentos del estuario y marinos de Okinawa y las islas Ishigaki	Japón	<5–46	30.5 (47 %)	Kawahata y col., 2004
Sedimentos Río	Korea	25.4-932		Li y col., 2004
Distrito Rieti	Italia	44–567	205	Vitali y col., 2004
Sedimentos frescos, marinos y de estuario, Holanda		<10–3800	160 (91 %)	Vethaak y col., 2005
Sedimentos marinos de la Bahía de Cadiz, España		13–225	108	Lara-Martin y col., 2006
Río Tiber	Italia	50–970	414	Patrolecco y col., 2006
Sedimentos de estuario y marinos de la Bahía Jiaozhou y ríos circundantes	China	3.6–39.700	3670	Fu y col., 2007
Sedimentos en la laguna Venice	Italia	47–192	89	Pojana y col., 2007
Lagos urbanos en la ciudad de Wuhan,	China	3540–32.430	10.490	Wu y col., 2007
Río Danubio	Alemania	<20–2830	130	Micic y col., 2009
Mayores afluentes del río Pearl	China	31–21.885	3686	Gong y col., 2011
Bahía de San Francisco	USA	21.5–86.3	34.7	Klosterhaus y col., 2013
Iron Gate y embalse en el río Danubio	Rumanía	80–470		Micić y col., 2013
Río Huangpu y sus afluentes	China	10.34–337.73		Wu y col., 2013
Sedimentos superficiales del Golfo de Gdansk, Polonia				
Sedimentos de río	Polonia	<0.08–4.93		Koniecko y col., 2014
Sedimentos de estaciones costeras	Polonia	<0.08–13.56		Koniecko y col., 2014
Sedimentos estaciones < 4m profundidad, Polonia		<0.08–249.08		Koniecko y col., 2014
Sedimentos del mar Amarillo y mar Este de China, China		349.5–1642.8		Duan y col., 2014
Sedimentos de estuario en Auckland	Nueva Zelanda	<100–32.000	153	Stewart y col., 2014
Cuenca del río Ebro	España	36-538	177	Gorga y col., 2014
Sedimentos de los ríos Ebro, Llobregat, Júcar y Guadalquivir	España	<0.24-1693		Gorga y col., 2015
Suelos				
Suelos modificados con fango	Canadá	2720		CCME (2002)
Suelos no modificados, fertilizados o fertilizados artificialmente y suelos modificados con cantidad limitada de fango	Dinamarca	0.01–0.98	0.37	Vikelsøe y col. 2002
Suelo modificado con altas cantidades de fango, Dinamarca		1450–2430	1940	Vikelsøe y col. 2002
Campos agrícolas regados con agua residual, Valle Tula, Méjico		<25–299		Gibson y col., 2010

Bisfenol A: El BPA se libera a las aguas superficiales de un modo similar al de los alquilfenoles y las mayores fuentes de BPA en el medio acuático son: las distintas actividades industriales (principalmente plantas químicas) como la fabricación de plásticos, resinas epoxi o en los procesos de despolimerización y reciclaje de papel (Staples y col., 1998) o a través de las EDAR, donde no se degrada con facilidad. Esto se debe a que se necesita alcanzar un determinado tiempo y unas condiciones adecuadas para que tenga lugar la degradación, que ocurre principalmente en condiciones aeróbicas (Poerschmann y col., 2010). Debido a la gran utilización de plásticos en la vida cotidiana, la posibilidad de encontrar el BPA en muestras acuosas ambientales es muy elevada. Aún conociendo la posible distribución del BPA, se puede afirmar que las concentraciones de esta sustancia en el medioambiente están mayormente supeditadas a los diferentes procesos de degradación que sufre este compuesto cuando se encuentra inmerso en los distintos compartimentos.

Existen varias rutas potenciales de entrada de BPA en el medioambiente. El uso de BPA como antioxidante en plásticos del tipo PVC, empleados ampliamente en envases de alimentos, tuberías y tanques de almacenamiento, también supone una fuente de entrada de este compuesto a los diferentes compartimentos, especialmente a los torrentes de agua que terminan por llegar a las EDARs (Vandenberg y col., 2007; Le y col., 2008). El uso extensivo que se hace en actividades industriales de algunos productos como las pinturas o los materiales adhesivos, o de su presencia en diversos materiales de construcción, también facilita su entrada al medio. Finalmente, también se ha demostrado la liberación de pequeñas cantidades de BPA a partir de las instalaciones de manufacturado y procesamiento, las cuales vierten esta sustancia tanto a la atmósfera como a las aguas residuales (Staples y col., 1998). Debido a sus propiedades físico-químicas el BPA tiende a depositarse en los suelos y sedimentos y a bioacumularse en los seres vivos. Los valores de BAF (Factor de bioacumulación) de este compuesto varían entre 50-1500, siendo menores que en el caso de los APs. Algunos autores consideran que estos valores indican poca capacidad acumulativa, sin embargo, sus efectos en los organismos dejan en entredicho esta premisa (Staples y col., 1998).

Varias publicaciones coinciden en que el BPA no es una sustancia persistente durante largos periodos en el medioambiente (Ike y col., 2000, USEPA 2010; Michalowicz 2014). Se ha demostrado que el BPA es fácilmente biodegradable en condiciones aeróbicas tanto en aguas residuales y sus efluentes, como en diferentes tipos de aguas superficiales, donde se estima que su tiempo de vida medio ($t_{1/2}$) se encuentra comprendido entre los 2.5 y los 4 días (Staples y col., 1998) y su potencial de bioacumulación es bajo, mientras que, bajo condiciones anaeróbicas, BPA muestra un potencial para bioacumulación y adsorción al fango o sedimentos por su carácter moderadamente lipofílico ($\log K_{ow}$ 3.32) (Spengler y col., 2003). En suelos y sedimentos puede ser fácilmente degradado bajo condiciones aeróbicas, con valores de $t_{1/2}$ en suelos estimados entre 3 y 37.5 días. A esta biodegradación se le suma la rápida descomposición que sufre el BPA debido a los procesos de fotólisis y foto-oxidación. Howard y col. sugieren que el $t_{1/2}$ de la foto-oxidación del BPA en agua puede oscilar entre 66 h y 160 d, dependiendo del tipo de agua, mientras que en la atmósfera se estiman $t_{1/2}$ entre las 0.74 y 7.4 h (Howard y col., 2007).

Por otra parte, también se ha descrito que el BPA no tiene una gran tendencia a asociarse con el tejido graso de los seres vivos, habiéndose referido factores de bioconcentración que varían entre <20 y 196 (MITI 1992; Lindholm y col., 2000; Takahashi y col., 2003), lo cual denota un bajo potencial para bioacumularse. Todos estos datos hacen pensar que el BPA debería ser una sustancia difícilmente detectable en el medioambiente, sin embargo, debido a su amplio uso, principalmente como monómero de varios plásticos, la presencia del BPA en el medioambiente es muy elevada, y por tanto son muchos los artículos que han proporcionado concentraciones de esta sustancia en diferentes tipos de muestras medioambientales. En la tabla 1.2.12. se resumen niveles de BPA detectados en varias matrices medioambientales en diversos países.

Los rangos de valores medios de BPA detectados en cada matriz ambiental en USA, citados por la USEPA son 0.012-0.14 µg/L en aguas superficiales, 0.004-1.9 µg/L en aguas subterráneas, 1.4-140 y 1.5-5.0 µg/kg m.s. en sedimentos de agua dulce y marinos respectivamente, y 4-14 µg/kg m.s. en suelos (USEPA y col., 2010a). Por ejemplo, los niveles de BPA detectados por Fromme y col., (2002) en el medio acuático son entre 0.0005-0.41 µg/L en aguas superficiales, entre 0.018-0.702 µg/L en efluentes de depuradoras y entre 0.01-0.19 mg /Kg en sedimentos (Fromme y col., 2002).

Varios estudios refieren la detección de BPA en diferentes compartimentos: agua superficial (Staples y col., 1998, 2000; Hegemann y col., 2002; Belfroid y col., 2002; Jin y col., 2004; Kolpin y col., 2004; Hollert y col., 2005), en sedimentos (Heemken y col., 2001; Bolz y col., 2001; Fromme y col., 2002; Stachel y col., 2003), en aguas residuales (Fürhacker y col., 2000; Kuch y col., 2001; Voutsas y col., 2006), en fangos (Bolz y col., 2001; Fromme y col., 2002) y en lixiviaciones de vertederos (Yamamoto y col., 2001). Además, BPA está presente en peces marinos y de agua fresca (Hegemann y col., 2001).

Las concentraciones de BPA en **aguas superficiales** varían generalmente entre ≤ 0.001 y $4 \mu\text{g/L}$ (Careghini y col., 2015), pero se han descrito 2 estudios llevados a cabo en Taiwán y el río Elba, en los que se detectó BPA a 45 y $92 \mu\text{g/L}$ respectivamente (Michałowicz y col., 2014). Luo y col., (2014) determinaron BPA en distintas localizaciones geográficas, obteniendo los valores más altos en China seguida de Korea, Alemania y Grecia con valores máximos respectivamente de 0.881 , 0.334 , 0.215 y $0.152 \mu\text{g/L}$ y los valores más bajos en Canadá y UK, con máximos de 0.087 y $0.068 \mu\text{g/L}$ respectivamente (Luo y col., 2014). Las concentraciones mayores en los diversos estudios fueron detectadas en las zonas más pobladas (Kawahata y col., 2004). En América, la USEPA refiere un rango de valores medios entre 0.012 y $0.14 \mu\text{g/L}$, mientras que en Méjico se encontraron niveles inferiores, entre < 0.0005 – 0.007 en el 52% de las muestras analizadas. En Asia, se determinaron los niveles de BPA en verano e invierno en China. pero no observaron un patrón estacional ni en el río Huangpu y sus afluentes (Wu y col., 2014) ni en aguas de una reserva marina en Hong Kong (Xu y col., 2014), obteniendo respectivamente unos valores medios de 0.0276 , 0.0645 y $0.0695 \mu\text{g/L}$. Zhang y col., encontraron niveles de BPA superiores en China, en un rango de 0.024 - $1.175 \mu\text{g/L}$ (Zhang y col., 2014).

Tabla 1.2.12. Concentraciones de BPA en varias matrices medioambientales alrededor del mundo. Adaptado de (Careghini y col., 2015).

Matriz /muestra	País	Concentraciones Media ($\mu\text{g/L}$)	Referencias
Agua superficial			
Aguas de río y costeras	Portugal	0.07–4.0	1.0 Azevedo y col., 2001
Río Elba y algunos de sus afluentes	Alemania	0.017–0.776	0.105 Heemken y col., 2001
Surface coastal water,	Singapur	<0.002–2.47	0.40 Basheer y col., 2004 Kawahata y col., 2004
Aguas de estuario y marinas de las islas Okinawa e Ishigaki	Japón	<0.005–0.08	0.02 Basheer y col., 2004
Agua fresca, marina y de estuario	Holanda	<0.009–1.0	0.045 (52 %) Vethaak y col., 2005
Río Tiber	Italia	<0.03–0.14	0.07 Patrolecco y col., 2006
Río Glatt	Suiza	0.009–0.076	Vousta y col., 2006
Agua de estuario y marina de la Bahía de Jiaozhou, China		0.0015–0.262	Fu y col., 2007
Agua de río	Bélgica	0.003–0.055	0.031 Loos y col., 2007
Agua de río	Italia	<0.002–0.175	0.065 Loos y col., 2007
Laguna Venecia	Italia	<0.001–0.145	0.014 Pojana y col., 2007
Río Han	Korea del Sur	0.0069–0.059	0.027 Yoon y col., 2010
Arroyos dominados por efluentes descargando en el río Han	Korea del Sur	0.011–0.120	0.062 Yoon y col., 2010
Rango de valores medios en USA	USA	0.012–0.14	USEPA, 2010a
Agua superficial presas en Ciudad Méjico,	Méjico	<0.0005–0.007	(52 %) Félix-Cañedo y col., 2013
Ríos Manzanares y Jarama	España	0.006–0.126	Esteban y col., 2014
	Canadá	Máximo 0.087	0.0021 Luo y col., 2014
	China	0.006–0.881	Luo y col., 2014
	Alemania	0.192–0.215	Luo y col., 2014
	Grecia	0.055–0.152	Luo y col., 2014
	Korea	0.0075–0.334	Luo y col., 2014
	Gran Bretaña	0.006–0.068	Luo y col., 2014
Rango de concentraciones en río	Portugal	0.029–0.098	Michałowicz y col., 2014
Ríos cruzando la isla de Sao Luis	Brasil	<0.46	Melo y col., 2014
Río Elba	Alemania	4–92	Michałowicz y col., 2014
16 ríos principales	Taiwán	0.01–45	Michałowicz y col., 2014
Río Huangpu y sus afluentes	China	0.0071–0.1115	0.0276 Wu y col., 2014
Reserva marina Cape D' Aguilar, estación húmeda, Hong Kong,		0.011–0.41	0.0645 Xu y col., 2014
Reserva marina Cape D' Aguilar, estación seca, Hong Kong,		0.025–0.24	0.0695 Xu y col., 2014
North Tai Lake Basin,	China del este	0.024–1.175	0.270 Zhang y col., 2014
Ríos Ibéricos (Ebro, Llobregat, Júcar y Guadalquivir), España		0.00011–0.649	Gorga y col., 2015
Agua subterránea			
Áreas agrícolas en Cataluña	España	<0.01–0.35	Lacorte y col., 2002
Áreas agrícolas en el N de España	España	0.05–0.18	Latorre y col., 2003
Lugar de desechos de munición	Suiza	12–13	Godejohann y col., 2009
Evaluación de aguas subterráneas europeas	Europa	<0.001–2.299	0.079 Loos y col., 2010
Rango de valores medios en USA	USA	0.004–1.9	USEPA., 2010a
Agua subterránea	Inglaterra	hasta 20	Stuart y col., 2011
Agua subterránea en Ciudad Méjico	Méjico	<0.0005–0.010 (63 %)	Félix-Cañedo y col., 2013
Agua subterránea en Europa	Europa	máximo 2.299	0.079 Luo y col., 2014
Agua subterránea en USA	USA		2.550 Luo y col., 2014
Agua subterránea contaminada con lixiviado de vertedero en Osaka,	Japón	740	Michałowicz., 2014

Tabla 1.2.12. Concentraciones de BPA en varias matrices medioambientales alrededor del mundo. Adaptado de (Careghini y col., 2015). (Continuación)

Matriz /muestra	País	Concentraciones ($\mu\text{g}/\text{kg m.s.}$)	Media	Referencias
Sedimentos				
Río Elba y algunos de sus afluentes	Alemania.	66–343	163	Heemken y col., 2001
Sedimentos de estuarios y marinos de Okinawa y las Islas Ishigaki	Japón	<0.5–13	3.2	Kawahata y col., 2004
Sedimentos frescos, marinos y de estuario	Holanda	<1.1–43	3.2 (78 %)	Vethaak y col., 2005
Sedimentos de estuarios y marinos de la Bahía de Jiaozhou Bay y ríos circundantes	China	0.7–27.3		Fu y col., 2007
Sedimentos de La laguna Venezia	Italia	<2.0–118	36	Pojana y col., 2007
Sedimentos frescos	USA	1.4–140		USEPA., 2010a
Sedimentos marinos	USA	1.5–5.0		USEPA., 2010a
Río Huangpu y sus afluentes	China	0.96–14.44	7.22	Wu y col., 2013
Cuenca del río Ebro	España	<0.24–100		Gorga y col., 2014
Sedimentos del río Elba,	Alemania	10–380		Michałowicz, 2014
Sedimentos de 16 grandes ríos	Taiwán	0.37–492		
Sedimentos de estuarios de Auckland	Nueva Zelanda	<50–145	57	Stewart y col., 2014
Cuencas ríos Llobregat, etc	España	<0.24–117		Gorga y col., 2015
Suelos				
Campos agrícolas	USA	<32–147	59	Kinney y col., 2008
Campo de golf regado con agua residual regenerada, California	USA	0.55–2		Xu y col., 2008
Campos agrícolas regados con agua residual, Valle de Tula,	Méjico	1.6–30.2	8.3	Gibson y col., 2010
Suelos enmendados con biosólidos, N América (datos del periodo 1990–2006)	N América	95 percentil 21	1.15	Staples y col., 2010
Suelos modificados con biosólidos Europa (datos del periodo 1990–2006)	Europa	95 percentil 14	0.24	Staples y col., 2010
Rango de valores en USA	USA	4–14	6–7	USEPA., 2010a

En los estudios llevados a cabo en Europa incluidos en la tabla 1.2.12., En Portugal, Azevedo y col., (2001) detectaron BPA en el 51% de las muestras analizadas en ríos y la costa portuguesa. En España se han llevado a cabo diversos estudios en diferentes puntos del río Llobregat, contaminado especialmente por la gran carga industrial a lo largo de su cuenca. Gorga y col., (2015) ha realizado un extenso *monitoring* en las cuencas de 4 ríos españoles, observando niveles de BPA inferiores, entre ≤ 0.00011 y $0.649 \mu\text{g}/\text{L}$, detectando las mayores concentraciones en zonas industriales o cercanas a grandes núcleos urbanos en la cuenca del río Llobregat (Gorga y col., 2015).

Las concentraciones de BPA en **aguas subterráneas** referidas en las publicaciones varían en el rango de 0.001 y $20 \mu\text{g}/\text{L}$ (Careghini y col., 2015). En Cataluña, por ejemplo, se analizaron muestras en áreas agrícolas, detectando BPA a 0.01 - $0.35 \mu\text{g}/\text{L}$ en un área tratada con plaguicidas que contenía trazas de BPA a $1.5 \mu\text{g}/\text{L}$ (Lacorte y col., 2002) y hasta $1.5 \mu\text{g}/\text{L}$ en zonas de cultivo de uvas (Latorre y col., 2003). Stuart y col., (2011), en cambio, refieren niveles superiores de hasta $20 \mu\text{g}/\text{L}$ en Inglaterra (Stuart y col., 2011).

Los niveles de BPA en **sedimentos** citados en las publicaciones varían entre ≤ 0.24 y $492 \mu\text{g}/\text{kg}$ (Careghini y col., 2015). Las mayores concentraciones fueron detectadas en sedimentos en áreas afectadas por alta contaminación o aguas debajo de puntos industriales y comerciales (Kawahata y col., 2004), como

por ejemplo aguas debajo de una factoría química (343 µg/kg m.s) en el río Elba (Heemken y col., 2001). Fu y col., (2007) estudiaron la distribución de BPA en sedimentos y detectaron rangos similares de concentración en la bahía y los sedimentos del río (Fu y col., 2007). Adicionalmente, se han detectado altas concentraciones de BPA en animales acuáticos (peces y patos) debido a la contaminación del medio acuático.

En **suelos** se han descrito niveles de BPA entre 0.55 y 147 µg/kg m.s. (materia seca), con valores superiores generalmente en campos agrícolas modificados con biosólidos o regados con agua residual, en los que Gibson y col., (2010) detectaron hasta 30.2 µg/kg m.s. de BPA en un estudio durante 90 años, sugiriendo la acumulación de BPA en el suelo.

Aunque el **aire** es la matriz en la que menos se ha estudiado la presencia de este contaminante, Y debido a su baja volatilidad, no suele detectarse BPA en el aire ambiente, sin embargo, ha sido también detectado (Schummer y col., 2010) y se ha determinado asociado al particulado atmosférico (Berkner y cols., 2004; Salgueiro-González y cols., 2013).

Ftalatos: son compuestos ampliamente utilizados principalmente como plastificantes liberados en industrias y descargados en el medioambiente directamente de la producción de materiales plásticos e indirectamente por emisiones hacia la atmósfera (Serodio y Nogueira y col., 2006). Cuando son utilizados como plastificantes, no están enlazados químicamente a los polímeros de los plásticos, por lo que migran al medioambiente. Numerosos estudios han demostrado que los microorganismos juegan los principales roles en la degradación de ftalatos en el medioambiente bajo varias condiciones, revisado por Staples y col. (1997). En aguas superficiales, marinas o aguas dulces, la vida media en condiciones aeróbicas de degradaciones primarias pueden variar entre menos de 1 día a 2 semanas (exceptuando a bajas temperaturas (<5 °C) y pobres condiciones nutricionales).

El comportamiento y destino de los PAEs en el medioambiente es ampliamente influenciado por la longitud de la cadena alquílica, de forma que a medida que ésta aumenta, la tasa de degradación parece disminuir. Los ftalatos tienen baja solubilidad en agua (3 µg/L) (Fromme y col., 2002) y cuando son liberados en el medioambiente, tienen tendencia a adsorberse fuertemente en las partículas en suspensión y los sedimentos (Fromme y col., 2002; Harris y col., 2007). Como consecuencia, DEHP y DEP constituyen los ftalatos más ubicuos detectados en aguas residuales, lo cual correlaciona con su amplio uso (Gray y col., 1999).

Los ftalatos han sido detectados en varios compartimentos medioambientales como resultado de la producción, uso y eliminación de plásticos (Staples y col. 1997), incluyendo aire y aerosoles atmosféricos (Wensing y col. 2005; Xie y col. 2007; Wang y col. 2014; Salgueiro y col., 2015d), suelos, sedimentos, lixiviados de vertederos (Schwarzbauer y col. 2002; Zheng y col. 2007), y aguas naturales (agua superficial en ríos y mares y sedimentos (Xie y col. 2007; Blair y col. 2009; Net y col. 2014), agua residual (Gao y col. 2014) y agua de bebida (Luks-Betlej y col., 2001; Psillakis y col., 2003; Huerta-Fontela y col., 2008; Gao y col. 2014), así como en aires interiores y exteriores. Las concentraciones de ftalatos van de microgramos a miligramos en aguas residuales y disminuyen a nanogramos en agua superficial (Selvaraj y col., 2015; Gani y col., 2017) pudiendo llegar hasta 500 mg/L. En sedimentos y fangos pueden alcanzar respectivamente decenas y centenas de mg/kg ms (Net y col., 2015).

Un estudio sistemático sobre la presencia de ftalatos en el medioambiente acuático, refiere niveles de DEHP y DBP para 116 muestras de aguas superficiales, 35 sedimentos de ríos, lagos y canales, 39 efluentes de EDARs y 38 fangos de EDAR, tomados en Alemania (Frommey col, 2002). La carga de ftalatos fue principalmente atribuída a DEHP, mientras que DBP fue detectado a concentraciones menores y BBP cerca del límite de detección. Las concentraciones detectadas oscilaron entre 0.3 y 98 µg/L (agua superficial), 0.2–8.4 mg/kg (sedimentos), 1.7–182 µg/L (efluente EDARs) y 28–154 mg/kg (fango de EDAR).

Las bajas concentraciones de ftalatos en **agua superficial** pueden deberse a varios procesos como adsorción en los sólidos suspendidos, biodegradación aeróbica y anaeróbica y dilución en EDARs, que constituyen la mayor fuente de ftalatos en el agua superficial (Gain y col., 2017). Por otra parte, las concentraciones de ftalatos en agua superficial pueden aumentar por el amplio uso de productos de cuidado personal (Loraine y col., 2006) y por las lluvias que pueden incrementar los niveles de ftalatos como consecuencia de su presencia en aire y polvo (Zeng y col., 2009), a diferencia de lo que sucede a otros contaminantes como fármacos, en los que las lluvias diluyen y disminuyen las concentraciones. En un estudio en Holanda se ha detectado un máximo de 5 µg/L de DEHP en el río Dommel (Vethaak y col., 2005). En China se detectaron niveles similares de 5 ftalatos en los efluentes de las EDARs y en los ríos, siendo superiores en los afluentes cerca de los puntos de descarga que aguas abajo (Gao y col., 2014).

Respecto al **agua subterránea**, el alto nivel de ftalatos detectado en esta matriz es debido a la contaminación por la migración del plástico de la basura. También pueden venir del alcantarillado, ya que también se liberan ftalatos con la orina (Teijón y col., 2010). Los ftalatos, con altos valores de log K_{ow} , pueden ser efectivamente eliminados por adsorción. El comportamiento de los ftalatos en aguas subterráneas ha sido menos reportado en estudios por la gran cantidad de factores que intervienen (temperatura, concentración de los compuestos, propiedades del suelo, etc) (Gain y col., 2017).

En la tabla 1.2.13. se muestra el rango de concentraciones de los ftalatos estudiados en aguas superficiales, de consumo y subterráneas en diversos países (Gain y col., 2017).

En un estudio sobre la determinación de EDCs en **aire**, DBP y DEP fueron los compuestos más abundantes detectados en aire interior, con concentraciones hasta 2300 ng/m³ y 4300 ng/m³, respectivamente, mientras que en aire exterior se obtuvieron 45 ng/m³ y 55 ng/m³ de DEHP y DBP (Salgueiro y col., 2015d).

DEHP: La abundancia de DEHP en el medioambiente acuático está principalmente relacionado con su extensa utilización y producción. Debido a sus propiedades altamente hidrofóbicas, el destino principal del DEHP en agua podría ser adsorción en sólidos suspendidos. En 2000, DEHP fue incluido en las 33 sustancias peligrosas para ser controladas en agua superficial por la Comunidad Europea (DCE 2000/60/CE). La Directiva Europea del 2007, propuso una guía para la calidad medioambiental (NQE) de 1.3 mg /L DEHP en agua superficial. De acuerdo con Khan y col., (2008), se encuentra DEHP en agua superficial a niveles en el rango de 0.33 µg/L - 97.87 µg/L (Khan y col., (2008). Por ejemplo, las concentraciones de DEHP referidas por Yuwatini y col. en agua de río fueron entre 8 µg/L y 25 µg/L (Yuwatini y col. 2006). En Alemania (0.05-0.06 µg/L), Grecia (0.93 µg/L) y Croacia (0.247 µg/L), se detectaron varias concentraciones de DEHP en el rango de micra en agua de bebida (Luks-Betlej y col., 2001; Psillakis y col., 2003; Huerta-Fontela y col., 2008). La vida media de DEHP bajo radiación solar en el medioambiente fue 390 días en condiciones ácidas y

alcanzó 1600 días en medio neutro (Lertsirisopon y col., 2009). Bajo condiciones aeróbicas, se requiere más de una semana o un mes para la biodegradación del DEHP, mientras que, en condiciones anaerobias, la vida media de DEHP excede 1 mes (Lertsirisopon y col., 2009).

DEHP es un compuesto persistente altamente resistente a la biodegradación (Klopffer y col., 1996). Actualmente se han desarrollado algunos métodos alternativos para eliminar DEHP del medioambiente. Durante el proceso de transformación de agua superficial en agua potable, la eliminación de DEHP toma lugar principalmente durante el proceso de coagulación. Sin embargo, la coagulación por cloruro férrico permanece inactiva por degradación de ftalatos comparado a otros contaminantes orgánicos (Zhang y col., 2007). Así, es necesario el desarrollo de tecnologías eficientes, como procesos avanzados de oxidación, reemplazando a los procesos de tratamiento convencionales. En agua residual, las aguas domésticas y de lavado de ropa y coches representan las principales fuentes de las concentraciones de DEHP más altas (Dargnat y col., 2009; Vikelsøe y col., 2002).

Se ha detectado dietil ftalato (DEP) en aguas residuales de origen industrial, aguas superficiales y sedimentos, aguas marinas, en tejidos de peces y otra biota acuática y en aires interiores. DEP puede ser biodegradado en el medioambiente aeróbico o anaeróbico, y no es biomagnificado a través de la cadena de comida (Fromme y col., 2002).

Tabla 1.2.13. Rango de concentraciones de los ftalatos estudiados en el medioambiente acuático en diversos países. Adaptado de (Gain y col., 2017).

Matriz, País	Concentraciones ftalatos ($\mu\text{g/L}$)								Referencias
	DEP		DBP		BBP		DEHP		
	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	
Agua superficial									
Holanda	0.07	2.30	0.01	0.31	0.01	1.800	0.90	5.00	(Vethaak y col., 2005)
Holanda	0	0	0.02	0.45	0	0	0.28	0.65	(Peijnenburg y col., 2006)
Francia	0.07	0.18	0.07	0.32	0	0	0.160	0.31	(Dargnat y col., 2009)
China	0.01	0.12	0.24	4.43	0	0.012	0.237	1.60	(Zeng y col., 2009)
Austria	0.00	0.001	0	0.003	0	0.001	0.0005	0.02	(Clara y col., 2010)
China	0.01	0.21	0.11	0.29	0.01	0.021	0.010	0.84	(He y col., 2011)
España	0	0	0	0.55	0	0	0	0	(Domínguez-Moruco y col., 2014)
China	0.00	0.01	0.002	0.01	0	0.004	0.002	0.01	(Gao y col., 2014)
India	0.04	0.52	0	0.37	0.005	0.145	0	0.82	(Selvaraj y col., 2015)
Agua de consumo									
Alemania	0	0.20	0	0.380	0	0.020	0	0.05	(Luks-Betlej y col., 2001)
Polonia	0	0.16	0	0.064	0	0.050	0	0.06	(Luks-Betlej y col., 2001)
Japón	0	0.005	0.006	0.093	0	0	0	5.22	(Hashizume y col., 2002)
Grecia	0	0	0	0	0	0	0	0.000	(Psillakis y col., 2003)
China	0	0.055	0.005	0.450	0	0	0.129	6.57	(Liu y col., 2013)
España	0	0.381	0	0.633	0	0	0	0	(Domínguez-Moruco y col., 2014)
Taiwan	0	0.002	0	0.035	0	0.001	0	172	(Liou y col., 2014)
Agua subterránea									
UK	0.00	0.430	0.099	4.300	0	0	0.050	0.840	(Law y col., 1991)
Japan	0	0	0.020	0.350	0	0	1	18.400	(Staples 2003)
Europe	0.10	0.200	0.120	0.460	0.040	0.240	0.070	1.400	(Staples 2003)
USA	0.87	147	0.500	50	0	0.038	0	0.470	(Staples 2003)

Plaguicidas: En el contexto europeo, Von der Ohe y colaboradores estudiaron la presencia de 500 plaguicidas en diversos ríos europeos (Llobregat, Elbe, Danube y Scheldt) detectando concentraciones entre ng/L y µg/L (Von der Ohe y col. 2011). España, considerado uno de los principales consumidores de plaguicidas de Europa, muestra una disminución en su uso en los últimos 10 años. En 2002 se registró un gasto de casi 1000 millones de euros en el consumo de fitosanitarios y en 2004 se registró la máxima aplicación de plaguicidas, superando los 3 kg de ingrediente activo por hectárea (Köck, Tdx, 2014). Según el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA 2011, 2012), los insecticidas, seguidos por los herbicidas y luego por los fungicidas son los más utilizados. En 2016 se comercializaron más de fungicidas y bactericidas (38,92 ton), seguidos de herbicidas (15,22 ton) y por último insecticidas (7.6 ton) (<http://www.mapama.gob.es/>)

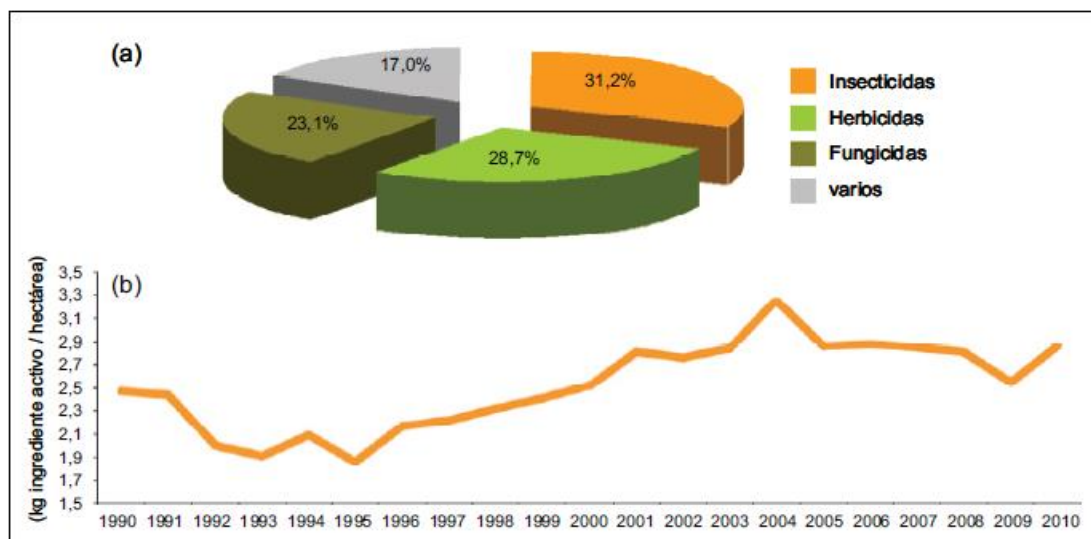


Figura 1.2.3. Consumo en España de las diversas familias de plaguicidas en 2010 (fitosanitarios) (a) y serie histórica (b) en kg de ingrediente activo por hectárea (Fuente: Köck y col., 2014)

En España, se han determinado plaguicidas polares o medio polares en aguas de consumo humano (Kampioti y col., 2005; Kuster y col., 2008b), en aguas superficiales (Barata y col., 2007; Terrado y col., 2007; Kuster y col., 2008a, 2008b; Palma y col., 2009; Ricart y col., 2010; Kock y col., 2010; Köck-Schulmeyer y col., 2011, 2012; Ochoa y col., 2012), en sedimentos (Navarro-Ortega y col., 2010), en aguas subterráneas (Kampioti y col., 2005; Hildebrand y col., 2007 y 2008, Postigo y col., 2010), y en aguas residuales (Kuster y col., 2008b; Köck-Schulmeyer y col., 2011). También se han detectado en el aire (Schummer y col., 2010). En Portugal, donde se determinaron plaguicidas en esta tesis doctoral (ver capítulo 4), diversos estudios muestran niveles de plaguicidas en aguas superficiales (Cerejeira y col., 2003; palma y col., 2009), en aguas subterráneas (Cerejeira y col., 2003) y en sedimentos de río (Villaverde y col., 2008), etc.

Sin embargo, hay escasos estudios que los determinen en aguas residuales, ya que son considerados contaminantes mayoritariamente de origen agrícola y no urbano. Se ha observado una deficiente eliminación de los plaguicidas tanto en los procesos de depuración (Köck y col., 2014), como en los de potabilización de las aguas (Broseus y col. 2009). Recientemente, Köck y col., evaluaron la presencia y eliminación de 22 plaguicidas en 3 EDARs y la importancia medioambiental de esta fuente de contaminación al medio acuático, considerando no

solo su concentración (determinada mediante SPE-LC-MS/MS), sino también su toxicidad respecto a 3 microorganismos acuáticos (algas, *Daphnia* y peces) (Köck y col., 2012 y 2014). De acuerdo a las tasas medias de eliminación calculadas por Köck-Schulmeyer y col., atrazina es uno de los plaguicidas con peor eliminación, detectado siempre a concentraciones superiores a la salida de las EDARs respecto a los valores de entrada (con niveles inferiores en la EDAR con tratamiento terciario), seguida de otras triazinas como simazina y tertbutilazina. Köck y col., argumentan la desconjugación de metabolitos y/o productos de transformación de los plaguicidas, la hidrólisis y la desorción del material particulado durante el proceso de depuración, como posibles causas del incremento de concentración detectado en los efluentes de las depuradoras. En otros estudios incluso no fueron eliminados, como es el caso de la atrazina y el mecoprop (Morasch y col., 2010); sin embargo, se detectaron altas eliminaciones de irgarol.

1.2.6.2. Compuestos Disruptores Endocrinos en aguas residuales.

El objetivo de los tratamientos en las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) es, en general, reducir la carga de contaminantes del vertido y convertirlo en inocuo para el medio ambiente. Las EDAR pueden tener tratamiento fisicoquímico (con tratamiento primario) o biológico (con tratamiento secundario) La eliminación de fósforo y nitrógeno son tratamientos adicionales especiales. De las plantas estudiadas, todas tenían tratamiento biológico excepto una que tenía tratamiento físico-químico, y la EDAR de Girona no tenía eliminación de nitrógeno. La figura 1.2.4. muestra las distintas etapas del tratamiento en las EDARs.

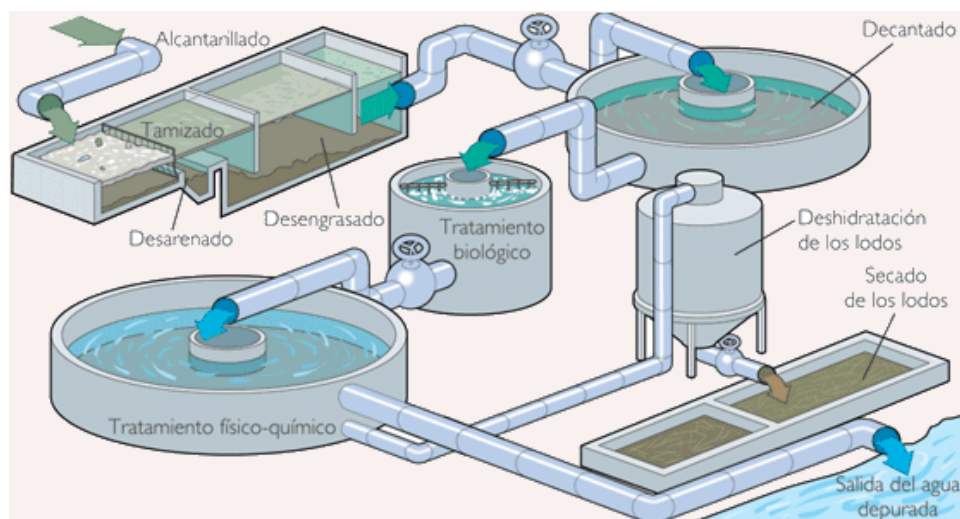


Figura 1.2.4. Etapas del tratamiento en una Estación Depuradora de Aguas Residuales. Fuente (es.tiching.com/727369)

En el año 2004 ya existían en Cataluña 327 EDARs (319 de ellas con tratamiento biológico), que han ido aumentando hasta unas 516 EDARs en la actualidad (<http://aca-web.gencat.cat>, marzo 2018). Entre todas tenían una capacidad útil para tratar 2.835.093 m³ cada día, o lo que es lo mismo, 1.040 hm³ de agua residual cada año, más de cuatro veces el volumen que cabe en el embalse de Susqueda. Durante el año 2004 se depuraron en Cataluña un total de 1.972.069 m³ al día, es decir, unos 730 hm³.

Los EDCs se encuentran en varios compartimentos medioambientales como resultado de su amplio uso. La principal fuente que introduce la mayor parte de estos compuestos en el ambiente son las EDARs, a través de sus efluentes o de los fangos acumulados en vertederos (Giger y col., 1984; Sabik Y col., 2003; Soares y col., 2008). Las actuales plantas de tratamiento de agua residual (EDARs) convencionales no han sido diseñadas para éstos nuevos contaminantes. Adicionalmente, el éxito de la eliminación de EDCs puede variar enormemente de una planta a otra, de forma que una parte no negligible de los EDCs, sale en los efluentes sin haber sido degradados.

Las plantas de tratamiento de agua residual eliminan parte de estas sustancias, principalmente a través de procesos de degradación en el fango activado (Priac y col., 2014). La adsorción al fango es un mecanismo de eliminación que aumenta con el tiempo en las EDARs, el tipo de tratamiento y la temperatura (Maguire, 1999; Soares y col., 2008).

Métodos avanzados para la eliminación de compuestos alquilfenólicos en depuradoras:

Los principales métodos o procesos avanzados utilizados para la eliminación de compuestos alquilfenólicos en agua y depuradoras y sus principales características son (Priac y col., 2014):

- Adsorción: carbonos activos, materiales no convencionales -> Proceso no destructivo
- Biológico: biodegradación, bioreactor de membrana (BMR), proceso de fango activado, biotecnología -> Uso de cultivos biológicos y/o membranas
- Oxidación: fotocatalisis, fotólisis -> Producción *in situ* de radicales hidroxilo reactivos
- Ozonización -> Uso de un oxidante
- Filtración por membrana: nanofiltración (NF), Ósmosis Inversa (RO) -> Proceso no destructivo.

La cuestión es qué método o combinación de ellos es más adecuado y eficiente para el tratamiento de estos compuestos en el agua residual

La adsorción en carbón activo es un proceso simple y químicamente eficiente; tiene un amplio espectro y entre otros tipos de compuestos, permite adsorber EDCs (Paune y col., 1998). Otra ventaja es que no se forman subproductos. Sin embargo, tiene el problema de su eliminación tras ser utilizado, especialmente porque se satura rápidamente y la eficiencia de los filtros disminuye y han de ser cambiados o regenerados (Priac y col., 2014).

Los sistemas de bioreactores de membrana (BMR) son considerados de las tecnologías más prometedoras en tratamiento microbiológico de aguas residuales para la eliminación de compuestos emergentes de aguas residuales urbanas (Cases y col., 2011). La principal ventaja de este sistema, que combina la tecnología de membranas con los procesos biológicos, es que permite obtener un alto grado de depuración, eliminando no solo las partículas en suspensión, sino también las bacterias y organismos patógenos, e incluso los virus, dependiendo de si se aplican membranas de micro o ultrafiltración, al mismo tiempo que minimiza en gran medida la generación de fangos y las necesidades de espacio. Las principales limitaciones están asociadas a los costes de instalación y mantenimiento y operacionalmente, al ensuciamiento de las membranas, impidiendo su adecuado comportamiento.

La técnica de oxidación avanzada es otra solución que presenta ventajas desde el punto de vista de eficacia química. El objetivo de este proceso es modificar el estado de innovadoras moléculas orgánicas tóxicas refractarias, particularmente por biodegradación. Los procesos de oxidación avanzada (AOPs) son muy eficaces para el tratamiento de efluentes conteniendo compuestos refractarios que son tóxicos o no biodegradables y se ha referido dar resultados excelentes en particular en la reducción de COD y TOC debido a la mineralización de compuestos orgánicos. Entre la amplia variedad de AOPs, basado en el sustancial número de estudios relevantes, la fotocatalisis es una herramienta interesante para el tratamiento de APs debido a su potencial de reproducir una mineralización completa. En asociación con biodegradación o adsorción, la oxidación avanzada parece la técnica del futuro, aunque su coste continúa previniendo su generalización. Gultekin (2007) ha descrito que la principal ventaja de los AOPs sobre los tratamientos químicos y biológicos es su respeto con el medioambiente (Gultekin 2007), sin embargo, los AOPs pueden dar lugar a subproductos en los efluentes, que tras la desinfección final pueden ser transformados en tóxicos (Belgiorno y col., 2007), que pueden ser evaluados mediante bioensayos (Rizzo 2011).

La filtración por membranas (NF, RO, etc.) proporciona en general una reducción de alta calidad, pero su principal desventaja es su relativo alto coste.

Varios estudios en EDARs han demostrado que la utilización de métodos avanzados mejora la eliminación de compuestos alquilfenólicos. Por ejemplo, la eliminación de NP mejora añadiendo filtros de carbón activo, tratamiento UV y ozonización a los procesos de tratamiento existentes (Paune y col., 1998; Johnson y Sumpter, 2001). Entre 2005 y 2010, UK llevó a cabo un programa de demostración para evaluar tecnologías para eliminar EDCs del agua residual urbana (Jones y col., 2007). Las técnicas de tratamiento avanzadas indudablemente reducen la descarga de microcontaminantes, sin embargo, inevitablemente agravan los costes e implican aumentos indeseables medioambientalmente de incremento de consumo de energía y emisiones de CO₂. Adicionalmente, excepto para técnicas de oxidación, la eliminación de los compuestos implica su transferencia al fango, y una vez allí, se conoce muy poco sobre su comportamiento, aunque varios estudios recientes tienden a mostrar que el compostaje del fango es un medio eficaz de atenuar los niveles de los nonilfenoles. Por ejemplo, estos métodos no resuelven uno de los principales problemas, que es la acumulación de APs en el fango debido a su alta hidrofobicidad. La mayoría de métodos para el tratamiento de fango contaminado tienen un alto coste y contaminan el medioambiente, por lo cual han sido propuestos métodos alternativos, como compostaje (La Guardia y col., 2001) y estabilización aeróbica (Giger y col., 1984).

Los pocos estudios publicados sobre este tema muestran que los mejores niveles de degradación son alcanzados con plantas usando los procesos de tratamiento más completos, incluyendo tratamiento con ozono, carbón activo o ambos (Berryman y col., 2004; Jones y col., 2007; Soares y col., 2008).

Revisando las publicaciones relacionadas, se observa que la investigación ha sido y continúa dirigida a las áreas de tratamientos combinados oxidación-adsorción, oxidación-biodegradación o adsorción-tratamientos biológicos, con el fin de mejorar la eliminación, degradación y/o biodegradación (Oller y col., 2011). Los métodos combinados son interesantes porque toman ventajas de efectos sinérgicos. Sin embargo, la gran mayoría de los trabajos publicados enfocan en el tratamiento de un químico individual, testado en concentraciones mucho más altas que las detectadas en el medio ambiente acuático. Por tanto, las futuras investigaciones tienen que enfocar

en este aspecto, en encontrar soluciones innovadoras para la eliminación, que sean químicamente eficaces, técnicamente y económicamente viables y respetuosas con el medioambiente. Para conseguir este propósito, será necesario adoptar un enfoque multidisciplinario, con químicos, biólogos, microbiólogos, polimeristas e ingenieros trabajando juntos hacia un objetivo común (Priac y col., 2014).

Compuestos alquilfenólicos: durante la última década, se han llevado a cabo un gran número de Planes de Vigilancia Ambiental (PVA) para determinar el comportamiento de los alquilfenoles en aguas residuales. Sin embargo, los APEOs no se eliminan completamente en los procesos de tratamiento de aguas residuales y los mejores niveles de degradación son alcanzados con plantas usando los procesos de tratamiento más completos, incluyendo tratamiento con ozono, carbón activo o ambos (Jones y col., 2007; Soares y col., 2008). En la tabla 1.2.11. se resumen los niveles de APs, APEOs y APECs detectados en aguas residuales en algunos de estos estudios. Aproximadamente el 63% de todos los compuestos nonilfenólicos introducidos en las EDARs son descargados en el medioambiente en la forma de NP₁EO, NP₂EO y NP lipofílicos, NPECs o NPEOs no transformados. El 40% de la salida o eliminación de los compuestos nonilfenólicos es vía digestión en el fango. Consecuentemente, estos compuestos son frecuentemente detectados en cantidades sustanciales en fangos digeridos. Los NPEOs se han detectado a concentraciones en el rango de bajos mg/kg a mayor que 500 mg/kg, siendo NP₁EO y NP₂EO las especies predominantes. Generalmente la contaminación más alta se encuentra en las EDARs que usan digestión anaerobia.

Durante los tratamientos de las EDARs, los APEOs de cadena larga son degradados en los APEOs de cadena corta (principalmente NP₁EO y NP₂EO) mediante una secuencia aeróbica (Mayer y col., 2007) y finalmente, se degradan en los APs (NP o OP) los cuales no son fácilmente degradables (Servos, 1999; Ying y col., 2002; Corvini y col., 2006). Por tanto, las concentraciones de NPEOs en las entradas de las EDARs son significativamente más altas que las de los efluentes.

Se ha encontrado una gran variación en la eficacia de las depuradoras eliminando NP, con un rango entre 11% y 99%, en función del tipo de proceso utilizado en el tratamiento del agua residual (Berryman y col., 2004). Por ejemplo, un proceso de tratamiento compuesto por ozonización y subsecuente filtración de carbón activo con cloración fue capaz de eliminar el 95% de NP (Petrovic y col., 2003).

Puede haber un descenso por biodegradación en medioambientes y depuradoras a través de la acción de microorganismos bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Aunque el NP está presente a bajas concentraciones, hay un desconocimiento de los riesgos a largo plazo de la exposición a estos niveles. Respecto al NP, las concentraciones también se reducen durante el tratamiento en las EDARs, sin embargo, se cree que es debido más a la adsorción sobre el fango que a la eliminación por el tratamiento. En las depuradoras con digestión anaeróbica se detectan niveles de NP especialmente altos (Soares y col., 2008).

También puede verse que las concentraciones de NPECs no se reducen de las entradas a las salidas de las EDARs, lo cual se atribuye al hecho de que los NPECs se forman tan rápidamente como se eliminan. El OPE₂C es detectado a concentraciones 10 veces inferiores que el NP₂EC, lo cual refleja el hecho de que los octilfenoles etoxilados (OPEOs) solamente son utilizados el 10% del uso de los alquilfenoles (Postigo y col., 2009). Las plantas de tratamiento de agua residual eliminan parte de estas sustancias, principalmente a través de procesos de

degradación en el fango activado (Priac y col., 2014). La adsorción al fango es un mecanismo de eliminación que aumenta con el tiempo en las EDARs, el tipo de tratamiento y la temperatura (Maguire, 1999; Soares y col., 2008). La degradación solo es parcial y ocurre a través de la disociación de cada una de las unidades etoxiladas. Una secuencia aeróbica durante el tratamiento del agua residual produce NPs carboxilados, mientras que una secuencia anaeróbica produce sus homólogos etoxilados (Mayer y col., 2007). El punto final (*endpoint*) de la degradación de los NPEOs es el NP (Bennie, 1999; Servos, 1999; Ying y col., 2002; Corvini y col., 2006). APEOs son inestables en el medioambiente y su degradación da metabolitos a menudo más estables y persistentes y en algunos casos tóxicos. La presencia de APs generalmente resulta de la degradación de APEOs.

Tabla 1.2.13. Concentraciones (µg/L) de NPEOs, NPECs y NPs detectados en las entradas y salidas de EDARs en distintos países. Adaptado de (Postigo y col., 2009).

Acrónimo EDC	Entrada EDAR (µg/L)	Efluente EDAR (µg/L)	País	Referencia
NP ₁ EO	2.6-35	-	Austria	(Clara y col, 2007)
NP ₂ EO	1.2-5.8	-	Austria	(Clara y col, 2007)
NPEO	29-221	-	Italia	(Crescenzy y col, 1995 y
NPEO	27-2.120	-	Suiza	DiCorcia y col., 2000)
NP ₁ EO	0.54-125	0.73-156	España	(Ahel y col., 2000)
NP ₂ EO	0.71-33	0.12-4.4	España	(Castillo y col., 2000; Eichhorn y
NPEO	96-430	-	España	col., 2000;
NP ₀₋₃ EO	47.6-262	1.58-32.3	USA	Planas y col, 2002)
NP ₄₋₁₆ EO	265-745	0.042-8.42	USA	(González y col, 2004)
NPEO	6.5-344	4.67-444	Dinamarca	(Loyo-Rosales y col, 2007)
NPEO	5-392	-	Croacia	(Cohen y col, 2001)
NP ₁ EO	-	-	Alemania	(Tenzic y col, 2001)
NP ₂ EO	-	0.072-0.175	Alemania	(Jahnke y col, 2007)
	-	0.09-0.21		(Jahnke y col, 2007)
NPEC	0.16-450	1.3-307	España	(González y col, 2004)
NPEC	0.28-3.23	7.58-99.3	USA	(Loyo-Rosales y col, 2007)
NPE ₂ C	0.001-4.37	-	Croacia	(Terzic y col, 2008)
NPE ₁ C	0.001-3.2	-	Croacia	(Terzic y col, 2008)
NPE ₁ C	-	0.8-1.112	Alemania	(Jahnke y col, 2004)
	0.352- 40	0.081-0.88	Italia	(Careri y col, 2003)
	0.5-251	0.22-5	España	(Castillo y col., 1999; Eichhorn
	0.4-219	-	Bélgica	y col., 2000; González y col.,
NP	1.05-8.6	-	Austria	2004)
	0.1- 40	-	Holanda	(Tangue y col, 1999)
	0.46- 4.4	-	Croacia	(Clara y col, 2007)
	0.002-5.2	-	Noruega	(De Voogt y col, 2000)
	-	0.14-0.242	Alemania	(Terzic y col, 2008)
				(Vogelsang y col, 2010)
				(Jahnke y col, 2004)

Hormonas esteroideas: Los estrógenos que no son degradados durante el proceso de tratamiento en las EDARs, son liberados al medioambiente con el efluente, siendo de mayor consideración en áreas densamente pobladas, con una gran carga de agua residual urbana. La mayoría de estudios sobre la presencia y comportamiento de los estrógenos durante el proceso de tratamiento de las depuradoras han sido llevados a cabo en EDARs que reciben aguas y descargas urbanas/domésticas, y las concentraciones publicadas han sido normalmente en el rango de ng/L. E2 y E1 son los estrógenos detectados más frecuentemente y representan más del 98% de la estrogenicidad total de un efluente de depuradora (Nakada y col., 2004; Nelson y col., 2007), mientras que E3 ha sido estudiado y detectado solo ocasionalmente. Sin embargo, cuando se ha detectado su presencia, las concentraciones de E3, han sido normalmente superiores a las encontradas para E2 y E1. En general, en las aguas residuales la concentración de estrógenos aumenta en el orden $E3 > E1 > E2$, tal y como puede verse en la tabla 1.2.6.10., que muestra los niveles de estrógenos detectados en aguas residuales en diversos países. Sin embargo, Una revisión rigurosa de todos los datos disponibles, sitúan las concentraciones media y mediana de estos estrógenos en el rango de 45–75 ng/L (E3), 20–55 ng/L (E1) y 9–20 ng/L (E2) (Petrovic y col., 2009). El estrógeno sintético más estudiado, EE, no ha sido detectado (Komory y col., 2004; Laganá y col., 2004; Gomes y col., 2005) o ha sido analizado en general a concentraciones mucho más bajas que las de otros estrógenos (Baronti y col., 2000; Zuehlke y col., 2005, Koh y col., 2007). Ocasionalmente, se han referido niveles superiores a 100 ng/L, como por ejemplo 155 ng/L (Cui y col., 2006) y 138 ng (Roda y col., 2006).

Respecto a los estrógenos conjugados que se han incluido en nuestro estudio los sulfatos y los glucurónidos de E1, E2 y E3 han sido detectados a niveles similares a los estrógenos libres (Petrovic y col., 2009). Sin embargo, tanto en las EDARs como en el medioambiente, estos conjugados pueden sufrir desconjugación y actuar como precursores de los correspondientes esteroides libres. Así, una apropiada evaluación de su presencia e impacto requiere el análisis de ambos tipos de estrógenos, los libres y los conjugados, aunque generalmente los conjugados han sido menos estudiados, probablemente debido a que son menos estrogénicos (Kuster y col., 2004).

La mayoría de estudios realizados indican que los estrógenos y progestógenos tienen tendencia a acumularse en matrices medioambientales sólidas, donde presentan diferentes vidas medias (Ying y col., 2005); sin embargo, se han realizado pocos estudios seguramente por la complejidad de los métodos analíticos y los bajos niveles a que se encuentran los estrógenos en matrices sólidas (Kuster y col., 2004). Los pocos datos disponibles, indican su presencia en sedimentos a concentraciones hasta 22.8 ng/g y algo más altas en fangos, hasta 64.4 ng/g expresados en equivalentes de estradiol (Kuster y col., 2009). Los principales mecanismos estimados para su eliminación en el medioambiente son la adsorción (Huang y col., 2001) y la biodegradación aeróbica.

Tabla 1.2.16. Concentraciones (ng/L) de estrógenos detectados en aguas residuales en distintos países. Adaptado de (Postigo y col., 2009).

crónimo EDC	Agua residual (ng/L)	País	Referencia
E1	-	Holanda	(Belfroid y col.1999)
	-	Italia	(Baronti y col., 2000)
	4.7-25	Japón	(Komori y col., 2004)
	nd-21	Italia	(Laganá y col., 2004)
	10-31	Francia	(Cargouet y col., 2004)
	-	Italia	(Roda y col., 2006)
	3-22	Canadá	(Lee y col., 2005)
	nd-234 17	Bélgica	(Pauwels y col., 2008)
E2	< 0.6-12 Out	Holanda	(Belfroid y col.1999)
	4.7-25	Italia	(Baronti y col., 2000)
	nd-21	Japón	(Komori y col., 2004)
	10-31	Italia	(Laganá y col., 2004)
	11.1-17.4 In /4.5 -8.6 Efl.	Francia	(Cargouet y col., 2004)
	3-22	Italia	(Roda y col., 2006)
	nd-234	Canadá	(Lee y col., 2005)
	17	Bélgica	(Pauwels y col., 2008)
	3.2-55	Japón	(Nasu y col., 2000)
E3	-	Holanda	(Belfroid y col.1999)
	24-188	Italia	(Baronti y col., 2000)
	27-220	Japón	(Komori y col., 2004)
	23-48	Italia	(Laganá y col., 2004)
	-	Francia	(Cargouet y col., 2004)
	na	Italia	(Roda y col., 2006)
	nd-108 na	Canadá Bélgica	(Lee y col., 2005) (Pauwels y col., 2008)
EE2	< 0.2-7.5 Efl.	Holanda	(Belfroid y col.1999)
	0.4-13	Italia	(Baronti y col., 2000)
	nd	Japón	(Komori y col., 2004)
	nd	Italia	(Laganá y col., 2004)
	4.9-7.1 In/2.7-4.5 Efl.	Francia	(Cargouet y col., 2004)
	na	Italia	(Roda y col., 2006)
	2.4-138	Canadá	(Lee y col., 2005)
	< 0.2-114	Bélgica	(Pauwels y col., 2008)

nd: no detectado; na: no analiza

Los principales problemas asociados a las EDARs con respecto a las hormonas esteroideas se pueden resumir de la siguiente manera:

a) La mayor parte de este tipo de instalaciones carecen de los sistemas apropiados para eliminar por completo estas sustancias, habiéndose estimado porcentajes de degradación que oscilan entre el 60 y el 90 % en las EDARs convencionales (Baronti y col., 2000; Langford y col., 2003; Hu y col., 2007; Nakamura y col., 2006; Muller y col., 2008).

b) Aunque la mayoría de los estrógenos se excretan como subproductos menos activos que los esteroides de partida, en las EDARs se puede producir una “deconjugación”, de forma que en los efluentes volvemos a encontrar a los productos originales (Hu y col., 2007).

c) Los tratamientos de cloración convencionales también pueden producir subproductos clorados que presentan actividad estrogénica, siendo ésta, ligeramente superior que la de los compuestos originales (Nakamura y col., 2006).

Bisfenol A: BPA está presente en aguas residuales municipales e industriales (productoras de compuestos químicos, papel de imprimir y papel de reciclaje y embalaje, etc) (WHO, 2012). Las EDARs parecen ser uno de las principales fuentes de contaminación de BPA, que ha llevado a altos niveles tanto en aguas superficiales como en sedimentos (Bolz y col, 2001).

El BPA es fácilmente eliminado durante procesos de tratamiento de fango activado por mecanismos de biodegradación (Matsui y col., 1975; 1988; Staples y col., 1998

La tabla 1.2.14. muestra las concentraciones de BPA detectadas en diferentes EDARs. A pesar de la alta tasa de eliminación en depuradoras, el BPA no es completamente eliminado durante el tratamiento de aguas residuales (37-94% eliminación) y es liberado en el medioambiente y detectado en los efluentes y en fangos (Lee y col., 2000; Kang y col., 2007; WHO, 2012). Como resultado, ha sido detectado generalmente en aguas de ríos (Bolz y col, 2001; Fromme y col, 2002; Heemken y col., 2001; Shin y col., 2001; Rodriguez-Mozaz y col., 2004; Focazzio y col., 2008) hasta 20 µg/L (WHO, 2012) y ocasionalmente en aguas subterráneas y de consumo (Shin y col., 2001; Kuch y col., 2001; Rodriguez-Mozaz y col., 2004) y en sedimentos de ríos (hasta 1.63 mg/kg peso seco) (WHO, 2012). Varios estudios muestran que BPA puede descomponer microbiológicamente en agua, con una vida media entre 2.5 y 4 días (Staples y col., 1998), aunque también ha sido referido la persistencia y bioacumulación de BPA (Schonfelder y col., 2002). Otros estudios destacan los derivados clorados formados durante la cloración de aguas potables y residuales (Zafra-Gómez y col, 2008).

BPA está presente en aguas municipales e industriales. En aguas residuales industriales se han encontrado concentraciones muy altas. Así, en un estudio a gran escala realizado en Canadá Lee y Peart (2000) detectaron BPA en una concentración de 36.7 mg/kg en fangos de aguas residuales de entrada (Lee y col., 2000).

Tabla 1.2.14. Concentraciones (µg/L) de plastificantes, BPAs detectados en las entradas y salidas de EDARs en distintos países. Adaptado de (Postigo y col., 2009).

Acrónimo EDC	Entrada EDAR (µg/L)	Efluente EDAR (µg/L)	País	Referencia
BPA	149.20	1.080	Canadá	(Lee y col, 2000)
	0.542-3.01	0.162-0.258	Alemania	(Körner y col, 2000)
	Na	0.702	Alemania	(Fromme y col, 2002)
	Na	2.01-24.32	España	(Aguayo y col, 2004)
	1.55	<LOD	Portugal	(Mauricio y col, 2006)
	Na	0-0.006	Bélgica e Italia	(Loos y col, 2007)
	0.378-0.890	0.012-0.028	UK	(Jiangi y col, 2005)
	0.06-1.51	<LOD-0.27	España	(Stasinakis y col, 2008)
	<LOD-2.14	<LOD-1.10	Grecia	(Céspedes y col, 2006)

Ftalatos: La biodegradación puede ser el proceso principal de eliminación de ftalatos en el agua, ya sea los de entrada en EDARs o los que son liberados a las aguas superficiales, que pueden ser acumulados y degradados rápidamente por un amplio rango de microorganismos como bacterias bajo condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas. La degradación de ftalatos es definitiva con fango de EDAR inoculado entre >50 a 99% en un estudio publicado por Staples y col. (Staples y col., 1998).

En varios estudios se han detectado concentraciones de ftalatos superiores en agua residual procedente de fuentes domésticas que industriales, ya que también se excretan en la orina y en las heces como consecuencia de la ingestión de ftalatos a los que estamos continuamente expuestos en la vida diaria, como envases de alimentos, etc (Blount y col., 2000; Hauser y col., 2005). Adicionalmente, la mezcla de lixiviados de vertederos y escorrentías superficiales con aguas residuales puede incrementar los niveles de ftalatos en el medio acuático (Gain y col., 2017).

DEHP y DEP constituyen los ftalatos más ubicuos detectados en aguas residuales, lo cual se correlaciona con su alta producción, amplio uso y propiedades físico-químicas (baja solubilidad y K_{ow} relativamente alta). Sin embargo, aunque las concentraciones en el agua residual de entrada son normalmente muy altas (13.000 ng/L) DEHP se adsorbe muy bien en las partículas de fango, de forma que es raramente detectado a concentraciones muy altas en los efluentes de las EDARs, indicando alta eliminación (como adsorción en fango) durante el proceso de tratamiento del agua residual. Las altas concentraciones de DEHP en el fango (alrededor de 10,000 ng/g material seca) son un tema de debate al considerar la eliminación del fango. Adicionalmente existe el problema de los límites de detección y los blancos por contaminación del material, etc.

Respecto a la eliminación de ftalatos durante el proceso en las EDARs, hay limitados estudios en la bibliografía. Estos compuestos pueden escapar del tratamiento primario de la depuradora. Un estudio detectó 61.1, 81.4 y 52.7% de ftalatos de DBP, BBP y DEHP respectivamente en la primera etapa del clarificador (Dargnat col., 2009). Los compuestos con $\log K_{ow}$ mayor que 4 son eliminados principalmente por adsorción (Langford y col., 2007). En sistemas biológicos (tratamiento secundario), las eficiencias de eliminación total de ftalatos varían mucho entre el 23 y el 100% y la biodegradación y la adsorción son las principales responsables de la eliminación de ftalatos. La bibliografía muestra que los ftalatos de mayor peso molecular como el BBP y el DEHP son menos degradables y son mayoritariamente eliminados por adsorción en biosólidos y permanecen en el fango (Martinen y col., 2003), mientras que los de menor peso molecular, como el EDP el DBP, son más degradables en la digestión anaerobia (Gani y col., 2017).

Las eficiencias de eliminación del DEHP en EDARs alrededor del mundo han mostrado amplias discrepancias. Algunos investigadores (Vogelsang y col., 2006; Dargnat y col., 2009) compararon la eficacia de eliminación de DEHP en cada etapa del tratamiento de agua residual. De acuerdo con Klopffer, DEHP es un compuesto persistente altamente resistente a la biodegradación (Klopffer y col., 1996). Comparado con otros PAEs, se citan tasas de eliminación de DEHP inferiores mediante proceso biológico. Sin embargo, Martinen y col. ha referido una eficacia de eliminación total del 97% (Martinen y col. 2003). Actualmente se han desarrollado algunos métodos alternativos para eliminar DEHP del medioambiente. Los procesos de adsorción usando materiales adsorbentes orgánicos o inorgánicos (entre otros, carbono activo, nanotubos de carbono, triacetato

de celulosa, adsorbentes poliméricos, quitosan, biomasa, etc) han sido considerados ser eficientes en la eliminación de ftalatos incluyendo DEHP de aguas residuales (Xia y col., 2011).

El rango típico de concentraciones de DEHP en fango citado es entre 10 y 50 mg / kg / ms (Abad y col., 2005). De hecho, la concentración DEHP en fangos desaguados fue mayor que el valor recomendado por la UE (100 mg/ kg) para aplicación en suelos (Cheng y col., 2000). La acumulación de altos niveles de DEHP en fango de depuradora es probablemente debido a una inhibición de metanogénesis durante el tratamiento anaeróbico en el digestor (Alatríste- Mondragon y col., 2003; Gavala y col., 2003). La Tabla 1.2.15. resume niveles de ftalatos detectados en diferentes aguas residuales, que son una de las mayores fuentes de estos contaminantes en el medio acuático. Se observa como la carga de ftalatos es mayoritariamente debida al DEHP (Fromme y col, 2002).

Tabla 1.2.15. Concentraciones ($\mu\text{g/L}$) de ftalatos detectados en las entradas y salidas de EDARs en distintos países. Adaptado de (Postigo y col., 2009).

Acrónimo EDC	Entrada EDAR ($\mu\text{g/L}$)	Efluente EDAR ($\mu\text{g/L}$)	País	Referencia
DEHP	9.08-16.2	1.74-182	Alemania	(Fromme y col, 2002)
DMP	<LOD-22	0.6-3		
DEP	<LOD-1.2	13.3	Portugal	(Castillo y col, 1997)
DBP	1.1-2.9	< LOD – 1.9		
BBP	0.15-0.98	< LOD – 0.76	España	(Céspedes y col, 2006)
DEHP	0-0.15	< LOD	España	(López-Jiménez y col, 2005)
DEHP	0-0.01	Na	“	“
DEP	0.059-0.389	-	“	“
DEHP	0.025-0.138	Na	España	(Zafra-Gómez y col, 2008)
DOP	0.006-0.062	-	“	“
DEP	< LOD-20.3	-	Australia	(Tan y col, 2008)
DBP	0.07	0.008	“	“
DBP	1.03	0.91	“	“
BBP	0.39	0.13	Dinamarca	(Fauser y col, 2003)
DEHP	35.4	0.96		

1.3. ANÁLISIS DE COMPUESTOS DISRUPTORES ENDOCRINOS EN EL MEDIOAMBIENTE ACUÁTICO

Para llevar a cabo un control efectivo de la calidad del agua se necesita disponer de herramientas analíticas adecuadas. La distinta naturaleza química de los EDCs (las diferentes estructuras químicas y las diversas características físico-químicas de los EDCs), las concentraciones tan diversas en las que están presentes en el medio acuático y adicionalmente, las bajas concentraciones a las que algunos EDCs presentan actividad estrogénica (ej: hormonas esteroideas a niveles de ng/L y compuestos alquilfenólicos a µg/L), junto con la variada complejidad de las matrices medioambientales, dificultan la determinación de los EDCs en el medio acuático (Petrovic y col., 2004; Locatelli y col., 2016). Por tanto, para el desarrollo de un método con éxito, son necesarios métodos eficientes de extracción y purificación o *clean up* que proporcionen un extracto más limpio sin comprometer el analito de interés, al mismo tiempo que técnicas analíticas muy sensibles y selectivas, capaces de analizar niveles bajos de los compuestos. Las metodologías multi-residuo, permiten la identificación inequívoca y la cuantificación de compuestos con distintas propiedades físico-químicas en un único análisis (Petrovic y col., 2010).

La variedad de técnicas instrumentales aplicables a su análisis es muy amplia. Dentro de las técnicas analíticas modernas para el análisis traza de EDCs, la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía de líquidos (LC) acopladas a espectrometría de masas (MS) son las técnicas de elección en el análisis de muestras medioambientales, aunque también se han descrito muchos métodos basados en técnicas biológicas (Eertmans y col., 2003, Estévez-Alberola y col., 2004, Farré y col., 2005).

1.3.1. TOMA Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS DE AGUA

La determinación de los compuestos comienza con la toma de muestras y su almacenamiento para ser transportado al laboratorio. El proceso de toma de muestras es el primer paso del proceso analítico, considerado la etapa más crítica en la determinación de compuestos orgánicos. Hildebrandt y col., describen las técnicas y procedimientos para el muestreo y conservación de la muestra para la determinación de compuestos orgánicos en las principales matrices medioambientales (agua, sedimentos y suelos) a lo largo de la cuenca de un río (Hildebrandt y col., 2006).

El diseño del plan de muestreo está ligado a los objetivos o propósitos del muestreo y a la información específica que se puede obtener. El control de la calidad durante el muestreo y en cada una de las etapas implicadas en el procedimiento analítico (transporte, conservación de la muestra, etc.) debe ser llevado a cabo cuidadosamente, para reducir la probabilidad de errores. La planificación de la toma de muestra implica varias decisiones incluyendo: (1) los puntos de muestreo, (2) la frecuencia del muestreo, (3) el tamaño o volumen de la muestra, (4) el número de muestras, (5) la selección de los dispositivos de muestreo, recipientes y sus requerimientos de limpieza y (6) el tipo de muestra (discreta, compuesta, activa (puntual o multinivel) o pasiva (difusión)).

Uno de los problemas básicos del análisis de agua es que se debe seleccionar una parte del agua de interés como representación de la misma, de modo que de los resultados del análisis de esta parte serán deducidas las características de la totalidad de la muestra. Sin embargo, el agua exhibe variaciones de calidad tanto en el espacio como en el tiempo (Liess y col., 2000). El punto de muestreo en el caso del agua debe elegirse en relación con las posibles fuentes de contaminación. Por otro lado, la calidad del agua puede

cambiar drásticamente en cuestión de minutos, horas o días y en muchas ocasiones en función de la época del año en que se tome la muestra. Teniendo en cuenta estos factores, la toma de muestra puede ser:

- puntual, es el procedimiento más simple, aunque también el menos fiable
- discontinua, cuando se toman varias muestras en un intervalo de tiempo
- continua, gracias a la ayuda de sistemas automáticos de muestreo, que generalmente suponen mayor inversión económica
- integrada, cuando la muestra es el resultado de la mezcla de varias muestras puntuales tomadas durante un periodo de tiempo (ej: 24h). Representa las características medias durante el tiempo de muestreo, de forma que disminuye el número de muestras a analizar.

Una apropiada toma de muestra, almacenamiento y preservación de la misma, son importantes para minimizar cualquier cambio físico, químico o biológico que pueda tener lugar desde la toma de muestra hasta el análisis de la muestra (Dean y col., 2014). Los principales factores que afectan a las muestras incluyen contaminación por lixiviación del recipiente, adsorción del analito en la superficie del recipiente, oxidación y descomposición de los compuestos fotoquímica y por la acción de microorganismos. Es imposible eliminar completamente los factores que afectan a la contaminación de la muestra, pero pueden minimizarse sus efectos (Dean y col., 2014) refrigerándolas a una temperatura determinada inmediatamente, seleccionando un recipiente apropiado y añadiendo conservantes a las muestras (Omar y col., 2016). Para el análisis de compuestos orgánicos, se recomienda utilizar recipientes de cristal para contener las muestras. La botella se usa de color ámbar para evitar la posible fotodegradación de los analitos a determinar, y el tapón de teflón para evitar la contaminación por materiales plásticos (ftalatos). El recipiente debe estar limpio

Tras la toma de muestras, éstas deben conservarse a 4 °C para evitar un cambio en sus características y composición a causa de diversos factores que incluyen: contaminación, pérdida de las sustancias de la muestra a consecuencia de procesos biológicos, hidrólisis o evaporación de las mismas y adsorción en las paredes de las botellas. Para ello, se procede a preservar la muestra. Algunos métodos de preservación de muestra convencionales incluyen la adición de compuestos como el formaldehído (1% v/v) (Bárber y col., 2000), tolueno, cloroformo, cloruro de mercurio, acidificación con ácido sulfúrico, ácido ascórbico, hidrocórico, fosforito, etc (López de Alda, JCA, 2000) o azida de sodio, que inhiben o retardan el crecimiento bacteriano y la degradación de los compuestos orgánicos. En el caso de sospechar que las muestras pueden contener cloro residual, también se recomienda adicionar tiosulfato sódico (inmediatamente después de la toma de muestra) para prevenir la reacción de éste con compuestos conteniendo grupos fenólicos, como es el caso de los estrógenos (Lee y col., 2004). También se pueden aplicar métodos físicos de preservación como la esterilización con radiación y la disminución de la temperatura, generalmente hasta los 4°C. Este último método es el más empleado ya que resulta muy simple y económico. En la mayoría de los casos es preferible, sin embargo, preconcentrar la muestra tan pronto como sea posible (por ejemplo, en cartuchos de extracción en fase sólida (SPE)) y conservarla de esta manera, ya que según se ha visto, muchos compuestos permanecen estables (Ferrer y col., 1997, Aguilar y col., 1999, Alonso y col., 2000) una vez extraídos en el sorbente.

La obtención de muestras representativas es un requerimiento importante, más difícil y problemático cuando se trabaja con matrices no homogéneas, como por ejemplo aguas residuales. Se toman muestras sólidas (ej. fangos) cuando se determina el comportamiento de contaminantes hidrofóbicos asociados a los sólidos, y éstos pueden preservarse congelándose (Moreda y col., 1998).

1.3.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS DE (PRE)TRATAMIENTO Y EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS

En la figura 1.3.1., se esquematizan las etapas del proceso analítico para la determinación de compuestos disruptores endocrinos en muestras ambientales.

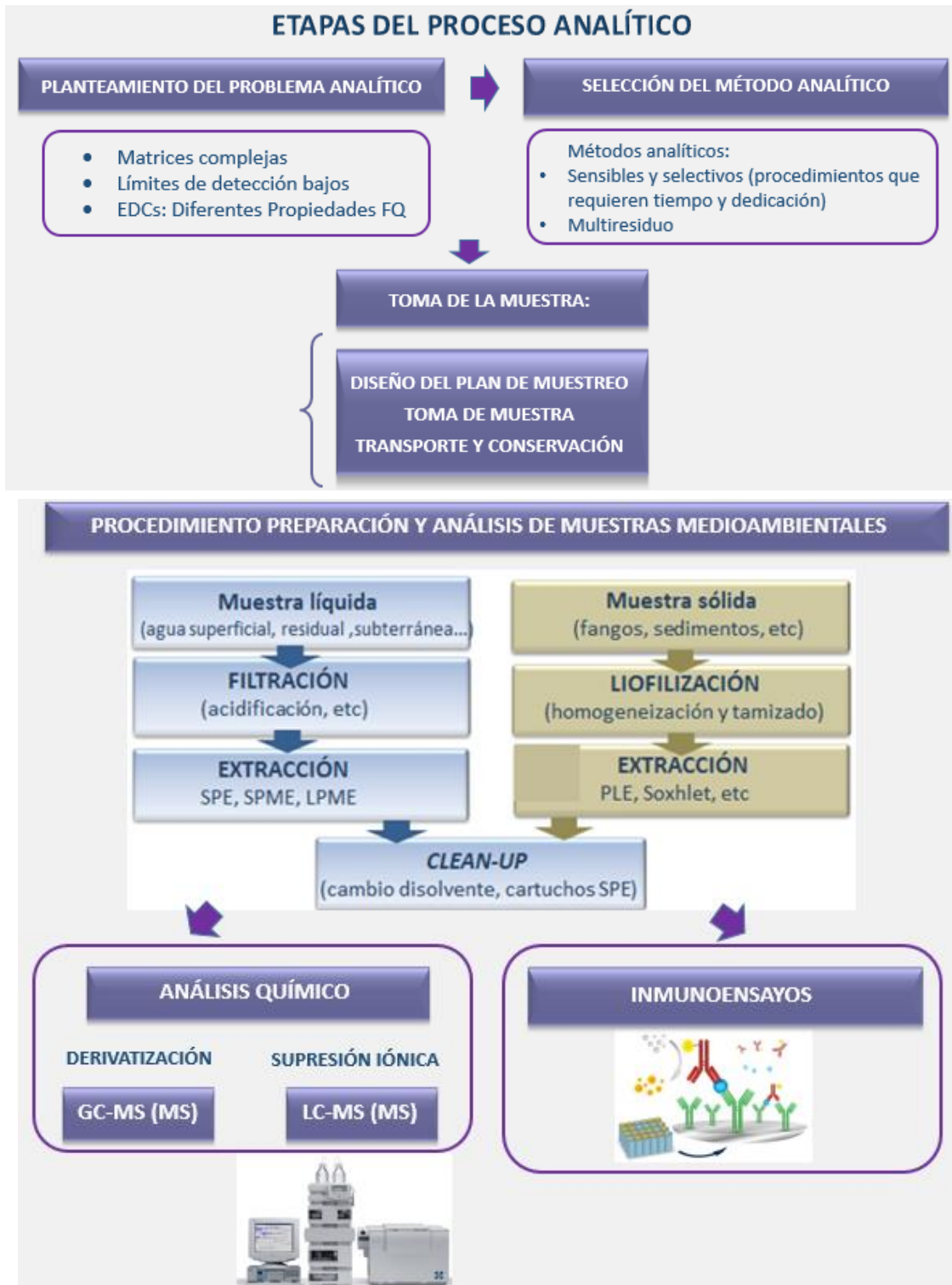


Figura 1.3.1. Esquema de las etapas del proceso analítico, toma de muestras, los tipos de tratamiento de la muestra y análisis de muestras medioambientales. (EDCs: Compuestos disruptores Endocrinos)

Los procesos de extracción, preconcentración y *clean-up* son los más críticos en la preparación de las muestras para mejorar los LOQs (López de Alda y col., 2001). Por tanto, el desarrollo y aplicación de un

método adecuado para llevar a cabo estas etapas es fundamental para el éxito del método analítico. Se necesitan técnicas de extracciones efectivas, sensibles, con alta recuperación y reproducibilidad, robustas y fiables, para lo cual se han desarrollado metodologías rápidas, sencillas y con el mínimo uso posible de disolvente.

Por tanto, el pretratamiento de la muestra comprende diversos aspectos que pueden realizarse en varios pasos o simultáneamente en un solo paso:

- concentrar los compuestos a analizar, los cuales se encuentran normalmente a nivel traza en las muestras, hasta concentraciones detectables por las correspondientes técnicas analíticas;
- purificar la muestra o separar los analitos de la matriz, eliminando el máximo número de compuestos interferentes presentes en la matriz de la muestra, para evitar que puedan afectar en la determinación de los compuestos objeto de estudio, maximizando así sus recuperaciones,
- llevar a cabo un cambio de disolvente para adaptar la muestra al sistema de detección instrumental.

La selección del método de extracción y pre-concentración de microcontaminantes orgánicos dependerá de las propiedades físico-químicas de los compuestos a determinar, como por ejemplo su volatilidad, polaridad, estabilidad y solubilidad (Sosa Ferrera y col., 2013), la complejidad de las matrices y los niveles en el medioambiente. Los compuestos disruptores endocrinos estudiados en esta tesis presentan un amplio rango de polaridades y propiedades físico-químicas.

Shing y col., han publicado un estudio en el que revisan los métodos de preparación de muestras para la determinación de EDCs, enfocando en los métodos más actuales que permiten obtener mejores valores de recuperación y límites de detección (ng/mL o ng/g) (Shing y col., 2014). Resaltan la importancia de la selectividad de las técnicas de extracción y concluyen que es necesario establecer métodos selectivos, sensibles, exactos y robustos, para identificar y cuantificar los compuestos disruptores endocrinos.

La filtración y la centrifugación son las técnicas de pre-tratamiento más utilizadas. La filtración puede realizarse durante el muestreo, la extracción o en otra etapa (Locatelli y col., 2016). El nylon y la fibra de vidrio con un tamaño de poro entre 0,22 y 1,2 μm , son los materiales más utilizados en los filtros (Clara y col., 2004; Céspedes y col., 2005; Ying y col., 2005; Liu y col., 2011). Generalmente se utilizan filtros con un tamaño de poro superior a medida que aumenta la complejidad de las muestras, siendo los de 0.45 μm los más utilizados en aguas superficiales, 0.7 μm para efluentes de depuradoras y 1.2 μm para aguas residuales de entrada a las EDARs. La filtración suele ser necesaria cuando se realiza la extracción en fase sólida (SPE), para evitar la obturación del cartucho debido a la presencia de sólidos en suspensión y cuando el análisis a realizar es un ensayo inmunoquímico, para evitar una adsorción de los anticuerpos no deseada (Brischiu y col., 2009). Sin embargo, varios estudios han puesto de manifiesto la retención de estrógenos y xenoestrógenos en los filtros (Desbrow y col., 1998; Álvarez y col., 2004) y algunos de ellos han confirmado la actividad estrogénica de los filtros (Desbrow y col., 1998; Céspedes y col., 2008), por lo cual la ultrasonificación o el lavado de los filtros con disolventes orgánicos, como 3-10 mL de metanol, se ha convertido en un procedimiento habitual de los analistas para llevar a cabo el estudio de los EDCs asociados al material particulado retenido en los filtros (Johnson y col., 2000; Baronti y col., 2000; Laganà y col., 2000).

Las técnicas y metodologías de extracción y preconcentración han sufrido una sustitución progresiva de las técnicas clásicas por técnicas avanzadas que mejoran la eficiencia de extracción, reducen el volumen de disolventes requeridos, y disminuyen el tiempo de análisis. A continuación, se describen las técnicas de extracción más avanzadas y/o más utilizadas para la determinación de EDCs en matrices ambientales, diferenciando entre las técnicas aplicadas a las muestras líquidas y a las sólidas. En esta tesis nos centraremos en las técnicas desarrolladas para muestras acuosas.

1.3.2.1. Extracción de EDCs de muestras líquidas

Los métodos más habituales para la extracción de los analitos en muestras acuosas son la clásica extracción líquido-líquido (LLE), la extracción en fase sólida (SPE, *Solid Phase Extraction*) y la microextracción en fase sólida (SPME, *Solid phase microextraction*). Cada vez hay una mayor tendencia a sustituir las técnicas clásicas por otras verdes respetuosas con el medioambiente, que generalmente se llaman técnicas de microextracción sólido-líquido (SLME) y líquido-líquido (LLME), con un consumo bastante inferior de disolventes (Salgueiro-González y col., 2017). Otros métodos de extracción son la microextracción con disolvente (SME, *Solvent microextraction*), la microextracción sobre una gota (SDME, *Single drop microextraction*) y la extracción por Sorción en barra agitadora (*Stir-bar* o SBSE).

Extracción líquido-líquido (LLE, *Liquid Liquid Extraction*). La LLE es una de las técnicas de extracción de muestras más antigua. Es un método muy útil para aislar los componentes de una mezcla por su simplicidad y rapidez (Dimpe y col., 2016) y se ha utilizado sobre todo cuando la técnica posterior de separación es la GC (Helale-Murad y col., 2001; Vélchez y col., 2001; Shin y col., 2001; Jin y col., 2004), ya que permite realizar la derivatización al mismo tiempo que la extracción y pre-concentrar volúmenes de muestra más grandes (Ferguson y col., 2000). Depende de la diferencia de solubilidad del compuesto a extraer en dos disolventes inmiscibles, siendo el diclorometano (DCM) el disolvente utilizado en la mayoría de casos para llevar a cabo las extracciones. Sin embargo, es una técnica que tiene varias limitaciones que hacen que cada vez sea menos utilizada: requiere un consumo elevado de disolventes orgánicos, así como una etapa de concentración de los analitos adicional, produciendo una gran cantidad de residuos tóxicos (Chang y col., 2009; Locatelli y col., 2016). Además, en el caso de la extracción de compuestos orgánicos polares no resulta muy eficiente. Se ha aplicado por ejemplo para la determinación de APs y BPA en muestras de agua (Amiridou y col., 2011), y de ftalatos mediante GC-MS (Fierens y col., 2012).

Para solucionar estos problemas, así como reducir el tiempo de análisis y consumo de disolventes, se han desarrollado otras técnicas como la SME, la SDME y la DLLME (LLE dispersiva), que sustituyen la clásica LLE. SDME es una de las formas de *clean up* y preconcentración de la muestra a micro-escala más simples, económica, rápida y que requiere muy poco disolvente (Psillakis y col., 2002; Lambropoulou y col., 2004 y 2007; Xu y col., 2007; Chang y col., 2009; Jeannot y col., 2010). La DLLME constituye actualmente la técnica de microextracción líquida (LLME) más utilizada por su bajo coste, corto tiempo de extracción, sencillez y altos factores de enriquecimiento (Salgueiro-González y col., 2017). La extracción de los analitos se realiza en una dispersión del solvente de extracción en agua (Singh y col., 2015). DLLME ha sido utilizada para la extracción de APs, APEOs y BPA (Luo y col., 2010; Sung y col., 2014; Shih y col., 2015) y estrógenos (D'Orazio y col., 2014).

Extracción en fase sólida (SPE, Solid Phase Extraction). Es una técnica de pretratamiento de la muestra ampliamente utilizada para la extracción y pre-concentración de contaminantes orgánicos y determinación de EDCs en muestras de agua. Consiste en la interacción y retención por parte de una matriz sólida de los analitos que se hallan inicialmente en una fase líquida, que quedan retenidos en la fase sólida por acción de interacciones hidrofóbicas, a través de puente de hidrógeno y intercambio iónico, en función del tipo de relleno:

La SPE ha ido ganando popularidad hasta convertirse en la técnica más utilizada para la extracción de compuestos orgánicos de muestras acuosas, gracias al poco volumen de disolvente empleado, la rapidez, la capacidad de automatización, acoplamiento con técnicas cromatográficas y su versatilidad para retener diferentes grupos de contaminantes. Sin embargo, puede ser laboriosa y comportar bastante tiempo por los elevados volúmenes de agua a pre-concentrar para alcanzar los LODs necesarios, lo cual complica el muestreo, el transporte y el almacenamiento de las muestras (Salgueiro-González y col., 2017), así como la presencia de interferencias típicamente presentes a concentraciones superiores a los analitos de interés en matrices como aguas residuales, que se extraen con los analitos.

Los disolventes de elución que se utilizan principalmente son metanol (MeOH), acetona, diclorometano (DCM) o mezclas de estos. Debido al gran número de muestras a analizar en los laboratorios donde se llevan a cabo monitorizaciones, se han desarrollado métodos que utilizan la SPE automatizada a través de unidades especiales de preparación de la muestra (Petrovic y col., 2001; Kuklenyik y col., 2003; López-Roldán y col., 2004). Estas unidades permiten tanto la automatización de la SPE *off-line* como el acoplamiento en línea de la SPE a la HPLC, pudiendo incluso automatizar la derivatización, sobretodo cuando se lleva a cabo en el mismo sorbente de extracción (Kuklenyik y col., 2003).

Existe una gran variedad de fases que se emplean como material sorbente en columnas o discos de SPE en análisis medioambiental (Buszewski y col., 2012). Los utilizados mayoritariamente han sido los de base sílice enlazada en fase reversa con grupos C₁₈ (Mol y col., 2000; Petrovic y Barceló, 2001, Petrovic y col., 2002), los poliméricos (Mol y col., 2000; Kuch y col., 2001), los poliméricos altamente entrecruzados (Kuch y col., 2001; Laganá y col., 2004) y los sorbentes hidrofílicos (Fontanals y col., 2005; Fontanals y col., 2007). En algún caso también se ha utilizado el carbón (Ding y Wu., 2000) o incluso nanotubos de carbón negro grafitizado (*multiwalled carbon nanotubes*, MWNTs) (Cai y col., 2003). La combinación de dos tipos de cartuchos puede incrementar la selectividad (Locatelli y col., 2016). Los sorbentes se agrupan en:

(1) Sílices químicamente enlazadas a fases orgánicas como las cadenas C₈ y C₁₈ (octadecil-sílice, “C18-bonded silica”). Son sorbentes hidrofóbicos apropiados para la retención de analitos de polaridad media (apolares y poco polares). Los adsorbentes en fase inversa más utilizados en la SPE en muestras acuosas han sido los C₁₈, no obstante, presentan rendimientos bajos de extracción para compuestos más polares y solubles en agua.

(2) Adsorbentes tipo polimérico: por ejemplo, el copolímero estireno-divinil-benzeno (SDB y PS-DVB), que se emplea para compuestos moderadamente polares y es más estable a diferentes pH y resinas poliméricas modificadas químicamente con grupos funcionales (más específicos para el analito). Estos adsorbentes (SDB, Oasis), poco selectivos, han sido ampliamente utilizados, especialmente para la extracción de pesticidas más polares o los productos de degradación, por su mayor capacidad de interacción hidrofóbica. Los sorbentes poliméricos hidrofóbicos son los más adecuados, debido a su amplio rango de características físico-químicas y a su gran estabilidad química (Fontanals y col., 2007). Su mecanismo de retención se basa, adicionalmente a las interacciones de Van der Waals, en interacciones π - π entre los analitos y los anillos aromáticos de la estructura del sorbente. Por tanto, los volúmenes de ruptura serán

mayores que los obtenidos al utilizar sorbentes C₁₈ (Vega Morales y col., 2009). El Oasis HLB, es uno de los más utilizados para la extracción de compuestos orgánicos (Jahnke y col., 2004; Benijts y col., 2004; Beck y col., 2005; Loos y col., 2007; Guitart y col., 2010; Iparraguirre y col., 2012). Su versatilidad y eficiencia es atribuida al balance hidrofílico-lipofílico del copolímero del relleno HLB, capaz de proporcionar recuperaciones altas y reproducibles para compuestos ácidos, básicos y neutros, incluso si el cartucho se seca (Omar y col., 2016). Dado el tipo de estudio a realizar en esta tesis, con una gran variedad de compuestos EDCs de diferente polaridad, se optó por utilizar los cartuchos OasisTM HLB. En un estudio realizado por Laganá y col., para la determinación en muestras de agua de estrógenos, BPA y APs entre otros EDCs, se utilizaron cartuchos HLB y Carbograp-4 (Laganá y col., 2004).

(3) Adsorbentes de intercambio aniónico o catiónico, basados en carbono negro grafitizado poroso (GCB, *Graphitized carbon black*), especialmente recomendados para compuestos polares, aunque en algunos casos presentan problemas de adsorción irreversible, etc. El carbono es un sorbente no poroso, por lo que los cartuchos con este sorbente tienen una alta resistencia al flujo de agua, obteniendo una extracción más lenta que con otros materiales. Otra limitación es que los polímeros GCB permiten una extracción menos selectiva que los DVB (Loyo-Rosales y col., 2007), por lo cual los extractos obtenidos tendrán más compuestos interferentes, afectando a la cuantificación con MS mediante la supresión iónica o el efecto matriz. Sin embargo, varios estudios que utilizan los sorbentes GCB muestran buenas recuperaciones, especialmente para compuestos altamente etoxilados (Ding y col., 2000; Shao y col., 2002).

Extracción en fase sólida para la determinación de compuestos disruptores endocrinos:

La SPE es la técnica más utilizada para la extracción de EDCs en muestras acuosas por las numerosas ventajas anteriormente descritas. En los análisis multiresiduo, la mayor dificultad en general es la selección de las condiciones experimentales para la extracción. Algunos tipos de adsorbentes y disolventes utilizados en estudios para analizar EDCs se describen en la tabla 1.3.1. donde se puede observar por ejemplo los diferentes LODs que se obtienen con los mismos cartuchos (cartuchos Oasis y HLB) al modificar los disolventes y las condiciones de las distintas etapas de la SPE, acondicionamiento, lavado y elución

Tabla 1.3.1. Resumen de los cartuchos SPE y disolventes utilizados para la determinación de EDCs en diversos estudios (Hernando y col., 2004; Stuart y col., 2005 y Gatidou y col., 2007), adaptado de (Chang y col., 2009):

Fase sólida: Cartuchos SPE	Acondicionamiento	Lavado	Elución	Columna CG	LOD (ng/L)
C ₁₈ Sep-Pac [®] Cartucho Oasis HLB [®] Envi-Chrom P [®] Isolute ENV+ [®]	Metanol, agua Milli Q	Agua Milli Q	Diclorometano-hexano (4:1)	DB-5 MS	0,03-410
Cartucho Oasis HLB [®]	Etil acetato, metanol, agua Milli Q	Metanol: Agua (5:95)	Etil acetato	HP-5 MS	26,5
Envi-Chrom P [®]	Desconocido	Agua destilada	Acetona	HP-1	26,5

Dos técnicas de extracción que proporcionan una mejora en la sensibilidad comparadas a los procedimientos de extracción tradicionales son (Sampedro y col., 2009):

Microextracción en fase sólida (SPME, Solid Phase Micro Extraction). Desarrollada en 1990, la SPME es una técnica de extracción muy eficiente y utilizada en el análisis medioambiental, reduce el tiempo necesario para la preparación de la muestra, el consumo de disolventes y el coste de adquisición, previene las obstrucciones que se pueden producir en la SPE, ofrece una rápida transferencia de masa durante la extracción y la desorción y permite la automatización y acoplamiento a otras técnicas de análisis, especialmente la GC y mejora los límites de detección (Vidal y col., 2005; Coelho y col., 2008). Sin embargo, no permite la conservación de las muestras una vez extraídas, por lo cual éstas deben analizarse rápidamente, y algunas fibras tienen coste elevado y vida limitada (Haberhauer y col., 2000). La SPME se ha utilizado para la determinación de compuestos estrogénicos en muestras acuosas (Peñalver y col., 2002), NP, y NP₁EO y NP₂EO (Helaleh y col., 2001; Díaz y col., 2002), BPA y sus derivados (Salafranca y col., 1999; Nerín y col., 2002), la comparación de diferentes tipos de fibras SPME para la determinación de APs (Cai y col., 2004), para determinar plaguicidas prioritarios (Lambropoulou y col., 2002) y para el análisis de ftalatos en aguas por su simplicidad (Peñalver y col., 2000; Polo y col., 2005).

Extracción por sorción en barra agitadora (Stir-bar o SBSE, Stir Bar Sorptive Extraction). Esta técnica fue desarrollada en 1999 (Baltussen y col., 1999). y tiene una mayor superficie de extracción que la SPME, permitiendo una mayor sensibilidad y recuperaciones más altas. La barra magnética o *Stir-bar*, llamado comercialmente *Twister*, puede estar recubierta por distintos tipos de sorbentes, siendo los poliméricos los más utilizados, como por ejemplo el polidimetilsiloxano (PDMS) (Bicchi y col., 2005), que permite disminuir los LODs respecto a la SPME; al nivel de sub-ng/L (Baltussen y col., 1999). SBSE es la técnica con menor manipulación y uso de disolventes (García-Falcon y col., 2004; Kruger y col., 2011 (Nogueira y col., 2015). Sin embargo, sus principales limitaciones son la poca variedad de sorbentes disponibles, los fuertes efectos matriz y la necesidad de controlar las condiciones de extracción (Nogueira y col., 2012). SBSE se utiliza principalmente para la determinación de compuestos semivolátiles en muestras acuosas (Brossa y col., 2005). Se ha aplicado para la extracción de estrógenos, BPA y APs (Kawaguchi y col., 2004), ftalatos (Tan y col., 2008), APs, BPA y ftalatos juntos (Aparicio y col., 2017) y otros EDCs (Peñalver y col., 2003). Se han publicado diversas revisiones evaluando la SBSE (Camino-Sánchez y col., 2014; Nogueira y col., 2015).

Métodos de SPE avanzados:

Dentro de la SPE, se han desarrollado otro tipo de sorbentes o métodos de extracción alternativos que se caracterizan sobre todo por una mayor especificidad.

Inmunosorbentes (IC, Inmuno Chromatography). Se establece la interacción antígeno-anticuerpo entre los anticuerpos inmovilizados en el soporte sólido y los compuestos orgánicos en la muestra o fase acuosa, de forma específica y reversible. De este modo, los compuestos orgánicos quedan retenidos en el inmunosorbente preconcentran y extraen específicamente. (Delaunay y col., 2000). Se han empleado inmunosorbentes en el análisis de estradiol y estrona en aguas residuales (Ferguson y col., 2001) y superficiales (Huang y col., 2001), en la determinación de plaguicidas como las fenilureas (Ferrer y col., 1997) y las triazinas (Bou Carrasco y col., 2001) y en la del bisfenol A (Zhao y col., 2002).

Polímeros de huella molecular o MIPs (*Molecular Imprinted Polimers*). Se obtienen creando una matriz tridimensional polimérica que contiene unas vacantes de reconocimiento específico en cuanto a forma y grupos funcionales implicados en el reconocimiento para los analitos u otras estructuras similares (Hogendoorn y col., 2000). La principal ventaja frente a los inmunosorbentes es su gran estabilidad térmica y química: presentan tiempos de vida largos sin requerimientos especiales de conservación (Andersson y col., 2000). Acoplado MIP con SPE se pueden superar los problemas de falta de selectividad y baja recuperación del analito (Singh y col., 2015). Los MIPs se han utilizado para la determinación de plaguicidas (Hogendoorn y col., 2000, Ferrer y col., 1999), incluidas las triazinas (Koeber y col., 2001), bisfenol A (Watabe y col., 2004; Takeda y col., 2005), estrona (Wang y col., 2008), NP y NPEOs (Nuñez y col., 2008) en muestras acuosas ambientales.

La inmunocromatografía y los MIPs permiten una selectividad excepcional al proceso de purificación que simplifica enormemente el análisis posterior por técnicas cromatográficas o espectroscópicas, aumenta drásticamente la sensibilidad del método, permite el acoplamiento *on-line* en procedimientos automatizados y comporta bajo coste por la reutilización de los cartuchos.

Materiales de acceso restringido (RAM, *Restricted Access Materials*). Presentan un gran interés en la extracción/purificación de muestras ambientales, particularmente cuando se utilizan en modo *on-line* (Boos y col., 2001). Sin embargo, los RAM no han sido muy utilizados en el análisis de agua.

Extracción de los EDCs estudiados en muestras líquidas:

A continuación, se describen las técnicas de extracción de muestras líquidas para cada una de las familias de EDCs estudiadas:

Hormonas esteroideas: En función de la técnica instrumental de análisis, la determinación de hormonas esteroideas a niveles traza puede requerir grandes volúmenes de muestra que permiten alcanzar los elevados factores de preconcentración, necesarios para aislar los analitos de la matriz y llegar a límites de detección inferiores a 1 ng/L. Es común encontrar en la bibliografía muestras de 1 L, y algunos estudios incluso han descrito superiores a los 20 L (Belfroid y col., 1999; Gomes y col., 2003). En el pre-tratamiento de las muestras líquidas, la filtración constituye un proceso esencial, necesaria cuando se realiza la extracción mediante SPE (Brisciu y col., 2009). Cada vez es más habitual el estudio de EDCs asociados al material particulado de los filtros, aunque diversos autores defienden que los estrógenos no se quedan retenidos en los filtros (López de Alda y col., 2001; Huang y col. 2001).

La SPE es la técnica más utilizada para la extracción de estrógenos y progestágenos mayoritariamente en el formato de cartuchos. Dentro de la amplia gama de adsorbentes comercialmente disponibles, los más empleados para SPE son C₁₈ y HLB (Hu y col., 2003; Writer y col., 2011). Los rellenos convencionales del tipo C₁₈ son los más ampliamente utilizados para la extracción de hormonas (Seifert y col., 1999; Petrovic y col., 2002) y se han obtenido recuperaciones en el rango 83-114% con cartuchos C₁₈ en agua (mineral, del grifo, superficial y subterránea) (Pérez y col., 2014), aunque algunos autores se han decantado por el empleo de carbón activo (Baronti y col., 2000; Petrovic y col., 2002; López de Alda y col., 2003) o adsorbentes poliméricos basados en SDB (Belfroid y col., 1999; Masunaga y col., 2000; López de Alda y col., 2000). El Oasis HLB es el cartucho más utilizado para la extracción de contaminantes orgánicos y en particular los

estrogénicos (Ascengo y col., 2002; Labadie y col., 2005; Brisciu y col., 2009). Otros tipos, como el Envi+ o C₁₈ dan resultados adecuados (Laganá y col., 2000; Majima y col., 2002; Conroy y col., 2007), y pueden superar el 94,6% de recuperación (Petrie y col., 2016). Liu y col., obtuvieron resultados similares, con recuperaciones durante la extracción mucho más alta con discos Oasis HLB (97,56-114,40%) que con C₁₈ (41,22-66,76%) (Liu y col., 2015). Combinando dos cartuchos, puede aumentarse la selectividad (Holbrook y col., 2004). Algunos autores también han utilizado la SPE *on-line* (Rodríguez-Mozaz y col., 2004; Kuster y col., 2008). También se ha utilizado otras técnicas de extracción de estrógenos en aguas como la SBSE (Kawaguchi y col., 2004; Hu y col., 2013; Xu y col., 2014) y la DLLME (D’Orazio y col., 2014). En la tabla 1.3.2. se incluyen algunos estudios de extracción de estrógenos mediante SPE, SPE *on-line*, SBSE y DLLME, y se observan las buenas recuperaciones obtenidas.

Tabla 1.3.2. Métodos para la extracción de hormonas esteroideas en **muestras líquidas**. Adaptado y actualizado de (Czarny y col., 2017).

Técnica Extracción	Matriz muestra	Volumen	Disolvente Extracción	Estrógeno	Recuperaciones %	Ref.
SPE	Agua residual	250	Metanol	E1 E2 EE2 E3	85.0 106.0 100.0 110.0	Perez y col., 2014
m-SPE	Agua superficial	20	Metanol/ acetonitrilo	E1 E2 E3 E1 E2 E3	118.0 (3.8) 89.1 (2.7) 74.1 (1.5) 109.0 (10.0) 80.6 (6.4) 69.6 (5.6)	Huang y col., 2015
SPE On- line		50	Agua, Acetonitrilo	E1 E2 EE2 E3	100.8 ± 7.1 (3.0) 105.0 ± 11.7 (9.4) 117.1 ± 9.4 (3.1) 102.9 ± 7.6 (1.8)	Guo y col., 2013
SPE On- line	Agua residual	2	Agua con 0.1% v/v	E1 E2 E3	75.1 (15.1) 88.8 (26.4) 76.8 (5.2)	Guedes-Alonso y col.,2015
SBSE	Agua río	10	-	E1 E2 EE2	89.1 (5.8) 94.6 (4.5) 108.5 (7.0)	Hu y col., 2013
SBSE	Agua lago	15	Agua/tolueno	E1 E2	77.3 (4.3) 84.6 (4.3)	Xu y col., 2014
DLLME	Agua residual	7.5	Cloroformo	E1 E2 EE2 E3	74.0 (8.0) 56.0 (15.0) 57.0 (18.0) 68.0 (10.0)	D’Orazio y col., 2014
DLLME	Agua residual	10	IL (PPIIm)(PF6)	E2 EE2 E3	94.0 (1.0) 95.0 (0.8) 86.0 (2.0)	Socas-Rodríguez y col.,2014

Compuestos alquilfenólicos: La técnica que se considera más apropiada para la preconcentración de APs y APEOs en muestras acuosas es la SPE, debido a la selectividad y porcentajes de recuperación obtenidos y al bajo tiempo de análisis. Conforme a la revisión bibliográfica de Lee y col., la LLE ha sido utilizada para la determinación de NPEOs y sus derivados (Lee y col., 1999), pero debido a las importantes limitaciones que presentan estas técnicas para los APEOs con cadenas etoxiladas más largas, así como al alto consumo de disolvente y mayor tiempo de extracción que emplea, el uso de LLE se ha limitado a al análisis de rutina y protocolos estandarizados Actualmente ha sido reemplazada por la SPE (Ferguson y col., 2000; Ding y col., 2000; Petrovic y col., 2001; Jeannot y col., 2002; Rice y col., 2003; Laganá y col., 2004) y otras técnicas de micro extracción como la SPME (Helaleh y col., 2001; Díaz y col., 2002; Zwiener y col., 2004; Huang y col., 2005; Pan y col., 2008; Liu y col., 2008), que se utilizan con espacio de cabeza seguida de GC-MS (Helaleh y col., 2001; Díaz y col., 2002), o acoplado a GC o LC-(SPME *in-tube*) (Zwiener y col., 2004). Otros métodos están basados en la *Single drop microextraction* SDME (López-Blanco y col., 2003) y técnicas LLME que emplean menos de 200 μ L de disolventes de extracción (Fiamegos y col., 2007; Lin y col., 2011), siendo la DLLME la más utilizada actualmente para la extracción de APs y BPA (López-Darias y col., 2010; Luo y col., 2010; Salgueiro-González y col., 2012; Sung y col., 2014; Shih y col., 2015). También se ha utilizado la SDME y técnicas de extracción por membranas (*microporous membrane liquid-liquid extraction*, MMLLE) (Liu y col., 2003), para la extracción de APs, APEOs y BPA (Liu y col., 2003; Iparraguirre y col., 2012; Salgueiro-González 2013; Cavalheiro y col., 2014), que tienen las ventajas que se necesita poco solvente orgánico, se puede automatizar y pueden conseguir la separación de los APEOs de cadena larga de los de cadena corta (Liu y col., 2003).

Para extraer y fraccionar los APEOs y sus derivados neutros y ácidos a la vez, a menudo se utiliza un procedimiento secuencial de SPE, con dos cartuchos de diferentes sorbentes conectados en serie, por ejemplo, una sílice enlazada con grupos alquil y un sorbente polimérico (Castillo y col., 1999; Bolz y col., 2000) o se utiliza una elución selectiva con solventes de diferentes polaridades (Evgenidou, y col., 2002). De todas formas, el fraccionamiento y separación de grupos depende de la matriz y en el caso de muestras complejas, como las aguas residuales, a menudo no es posible un fraccionamiento completo. Pero los extractos que se obtienen de estas SPE secuenciales son más limpios y presentan menos interferencias. Este efecto de la matriz se ha de tener en cuenta sobre todo cuando después de la técnica de pretratamiento se utiliza la HPLC-MS(MS) para la determinación de los analitos. Por eso, se han desarrollado técnicas que facilitan la manipulación de la muestra como son la SPE en línea o adsorbentes más selectivos, como por ejemplo los MIPs para la determinación de APs (Nuñez y col., 2008).

Respecto a los adsorbentes utilizados en la SPE de APs y APEOs, básicamente pueden considerarse los tres tipos básicos: los basados en sílica (*silica based*), en polímeros (*polymer-based*), especialmente el PSDB, y los basados en carbono (*carbón-based*) (Vega Morales y col., 2009).

(1) De entre los de fase inversa no polares con base sílica, el más utilizado ha sido el de octadecilsilano (C_{18}). La retención de APEOs en los cartuchos C_{18} es principalmente debida a interacciones de Van Der Waals no polares entre los analitos y el sorbente (Vega Morales y col., 2009). Presentan buenas recuperaciones (Ferguson y col., 2000), con una eficiencia de extracción en aguas residuales superior al 80% (Petrovic y col., 2001, Petrovic y col., 2001, Jeannot y col., 2002), aunque muestran bajas recuperaciones para otros compuestos del orden de 69% y 95% para el NP y el NP₁₀EO y entre 62 y 98% para APs, APEOs y APECs (Jonkers y col.,2001; Koh y col., 2008).

(2) Los adsorbentes poliméricos, como por ejemplo Isolute ENV o Lichrolut EN permiten obtener recuperaciones similares a los sorbentes C₁₈ (Loyo-Rosales y col., 2003; Loyo-Rosales y col., 2007) con recuperaciones elevadas (Kuch y col., 2001; Jeannot y col., 2002; Rice y col., 2003; Benjits y col., 2004; Laganá y col., 2004). Para solventar la pérdida de retención de los compuestos más polares, se han estudiado otros sorbentes poliméricos hidrofílicos, que permiten obtener mejores recuperaciones de la fracción "soluble" (EO > 5 unidades) de oligómeros de APEOs y metabolitos ácidos (Vega Morales y col., 2009). Así, Loos y col., (2007) utilizaron cartuchos Oasis HLB (Waters, Milford, MA, USA) de PVP-DVB, para el *clean-up* y extracción de APs, sus etoxilados y sus carboxilados más polares, obteniendo unas recuperaciones entre 50-90%, con valores cercanos al 50% para los compuestos más hidrofóbicos (NP y OP) y las recuperaciones más altas para los oligómeros de cadena larga y los derivados carboxilados (Loos y col., 2007). En otro estudio, Janke y col., obtuvieron buenas recuperaciones con los cartuchos Oasis HLB especialmente para los compuestos carboxilados (99-110%), pero fueron menores para los compuestos hidrofóbicos, siendo claramente inferiores para el NP y sus etoxilados, con valores < 70% (Janke y col., 2004). OP y OP₁₋₂EO presentaron mejores recuperaciones que sus isómeros nonil, indicando la influencia predominante de la longitud de la cadena en la extracción (Ying y col., 2002). Por tanto, una desventaja de este tipo de adsorbentes son las inferiores recuperaciones que se obtienen con los cartuchos Oasis HLB para el NP, por la gran importancia de la determinación de éste EDC debido a su potencial endocrino, sin embargo, las altas recuperaciones obtenidas para los analitos más polares ofrecen nuevas perspectivas para cubrir un amplio rango de compuestos etoxilados (Vega Morales y col., 2009). En otro estudio, Liu y col., (2004) comparan diferentes adsorbentes para la extracción del 4-t-OP y del 4-NP: obteniendo únicamente buenas recuperaciones de 4-NP, superiores al 80%, utilizando un cartucho de C₁₈ (Isolute C₁₈/ENV+, 400 mg), mientras que para el 4 t-OP solamente se obtienen recuperaciones superiores al 60% utilizando adsorbentes poliméricos como el Oasis HLB (200 mg) o el DPA-6S (500mg) (Liu y col., 2004). Ying y col., obtienen en cambio mejores recuperaciones tanto para el 4-t-OP como para el NP con la SPE acoplada en línea a la HPLC cuando utilizan adsorbentes poliméricos (PLRP-s y PRP-1) que con el C₁₈ (Ying y col., 1999).

(3) Por último, los de carbono negro grafitizado (GCB) constituyen el tercer tipo de adsorbentes utilizados normalmente en la SPE de APEOs. Presentan algunas limitaciones, como extracción más lenta que con otros materiales y menos selectiva que los polímeros DVB (Loyo-Rosales y col., 2007), pudiendo presentar supresión iónica o efecto matriz en la cuantificación con MS, pero con buenas recuperaciones, especialmente para compuestos altamente etoxilados, conforme a varios estudios (Crescenzi y col., 1995; Ding y col., 2000; Houde y col., 2002; Shao y col., 2002).

También se han aplicado como sorbentes para la SPE los nanotubos con múltiples capas de carbono en sus paredes (MWNTs), como el estudio de. Cai y col., que lo utilizaron para la determinación de APs y BPA y lo compararon con un sorbente C₁₈ (500 mg), obteniendo recuperaciones similares para el 4-t-OP y 4-NP con los dos sorbentes y superiores al 90% preconcentrando hasta 1000 mL de muestra (Cai y col., 2004)

Adicionalmente, se ha utilizado otras técnicas como la SBSE para la extracción de NP (Sánchez-Ávila y col., 2010), APs Y BPA (Nakamura y col., 2004; Kawaguchi y col., 2004 y 2005; Aparicio y col., 2017). En la tabla 1.3.3. se resumen algunos métodos de pre-tratamiento, extracción y técnica análisis de muestras de agua para la determinación de compuestos alquilfenólicos. Se observan los distintos tipos de cartuchos utilizados. El análisis se ha realizado mayoritariamente mediante LC-MS/MS, técnica más sensible muy utilizada actualmente.

Tabla 1.3.3. Métodos para la determinación de **compuestos alquilfenólicos** en **muestras líquidas**. Adaptado y ampliado de (Vega-Morales y col 2009).

Compuestos	Matriz muestra	Pre-tratamiento de la muestra	Técnica de Extracción	Tipo de cartuchos y fibra	Análisis Instrumental	Recuperaciones %	LODs (ng/L)	Referencia
AP ₁₋₃ EOs, XNP	Agua de estuario	Filtración 0.7 μ m, ácido sulfúrico (pH 2)	SPE	Bondesil 0.40 μ m, Acetone	LC-MS	78–91	0.04–0.92	Ferguson y col., 2000
XAPEOs, APECs, APEOs	Agua superficial Agua de consumo Agua residual	Filtración 0.45 μ m	SPE	LiChrolut C ₁₈ , MeOH	LC-MS	73–98	20–100	Petrovic y col., 2001
NPEOs	Aguas de río	Filtración 0.45 μ m, Formaldeído (1%)	SPE	ENVI-Carb (GCB), MeOH, DCM.	LC-MS	93–117	0.5–5000	Shao y col., 2002
NPEOs, NPECs	Agua superficial	37% formaldeído	SPE	ENVI-Carb (GCB), DCM.	LC-MS-MS	78–107	10–50	Houde y col, 2002
AP ₁₋₅ EOs	Agua superficial	Filtración 0.7 μ m	SPE	Isolute ENV, DCM, MeOH, acetona.	LC-MS-MS	36–110	0.004–0.3	Loyo Rosales y col., 2003
APs, APEOs, APECs	Agua superficial y residual	Decantación	SPE	Oasis HLB, MeOH, acetona, etil acetato	LC-MS-MS	50–90	1–100	Jahnke y col., 2004
OP, NP, APs, NP ₁ EO, NP ₂ EO	Agua de río Agua de grifo	Filtración 0.45 μ m	SPE	LiChrolut C ₁₈	LC-MS	78 - 91	0.04 - 0.92	Pino y col., 2005
NP, NP ₁₋₂ EO, XNP ₁₋₂ EO	Agua residual	Sodium thiosulfate	SPME	DVB–CAR– PDMS	GC-MS		30–150	Quintana y col., 2006
APs, AP ₁₋₂ EOs, AP ₁₋₃ ECs	Agua residual	Filtración 1,2 μ m	SPE	Oasis HLB	LC-MS/MS	25 - 110	0.04 - 12	Loos y col., 2007
NP ₆₋₁₆ EOs, APECs	Agua residual	Filtración 0.7 μ m	SPE, LLE	LiChrolut ENV, DCM, MeOH, acetona.	LC-MS/MS	21–71	2–29	Loyo-Rosales y col., 2007
OP, OPEO,OPEC, NP,NPEO, NPEC	Agua de río		SPE		GC-MS			Loyo-Rosales y col., 2010

Bisfenol A: La mayoría de los trabajos publicados hasta la fecha se centran en matrices líquidas, ya que más del 50% del BPA presente en el medioambiente se encuentra en la fase disuelta. Durante las últimas dos décadas el número de técnicas empleadas para extraer el BPA en este tipo de muestras ha sido muy amplio, abarcando técnicas clásicas como por ejemplo la LLE (Rudel y col., 1998) o algunas técnicas de destilación (Lee y col., 1984), que han sido paulatinamente sustituidas por otras técnicas más eficientes y versátiles como la SPE (Ballesteros y col., 2006; Loos y col., 2007; Gallart-Ayala y col., 2007; Guitart y col., 2010; Liu y col., 2010; Matejicek y col., 2013) o la SPME. (Nerín y col., 2002; Huang y col., 2005; Liu y col., 2008). Posteriormente a la extracción, normalmente se realiza un *clean-up* de los extractos obtenidos mediante las técnicas LLE y SPE. La SPE es la técnica más ampliamente utilizada actualmente para la extracción/pre-concentración de BPA en muestras líquidas (Spengler y col., 2001; Gómez y col., 2006). Liu y col., (2004) han comparado diferentes sorbentes para la extracción del BPA entre otros compuestos fenólicos disruptores endocrinos, obteniendo recuperaciones superiores al 90% cuando utilizan sorbentes de sílice enlazada con C₁₈ y los poliméricos altamente entrecruzados. Sin embargo, con los de base sílice y poliméricos de cianopropil obtuvieron recuperaciones inferiores al 20% (Liu y col., 2004). También se han sintetizado algunos MIPs para la determinación específica de BPA (Kubo y col., 2003; Ikegami y col., 2004).

La SPME es una técnica que también ha sido ampliamente utilizada en el análisis de BPA (Takao y col., 1999; Helaleh y col., 2001; Zwiener y col., 2004; Huang y col., 2005; Basheer y col., 2005; Liu y col., 2008). Su facilidad de acoplamiento con la GC, técnica que durante las últimas décadas ha sido la primera opción para el análisis de este contaminante, ha impulsado sin lugar a dudas su optimización y desarrollo en una gran cantidad de metodologías. Se han utilizado varios tipos de fibras para la extracción de BPA, siendo las de poliacrilato (PA) y las de PDMSDVB las más extendidas (Huang y col., 2005; Basheer y col., 2005; Stoichev y col., 2008).

Durante la última década, han surgido otras técnicas avanzadas como por ejemplo la SBSE (Bicchi y col., 2005; Aparicio y col., 2017) o diferentes técnicas micro extractivas basadas tanto en extracciones en fase líquida (LLME) (Ganjali y col., 2010), como en fase sólida (SLME) (Mitani y col., 2003), que, aunque son mucho menos utilizadas, han permitido mejorar la extracción de BPA con menor consumo de disolvente automatizándola, etc. La SBSE se ha utilizado para la determinación de BPA por ejemplo en agua de río, utilizando los sorbentes poliméricos PDMS y obteniendo recuperaciones comprendidas entre el 83 y el 106% y LODs entre 0.1 y 3.2 ng/L (Nakamura y col., 2004), en agua superficial, residual y del grifo (Quintana y col., 2007; Aparicio y col., 2017) y en agua marina y residual (Iparraguerri y col., 2011).

Ftalatos: Los PAEs generalmente pueden identificarse y cuantificarse fácilmente por técnicas comunes de extracción (p.e., LLE, SPE, SPME, ASE, Soxhlet, sonicación...) y análisis (p.e., GC/MS, LC/MS(MS)). Las etapas importantes para mejorar los LOQs son la extracción, la preconcentración y el *clean-up* (Lv y col., 2013). Los ftalatos han de ser determinados tanto en la fase disuelta como en la particulada para obtener la contaminación global (Net y col., 2015)). Por tanto, la filtración es un proceso esencial como pre-tratamiento de la muestra para el correcto análisis de ftalatos en la fase disuelta.

Hay una gran variedad de técnicas de preconcentración y extracción que obtienen buenas recuperaciones de ftalatos: La SPE ha sido ampliamente utilizada para la determinación de PAEs con diferentes tipos de sorbentes, como son los de sílice enlazada con grupos C₁₈ o C₈ (Fatoki y col., 2002; Fromme y col., 2002) y los poliméricos (Castillo y col., 1998; Jara y col., 2000; Jonsson y col., 2002; Gimeno

y col., 2003) como poliestireno (Jara y col., 2000), PS-DVB (Davi y col., 1999; Suzuki y col., 2001; Jonsson y col., 2002) y SDB-XD, (Suzuki y col., 2001). Para los compuestos menos polares, como el DnOP y el DEHP, las recuperaciones son mejores con los sorbentes poliméricos que con los de sílice enlazada (Holadová y col., 1994). Sin embargo, algunos autores prefieren utilizar sorbentes de octadecilsilano y poliméricos combinados (Casajuana y col., 1993). También se han utilizado los MWNTs o nanotubos de carbono (Cai y col., 2003), obteniendo recuperaciones comparables, o en la mayor parte de los casos mejores, que las que se obtienen con diferentes sorbentes comerciales de sílice enlazadas con grupos C₁₈ o C₈ y poliméricos (PS-DVB). Otra alternativa es el uso de politetrafluoroetileno (PTFE) como sorbente de SPE, que muestra una propiedad hidrofóbica muy fuerte y pueden absorber fácilmente en su superficie compuestos neutros hidrofóbicos (Luna y col., 2000; Doong y col., 2000), y presenta entre otras ventajas la durabilidad y fácil disponibilidad. Con este método se obtienen recuperaciones entre 92.1-127.5% para la extracción de DBP, DCHP, DOP, DNO y DDP (Cai y col., 2003).

Para minimizar los problemas de contaminación en la SPE, principal limitación en la determinación de los PAEs, se desarrollan procedimientos analíticos rápidos y simples, donde el tratamiento y la manipulación de la muestra tienen el mínimo posible de etapas, como son algunos métodos automatizados. Por eso, la SPE a menudo se utiliza acoplada en línea a la GC o HPLC o se utiliza la SPE *off-line* automatizada utilizando un procesador de muestreo automatizado (Castillo y col., 1997; López-Roldán y col., 2004).

En los últimos años se ha aplicado más la SPME (Luks-Betlej y col., 2001), que simplifica el procedimiento analítico y reduce significativamente el riesgo de contaminación (Bermejo Barrera y col., 2010), aplicando tanto la inmersión directa como el espacio de cabeza, junto con la GC-MS (Kelly y col., 1999; Peñalver y col., 2000; Betlej y col., 2001; Cortázar y col., 2002; Sillakis y col., 2004). Varios autores han comparado las fibras utilizadas para la extracción de ftalatos, como la de PDMS y de PDMS-DVB y la de carbowax-divinilbenceno (CWX-DVB), concluyendo que esta última es la más efectiva (Betlej y col., 2001; Peñalver y col., 2001). La técnica SPME *in-tube* también ha sido aplicada por varios autores para determinar PAEs en muestras acuosas medioambientales (Saito y col., 2002; Lim y col., 2004; Zwiener y col., 2004). En un estudio se desarrolló un método para la determinación de nueve ftalatos en soluciones de infusión en contenedores de plástico utilizando SPME *in-tube*-HPLC con LODs en el rango de 1-10 ng/mL (Mitami y col., 2004). En otro estudio utilizó para la determinación de DBP y DEHP en muestras medioambientales, obteniendo límites de detección de 1 y 2.5 µg/L respectivamente (Cháfer-Pericás y col., 2008).

La técnica de LLE no ha sido muy utilizada para la extracción de ftalatos, debido al elevado uso de disolventes orgánicos, y por tanto al elevado riesgo de contaminación y al tiempo que requiere la extracción. La adición de un modificador orgánico (p.e. 50% metanol) puede mejorar la extracción de los PAEs más apolares, como DEHP y DnOP (Bergström y col., 2007). Adicionalmente, la determinación de ftalatos para análisis traza por debajo de 0.1 µg/L es cuestionable, debido a la presencia de ftalatos a nivel traza en disolventes comerciales (Bermejo Ballesteros y col., 2010). Sin embargo, se han desarrollado nuevos métodos, alternativos a la LLE con tendencia a la miniaturización y reduciendo el consumo de disolvente, como la microextracción en fase líquida (LPME), que utilizan fibras porosas de polipropileno (Psillakis y col., 2003) y solamente utiliza unos pocos microlitros de disolvente. Sin embargo, también presenta ciertas desventajas como relativamente baja reproducibilidad y sensibilidad. Faraani y col., (2008) desarrollaron un método para la determinación de ftalatos en muestras de agua usando LPME seguido de GC (Farahni y col., 2008). Psillakis y col., compara la SPME con la LPME, que presenta la ventaja de eliminar el efecto memoria que presenta la SPME.

También se utiliza la SBSE para la extracción de PAEs (Tan y col., 2008; Abamon y col., 2013; Aparicio y col., 2017). Las recuperaciones de los PAEs dependen de su K_{ow} . Diversos estudios han realizado la extracción de ftalatos en varias matrices medioambientales, por ejemplo: extracción de DEP, DNBP, DEHP, BBP, DnOP mediante SBSE para su determinación por GC-MS, obteniendo unos LODs en el rango 0.02-5 µg/L (Brossa y col., 2005). Seródio y col., desarrollaron un método para la determinación de EDCs en agua, incluyendo BBP y octilftalato, usando SBSE-LD en combinación con LVI y GC acoplado a MS, con un rango dinámico lineal excelente para la mayoría de EDCs en aguas a nivel ultra traza (0.025-0.400 µg/L) (Serodio y col., 2006). Más tarde, los mismos autores estudiaron un método para la determinación de ftalatos (DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, DOP) en agua de consumo, utilizando metanol como disolvente de extracción y obteniendo LODs bajos (3-40 ng/L) para todos los ftalatos estudiados (Serodio y col., 2006). Otros estudios realizaron la extracción de DEP, DBP, BBP y DEHP en agua, biosólidos y fango (Tan y col., 2008).

1.3.2.3. Extracción de EDCs en muestras sólidas

Durante décadas, las técnicas de extracción de micro-contaminantes orgánicos en muestras sólidas más utilizadas han sido la Soxhlet (hasta el 1999) y la extracción sólido-líquido (SLE). Sin embargo, aunque son robustas y eficientes, estas técnicas convencionales son tediosas, implican bastante tiempo y el uso de grandes volúmenes de disolventes tóxicos, caros e inflamables. Esto ha producido una disminución de su uso en los últimos años, dando paso a técnicas de extracción más avanzadas que proporcionan extracciones más eficientes, reduciendo el tiempo de análisis y volumen de disolventes, pudiendo automatizarse, como la extracción líquida presurizada (PLE) (Ding y col., 2000, Petrovic y col., 2002), la extracción asistida por microondas (MAE) (Pedersen y col., 1999) y la extracción por fluidos supercríticos (SFE) (Petrovic y col., 2002b). Sin embargo, el alto coste de adquisición de los equipos de PLE y SFE ha propiciado que, por una parte, se continúen empleando y desarrollando metodologías basadas en técnicas clásicas para el análisis de EDCs, como el Soxhlet (Song y col., 2006), o la extracción asistida por ultrasonidos (UAE) (Xu y col., 2008), que siguen teniendo una importancia significativa en la actualidad y por otra parte, ha fomentado el desarrollo de nuevos métodos de extracción que requieran una menor inversión inicial, como la MAE (Vega-Morales y col., 2013), que ha surgido como una técnica intermedia, ya que requiere menos disolvente orgánico y menor tiempo de extracción que las clásicas, pero con menor inversión que las más actuales (Sánchez-Rodríguez y col., 2011). En particular,

Extracción con disolventes presurizados (PLE). PLE o ASE (Extracción Acelerada con Disolvente) es una técnica rápida y eficiente que comporta un alto nivel de automatización con rápido procesamiento de las muestras, con una disminución importante de disolventes, siendo una técnica de rutina importante. Varios estudios han determinado compuestos alquilfenólicos aplicando PLE y GC-MS (Navarro-Ortega y col., 2010), LC-MS (Petrovic y col., 2002; Loyo-Rosales y col., 2007; Andreu y col., 2007) y LC-MS/MS (Loyo-Rosales y col., 2003; Loos y col., 2007; Brix y col., 2010, Salgueiro-González y col., 2015).

Extracción asistida por ultrasonidos o sonicación (UAE). Es una técnica de extracción rápida y económica, que comporta un importante ahorro en el tiempo de extracción, energía y consumo de disolvente. Se ha utilizado para extraer APs (Petrovic y col., 2001; Zgola-Grzeskowiak y col., 2010), LAS, NPEOs y sus productos de degradación NPs y NPECs, etc (Petrovic y col., 2004), APs, BPA y E1 (Xu y col., 2008).

Extracción asistida por microondas (MAE). Comporta menor consumo de disolvente y energía, reducción en el tiempo de extracción, la completa descomposición de la materia orgánica, y las múltiples extracciones de la muestra, ofreciendo el control automático de temperatura y la posibilidad de extraer varias muestras simultáneamente. Se ha utilizado para extraer compuestos alquilfenólicos (Fountoulakis y col., 2005; Bartolomé y col., 2005 y González y col., 2008) y otros EDCs como BPA; APs, APEOs, BPA y estrógenos (Vega-Morales 2013).

El extracto que se obtiene después de estas técnicas de extracción exhaustivas contiene un gran número de interferentes provenientes de la matriz que pueden coeluir con los analitos e interferir en los análisis cuantitativos o provocar una supresión de la señal en LC-MS. Eso hace imprescindible un proceso posterior de limpieza o un fraccionamiento de los extractos, que normalmente se realiza empleando cartuchos de SPE, aunque se han optimizado y aplicado otras metodologías como la SPME o la cromatografía de adsorción (Voulvoulis y col., 2003). La tabla 1.3.5. resume las técnicas de extracción y análisis de los compuestos EDCs estudiados, utilizadas en diversos estudios incluyendo matrices sólidas (Petrovic y col., 2002; Vega Morales y col., 2009; Sing y col., 2014).

Extracción de los EDCs estudiados en muestras sólidas: Algunos ejemplos de técnicas de extracción en muestras sólidas específicas para cada una de las familias de EDCs estudiadas son:

Hormonas esteroideas: Los métodos analíticos descritos hasta ahora en la bibliografía científica para la extracción de hormonas esteroideas en matrices sólidas, recogen una amplia gama de metodologías extractivas entre las cuales destaca la PLE o ASE como la técnica más empleada (Petrovic y col., 2002; Petrovic y col., 2003; Muller y col., 2010). No obstante, técnicas convencionales como el Soxhlet (Song y col., 2006), o la extracción asistida por ultrasonidos (Ternes y col., 2002; López de Alda y col., 2002; Xu y col., 2008), siguen teniendo una importancia significativa en la actualidad. A su vez, la MAE (Vega-Morales y col., 2013) es una técnica que no requiere una inversión tan alta como el resto y comporta menor tiempo de extracción y consumo de disolventes (Sánchez-Rodríguez y col., 2011). Un factor común en todas estas técnicas es la necesidad de un proceso posterior de limpieza del extracto obtenido, que normalmente se realiza utilizando cartuchos de SPE y puede contener multi-etapas aunque se han optimizado y aplicado otras metodologías como la SPME.

Es importante determinar las hormonas y sus metabolitos en suelos para conocer los compuestos que son degradados, retenidos y lixiviados de los suelos a las aguas subterráneas y superficiales. En un estudio comparativo de las técnicas ASE o PLE, Soxhlet y Ultrasonificación para la extracción de estrógenos, andrógenos, progestógenos y sus metabolitos en diversos tipos de suelos, Havens y col., obtuvo que la extracción mediante ASE y sonicación fue bastante eficiente excepto para la E1 en fango, mientras que Soxhlet fue la técnica significativamente menos eficiente (Havens y col., 2014). El análisis de las muestras se realizó mediante HPLC-MS/MS utilizando patrones internos (ISTD) adecuados para evaluar las pérdidas de analitos y efectos matriz, proporcionando una detección exacta y fiable de los estrógenos sin pre-tratamiento previo o *clean-up* posterior de los suelos. Recomendaron procesar las muestras antes de 30 días para evitar posibles pérdidas durante el almacenamiento (Havens y col., 2014). En la tabla 1.3.4. se observan estudios para la determinación de hormonas en matrices sólidas (Havens y col., 2014).

Compuestos alquilfenólicos: La extracción de EDCs fenólicos en matrices sólidas se ha llevado a cabo usando desde métodos convencionales como la digestión ácida (Li y col., 2003), la extracción líquida (Ternes y col., 2002) y Soxhlet (Peng y col., 2006), a otros más actuales como la PLE (Liu y col., 2002) y la MAE (Liu y col., 2004). La tendencia al aumento de la eficacia en la extracción, con una reducción del volumen de extractante y del tiempo de extracción, hace que las técnicas más avanzadas como PLE (Ding y col., 2000, Petrovic y col., 2002) y MAE (Vega-Morales y col., 2011) vayan ganando terreno en sustitución a las convencionales como el Soxhlet, que requiere mucho tiempo y volumen de disolvente para llevar a cabo la extracción (Dean, 2003). Algunos estudios han comparado la aplicación de varias técnicas de extracción a EDCs, como Ding y col., que comparó las técnicas de Soxhlet y Sonicación vs PLE para la extracción de surfactantes y esteroides en sedimentos (Ding y col., 1999). Así, en la tabla 1.3.4. se observa el aumento en la eficacia de la extracción de 4-NP en sedimentos mediante PLE versus otras técnicas.

Tabla 1.3.4. Comparación de las técnicas de extracción Soxhlet y Sonicación vs PLE para la extracción de 4-nonilfenol en sedimentos (Ding y col., 1999).

	Soxhlet	Sonicación	PLE
Tiempo	24h	1,5 h	30 min
Consumo de disolvente	150 mL	150 mL	10 mL
Recuperación (%)	85	82	106
Reproducibilidad (RSD)	6	5	5

Petrovic y col., han utilizado tanto PLE como SFE para realizar la extracción de varios surfactantes polietoxilados (AEOs y NPEOs) AEOs y sus productos de degradación, tanto en sedimentos como en fangos de depuradora, obteniendo recuperaciones de 84% y 92% para NPE₁C y NP respectivamente (Petrovic y col., 2000). Esta técnica ha sido aplicada previamente mediante diversas técnicas cromatográficas como GC-MS (Ferguson y col., 2001; Lu y col., 2012) y LC-MS (Shao y col., 2002). En la tabla 1.3.5. se resumen algunos métodos de pre-tratamiento, extracción, técnica de análisis de muestras sólidas y recuperaciones y LODs del método para la determinación de compuestos alquilfenólicos.

Bisfenol A: La técnica más empleada para determinar BPA en matrices sólidas ha sido la PLE o ASE, utilizada satisfactoriamente en diferentes tipos de matrices, como por ejemplo lodos de depuradora (Gang y col., 2005), sedimentos (Guerra y col., 2010), suelos (Zhang y col., 2011), o muestras biológicas (Tavazzi y col., 2002). También se ha empleado con éxito la SFE (Lee y col., 2000). Sin embargo, el coste que supone la inversión inicial de PLE y SFE ha hecho que muchos grupos de investigación continúen empleando y desarrollando metodologías clásicas para el análisis de BPA, especialmente las centradas en la UAE (Xu y col., 2008; Martínez-Moral y col., 2011; Pérez-Palacios y col., 2012), o la MAE (Pedersen y col., 1999). Vega-Morales y col. han utilizado MAE para la extracción de BPA en lodos de depuradora, matrices más complejas, obteniendo recuperaciones superiores al 90% y utilizando solamente 10 mL de metanol como extractante, realizando la extracción simultánea de 6 muestras en solo 10 min. (Vega-Morales y col., 2011)

Ftalatos: El análisis de PAEs en matrices sólidas generalmente incluye extracción, *clean up*, fraccionamiento en columna y separación cromatográfica. La extracción de PAEs es más compleja en matrices sólidas que en líquidas, y ha sido convencionalmente llevada a cabo mediante la técnica Soxhlet (Aranda y col., 1989; Gibson y col., 2005; Bonini y col., 2008), que ofrece extracciones con buenos

rendimientos (Wang y col., 2008; Meng y col., 2014; Wang y col., 2014), pero el principal inconveniente es el tiempo empleado para la extracción total (hasta 10h). Se ha demostrado en diversos estudios que una gran variedad de disolventes orgánicos, como acetona, ACN, DCM, hexano y etil acetato son eficientes para la extracción en aguas, suelo, sedimento y fango (Aranda y col., 1989; Gibson y col., 2005; Bagó y col., 2005; Zeng y col., 2008 y 2009; Wang y col., 2014). Sin embargo, se han desarrollado otras técnicas de extracción no solo para reducir el volumen de disolvente y tiempo de extracción, sino para mejorar también la precisión de la recuperación. Estas técnicas incluyen MAE, aplicado en la extracción de PAEs en sedimentos, como por ejemplo DEHP y diversos PAEs respectivamente (Cortázar y col., 2005; Bartolomé y col., 2005) y DEP y BBP en material particulado atmosférico (Alvarez-Avilés y col., 2007; Bermejo y col., 2010). Respecto a las técnicas de SFE, UAE y ASE (Kirchmann y col., 1991; Ling y col., 2005; Sicar y col., 2008), la principal ventaja que presentan es el menor tiempo de extracción respecto a Soxhlet, sin embargo, son menos efectivas y obtienen peores recuperaciones en la extracción de PAEs de suelos (Ling y col., 2005) La solución extraída requiere un proceso de *clean up* subsecuente utilizando centrifugación o filtración que eliminará cualquier material sólido residual (Guo y col., 2012).

Tabla 1.3.5. Métodos para la determinación de compuestos alquilfenólicos y hormonas en matrices sólidas. Adaptado de (Vega Morales y col., 2009 y Havens y col., 2014).

Compuestos	Matriz muestra	Pre-tratamiento de la muestra	Técnica de Extracción	Análisis Instrumental	Recuperaciones %	LODs (ng/L)	Referencias
AP ₁₋₃ EOs, XNP	Agua superficial	Congelación	Ultrasonidos	LC-MS	80–94	4–2020	Ferguson y col., 2001
NP, NP ₁₋₂ EOs	Fangos EDAR	Liofilización, tamizado	Ultrasonidos	GC-MS	93–117	189–751	Shao y 2002
APs, AP ₁₋₁₅ EOs	Suelo modificado	Secado con aire, tamizado	PLE	LC-MS	36–110	0.3–30	Tavazzi y col., 2002
NP, NP ₁₋₂ EOs	Sedimentos estuario	Liofilización, tamizado	MAE	GC-MS	–	100	Croce y col., 2003
NP, NPEOs	Fango de aguas residuales	1% formaldehído	Soxhlet	LC-FD	66–88	–	Nuñez y col 2007
APs, APEOs, APECs, XAPEOs	Sedimentos río	Liofilización, tamizado	PLE	LC-MS	–	0.5–2	Andreu y col., 2007
NP, NPEOs	Fango de aguas residuales	1% formaldehído	MAE	LC-FD	61–91	1820–2860	Nuñez y col., 2007
NP ₁₋₁₇ EOs	Fango de aguas residuales	Secado con aire, tamizado	SFE	LC-FD	86–105	500	Minamiyama y col., 2007
NP, NP ₁₋₂ EOs	Sedimentos río, materia particulada	Congelación	Tween-80	LC-FD	81–94	30–60	Aparicio y col., 2007
NP, NP ₁₋₁₉ EOs	Sedimentos marinos	Congelación	Soxhlet	LC-MS	52–104	2–10	Koh y col., 2008
E1,E2, E3,	5 g sedimento liofilizado y tamizado		ASE / RAM ⁹	LC-MSD-API-ESI	94 – 104	0.50 – 5.00	Petrovic y col., 2002
E1,E2, E3	5 g sedimento liofilizado		ASE / SPE (C18)	LC-ESI-MS ³	78 – 94	2.00 – 10.0	Céspedes y col., 2004
E1,E2, E3	10 g sedimento pre-extraído		Sonicación, Soxhlet/sílica	Derivatización PFFPA y GC-MS	32 – 132 37 – 133	0.60 – 2.50	Peng y col., 2006
E1,E2, EE2	1 g sedimento húmedo		MASE/ SPE y sílica	LC-ESI-MS ³ .	82 – 98	4.00 – 8.00	Labadie y col., 2007
E1,E2,17βE2	10 g sólido deshidratado		Soxhlet Alúmina/ Florisil	Derivatización BSTFA: TMCS y GC-MS	95 – 150	0.02 – 0.07	USEPA y col., 2007
E1,17βE2,E3	30 g suelo deshidratado y tamizado		ASE / SPE (C18)	Derivatización MSTFA y GC-MS	89 – 103	0.05	Beck y col., 2008
E1,E2, E3	5 g sedimento deshidratado		Ultrasonidos / SPE (HLB)	GC-MS ³	60 – 127 58 – 133	1.50 - 5.00	Hajkova y col., 2007

PFFPA: Anhídrido pentafluoro-propiónico. BSTFA: TMCS: N,O-Bis(trimetililil)trifluoroacetamide con trimetilclorosilano. MSTFA: N-trimetilsilyl-N-metil trifluoroacetamida.

1.3.3. ANÁLISIS QUÍMICO DE COMPUESTOS DISRUPTORES ENDOCRINOS

Las técnicas analíticas más utilizadas para la determinación de compuestos disruptores endocrinos a nivel traza, han sido la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía de líquidos (LC) acopladas a espectrometría de masas (MS) (Locatelli y col., 2016). Estas técnicas proporcionan información de su estructura molecular.

Métodos multiresiduo: El principal reto a afrontar al usar técnicas cromatográficas está generalmente relacionado con el análisis multi-residuo, ya que los protocolos analíticos tienen que tener en cuenta, la especificidad físico-química del analito y la sensibilidad requerida. Los métodos multiresiduo han de cumplir varios criterios idealmente (Petrovic y col., 2010) como:

- Ha de realizarse la preparación de la muestra y la preconcentración en una única etapa, aunque los analitos tengan diferentes propiedades físico-químicas
- Los límites de detección y cuantificación han de ser suficientemente bajos para cada analito
- La detección ha de ser específica para cada sustancia
- Ha de aplicarse fácilmente a varias matrices (ej: agua natural, de consumo, residual, etc).

Sin embargo, los métodos multiresiduo también presentan ciertas limitaciones: el análisis simultáneo de compuestos multiclase con características físico-químicas bastante diferentes, a menudo impone compromisos entre los parámetros de rendimiento. Otra potencial limitación es el incremento en la supresión en la señal, particularmente al estudiar muestras complejas como agua residual. En estos métodos, normalmente se aplica un pretratamiento de la muestra simple, para reducir el tiempo de análisis. Esta simplificación de la etapa de *clean-up* de la muestra puede resultar en extractos sucios con alto contenido co-extractivo. Por tanto, deben tenerse en cuenta el efecto matriz (Petrovic y col., 2010).

1.3.3.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

La GC con columna capilar acoplada a MS o a otros detectores como el de captura de electrones (ECD) o el detector de fósforo-nitrógeno (NPD) es la base de muchos métodos de rutina utilizados para el análisis de compuestos orgánicos en agua. GC-MS continúa siendo la técnica seleccionada para analizar estrógenos y compuestos alquilfenólicos en muchos laboratorios que no pueden permitirse la elevada inversión y el alto coste del LC-MS/MS (Omar y col., 2016).

El analizador de masas más utilizado para el análisis de los compuestos EDCs en GC-MS es el cuadrupolo, simple de operar, que permite realizar un cribado o *screening* y ofrece alta sensibilidad e información cualitativa a menor coste que los equipos en tándem (Santos y col., 2003). Se recomienda especialmente el análisis con fuentes de ionización electrónica (EI), que suelen producir iones moleculares y fragmentos, con espectros muy reproducibles que permiten el uso de librerías espectrales para identificar desconocidos. La ionización química (CI) en cambio proporciona mejor sensibilidad y selectividad que EI y se utiliza para el análisis de isómeros en el medioambiente (Santos y col., 2003). Las muestras medioambientales requieren un espectro *full-scan* con suficiente información para identificación unívoca. En cambio la Monitorización Selectiva de Iones (SIM, *Selected Ion Monitoring*), es el modo de adquisición

que se emplea para el análisis cuantitativo de trazas de compuestos conocidos (monitorizando al menos 2 o 3 iones), gracias a su mayor sensibilidad (Gallart-Ayala y col., 2010).

Para la separación cromatográfica se ha utilizado una gran variedad de columnas capilares (DB5-MS, XT1-5, HP Ultra II, etc), siendo las de difenil-dimetil (5-95%) polisiloxano las más utilizadas y rampas de temperatura normalmente desde 45 a 300 °C (Barceló y col., 2004).

Las técnicas de GC-MS presentan como principal ventaja la disponibilidad de extensas bibliotecas de espectros de masas, muy útiles para la identificación de picos desconocidos en fracciones estrogénicas activas (Barceló y col., 2004; Locatelli y col 2016). GC-MS es apropiada para la determinación de compuestos apolares y medianamente polares, en cambio, no resulta en principio apropiada para la determinación de compuestos polares iónicos, de elevado peso molecular y para compuestos térmicamente inestables. Por tanto el uso de GC está limitado a compuestos volátiles y térmicamente estables, aunque es posible superar algunas limitaciones de volatilidad y estabilidad a través de una etapa de derivatización de los analitos previamente al análisis (Petrovic y col., 2004), para convertir estos compuestos en sustancias volátiles y estables susceptibles de ser analizadas por GC, para evitar la descomposición termal y mejorar la separación cromatográfica y la sensibilidad del análisis (Santos y col., 2003, Díaz-Cruz y col., 2003).

GC puede acoplarse fácilmente a técnicas de microextracción como SPME (Pan y col., 2008) y SBSE-cuando hay disponible un equipo de desorción térmica-(Baltussen y col., 1999; Nakamura y col., 2004; Quintana y col., 2007; Tan y col., 2008), reduciendo los problemas de contaminación de blancos, la manipulación de las muestras y el tiempo de análisis y permitiendo la inyección del extracto entero y alcanzar límites de cuantificación del método (LOQs) inferiores (Salgueiro-González y col., 2017).

Sin embargo, la principal limitación que tiene la GC-MS es la etapa de derivatización necesaria en el caso de compuestos termolábiles, polares y de baja volatilidad, para aumentar la volatilidad de los compuestos a analizar y mejorar la forma de pico, como por ejemplo en el caso de los alquilfenoles etoxilados de cadena larga y sus metabolitos polares (Gallart-Ayala y col., 2010). En otros casos, algunos autores recomiendan derivatizar los compuestos para mejorar la sensibilidad del análisis por GC-MS (Stuart y col., 2005), ya sea para mejorar la separación cromatográfica y evitar la descomposición termal como es el caso de los estrógenos (Díaz-Cruz y col., 2003), o aunque ya se obtenga un buen rendimiento cromatográfico y formas de pico, como por ejemplo en el caso del BPA y sus derivados (Hernando y col., 2004; Stuart y col., 2005). Un inconveniente de la derivatización es que está dirigida a un grupo determinado de analitos diana, mientras que otros compuestos de interés pero con diferente estructura, como por ejemplo los metabolitos, que pueden también estar presentes, no son derivatizados al mismo tiempo y no se pueden, por tanto, determinar en el mismo análisis. Otro inconveniente es la posibilidad de pérdida de muestra y de contaminación durante la manipulación adicional. Adicionalmente, la derivatización es un proceso laborioso que requiere más tiempo y técnicos más especializados (Desbrow y col., 1998).

Se ha utilizado un amplio rango de procedimientos para derivatizar los compuestos EDCs, como por ejemplo metilación, siliación y acetilación. La metilación se utiliza para el análisis de compuestos alquilfenólicos, por ejemplo NPnEOs de cadena corta y sus metabolitos ácidos, los nonilfenolcarboxilados (NPnECs) en agua (Díaz y col., 2002a). La siliación, con reacción rápida y cuantitativa, es el método más

utilizado y da derivados térmicamente estables y altamente volátiles. La derivatización requiere bastante tiempo y frecuentemente se forman subproductos (Li y col., 2001; Kojima y col., 2005). Para minimizar las interferencias y mejorar la sensibilidad, se ha realizado *clean up* a continuación (Kojima y col., 2005; Jonsson y col., 2008). También se ha combinado con SPME (Díaz y col., 2002b), y se ha realizado la derivatización *in situ* (Casas-Ferreira y col., 2013).

Se han determinado varios EDCs mediante GC-MS en el medio acuático (Kuch y col., 2001; Jeannot y col., 2002; Ballesteros y col., 2006), como por ejemplo en aguas de estuario, donde Bolz y col., obtuvieron unos límites de detección de 10 a 50 ng/L (Bolz y col., 2000), en aguas de río (Quintana y col., 2007; Fischer y col., 2010; Guitart y col., 2010) y de consumo (Díaz y col., 2002b; Quintana y col., 2007; Liu y col., 2010), en aguas residuales, (Körner y col., 2000; Ballesteros y col., 2006; Gatidou y col., 2007; Prieto y col., 2010), en agua de mar (Li y col., 2003), en fangos y sedimentos (Planas y col., 2002), etc. Por ejemplo, GC-MS se aplica al análisis a bajas concentraciones en matrices medioambientales complejas de BPA y alquilfenoles (4-*t*-OP, 4-*n*-NP) utilizado frecuentemente para analizar 4-NP técnico o metabolitos de NP_nEOs, como NP₁EO y NP₂EO en diferentes etapas del tratamiento de una EDAR (Planas y col., 2002) y sus derivados halogenados, por ejemplo derivados bromados de NP (Díaz y col., 2002a,b).

La utilización de **GC-MS/MS**, técnica más selectiva que la GC-MS, permite obtener límites de detección más bajos y prevenir falsos positivos en la identificación de EDCs (Hibberd y col., 2006). Como ejemplo, el estudio de Hibberd y col., presenta un método optimizado para la extracción y análisis de varios EDCs (4-*t*-OP, 4-NP, BPA, E1, E2, EE y 16-hidroxiestrone) con un amplio rango de polaridades en agua y sedimentos mediante extracción SPE y MAE de las muestras de agua y sedimentos respectivamente, seguido de análisis por GC-MS/MS (Hibberd y col., 2006).

Cabe destacar el desarrollo de la cromatografía de gases en dos dimensiones o bidimensional (GC x GC), por la alta sensibilidad y gran poder de resolución de esta técnica (Marrito y col., 2002, Dalluge y col., 2003), que puede ayudar a solucionar la co-elución de diferentes compuestos que puede ocurrir con las columnas capilares en GC (Moeder y col., 2006). Un ejemplo es la separación de isómeros de NP, que ayuda a solucionar la co-elución al analizar 4-nonilfenoles técnicos y sus productos de (bio)degradación (Moeder y col., 2006). Las principales ventajas de la GCxGC son el aumento de la sensibilidad y de la señal y la identificación más fiable mediante dos tiempos de retención. Sin embargo, la principal limitación es la necesidad de ser acoplado a un detector rápido (como FID, ECD, TOF-MS), unido al encarecimiento de los análisis y al complejo procesamiento de los datos obtenidos (Marrito y col., 2002, Dalluge y col., 2003).

Determinación de los EDCs estudiados mediante GC-MS

A continuación, se describen las metodologías de análisis mediante GC-MS(MS) y LC-MS (MS) de las distintas familias de compuestos disruptores endocrinos estudiados en esta tesis

Hormonas esteroideas: GC ha sido la técnica tradicional más utilizada para el análisis de los esteroides estrogénicos y los progestágenos, ya que, a pesar de la baja volatilidad presentada por estos compuestos, la derivatización mejora la estabilidad, precisión y sensibilidad del análisis GC-MS (Belfroid y col., 1999; Kuch y col., 2000; Xiao y col., 2001; Liu y col., 2004). La derivatización generalmente tiene lugar en los grupos -OH del anillo esteroideo. Principalmente se usan derivados sililanzados y se han utilizado diversos reactivos (Ternes y col., 2002). Mediante GC-MS/MS se pueden obtener límites de detección de hasta 20 pg/μL (Croley y col., 2000) Además de los problemas de la GC asociados a la derivatización (aumento en los tiempos de análisis y reducción en las recuperaciones), puede darse la descomposición de algunos metabolitos (E3), o conversión de EE a E1 (Gomes y col., 2003; Lerch y col., 2003). Por tanto ha aumentado considerablemente el análisis de las hormonas esteroideas mediante HPLC-MS y LC-MS/MS (López de Alda y col., 2001). Mediante GC-MS/MS se pueden obtener límites de detección de hasta 20 pg/μL (Croley y col., 2000). En la tabla 1.3.6. se muestran métodos GC-MS(MS) para la determinación de hormonas esteroideas sexuales y compuestos sintéticos relacionados en diversas muestras de agua.

Tabla 1.3.6. Métodos GC-MS y GC-MS/MS para la determinación de hormonas esteroideas muestras del medioambiente acuático. Adaptado de (Briciu y col., 2009).

Compuestos	Matriz	Preparación muestra	Método de detección	LODs (ng/L)	Ref.
17β-Oestradiol Oestrone,17α-N 2 EE2	Agua de río	Extracción (discos C18)/ Evaporación con N ₂ / Derivatization(MTBSTFA*)	IT GC-MS GC-MS/MS	1 ng/L	Kelly y col., 2000
E1,17βE2,E3 17αEE2 y compuestos relacionados	Agua de río y Efluentes EDARs	Filtración/SDB-XC disco de extracción; C18/Derivatización(PFBO)	GC-NICI-MS	0.03- 0.50 ng/L	Xiao y col., 2001
E1,17αE2	Río Tama Japón	Filtración/SPE(ENV/124) Derivatización (PFBBR)	GC-NICI-MS	0.1 – 0.28 ng/L	Nakamura y col., 2001
E1,17β-E2,E3 17αEE2 y comp. Relacionados	Efluentes EDAR y EDARs	Filtración/SPE (C18;OasisHLB) /Derivatización (BSTFA)	GC-MS	< 100 ng/L	Jeannot y col., 2002
E1,17βE2 17βE2,E3	Agua subterránea	Filtración/SPE(Oasis HLB) Derivatización(PFBBR,TMSI ⁺)	GC-NICI- MS/MS	0.2 – 0.6 ng/L	Fine y col., 2003
E1,E2,E3,EE2 +otras hormonas estrogénicas	Agua de río EDARs	Filtración/SPE (Oasis HLB+NH ₂) /Derivatización (BSTFA)	GC-MS(MS)	0.3 - 9.0 ng/L	Labadie y col., 2005
E1,17αE2, 17βE2,E3	Agua residual	SPE(Carbograph)/ Evaporación con N ₂ (70°C) /SPE(C18)/Derivatización (BSTFA)	GC-MS	75 ng/L	Hanselman y col., 2006
Estrógenos esteroideos	Agua subterránea	Filtración/SPE (StrataX)/Derivatización (BSTFA)	GC-MS/MS	2 - 4 ng/L	Stanford y col., 2007
E1,17αE2 17βE2,E3,EE2	Río Pearl Delta	Filtración/SPE(ENV118) Derivatización(BSTFA;MSTFA)	GC-MS	0.1 - 5 ng/L	Penga y col., 2008

En la tabla 1.3.6. se observa que para análisis de agua superficial y subterránea se obtuvieron LODs en el mismo rango, de 0.03 a 9 ng/L para análisis mediante GC-MS (Kelly y col., 2000; Xiao y col., 2001; Labadie y col., 2005; Fine y col., 2003), y LODs entre 1 y 4 ng/L con LC (ESI)-MS/MS (Kelly y col., 2000; Jeannot y col., 2002; Stanford y col., 2007). Sin embargo, los LODs para la determinación de estrógenos en agua residual aumentaron a 75-100 ng/L (Jeannot y col., 2002; Stanford y col., 2007) por la complejidad de la muestra.

Compuestos alquilfenólicos: Durante años, la GC, básicamente acoplada a MS (GC-MS), con ionización electrónica (EI) o ionización química iónica negativa (NICI), ha sido la técnica más popular para analizar los APEOs y sus productos de degradación (APs) en muestras medioambientales, principalmente por su alta capacidad de separación y sensibilidad (Gayart-Ayala y col., 2009), su simplicidad, robustez, reproducibilidad y elevada información estructural que se obtiene (Ahel y Giger, 1985; Lee, 1999; Richardson, 2002; Loos y col., 2008; Asimakopoulos y col., 2012; Selvaraj y col., 2014); por tanto se ha utilizado GC-MS como método de análisis rutinario de los compuestos alquilfenólicos en diversos estudios (Bolz y col., 2000; Mol y col., 2000; Körner y col., 2000; Ding y col., 2000a; Ding y col., 2000b; Helaleh-Murad y col., 2001; Díaz y col., 2002; Rice y col., 2003; Quintana y col., 2004; Liu y col., 2004). Sin embargo, debido a la baja volatilidad y alta polaridad de estos compuestos, a menudo se lleva a cabo una etapa previa de derivatización para la determinación de APs, APEOs y BPA. El procedimiento más utilizado es la sililación, utilizando diversos agentes derivatizantes (BSTFA (Arditsoglou y col., 2008), MTBSTFA (Pan y col., 2008), MTSTFA (Quintana y col., 2007; Guitart y col., 2010), TFA, PFB (Kuch y col., 2001), PFBCI y HFB) y la acetilación (Lerch y col., 2003).

La tabla 1.3.8. incluye información de derivatización, procedimientos de GC-MS, así como los métodos de cuantificación utilizados y los límites de detección obtenidos en la determinación de APs, APEOs y BPA en aguas superficiales, residuales, de consumo, agua de mar, agua subterránea, fangos, sedimentos y suelos. La separación se lleva a cabo con columnas capilares con fases estacionarias de baja polaridad, utilizando mayoritariamente la formada por un 5% difenil-dimetil-95% dimetilpolisiloxano (Nakamura y col., 2004). Se observa que la gran mayoría de estudios derivatiza con el agente BSTFA, utiliza la columna de 5% fenil metil polisiloxano, la ionización mediante EI y cuantifica con patrón interno. Para el análisis de aguas superficiales se obtienen límites de detección entre 0.04 ng/L y 1.5 µg/L. En algunos casos se recomiendan columnas moderadamente polares para tener mayor rendimiento. Como ejemplo, se ha propuesto una columna 50% fenil–metil polisiloxano para el análisis directo de 4-n-OP y BPA (Morales-Muñoz y col., 2005).

Una limitación que presenta la GC-(EI)MS en algunos casos es la identificación y cuantificación de isómeros con variaciones en la composición de la cadena alquílica debido a que algunas veces co-eluyen y no producen fragmentos diferentes en EI para confirmar su estructura. Así, debido a la elevada resolución de las columnas capilares, un inconveniente para el análisis del 4-NP es la obtención de un grupo de picos, que se atribuyen a la presencia de más de 211 isómeros de la cadena alquílica del NP ramificado, lo cual dificulta la cuantificación pudiendo comportar errores y menor precisión en los resultados (Salgueiro-González y col., 2017). Esta resolución también se observa para cada nivel de etoxilación del NPEO libre o derivatizado. En la figura 1.3.2. se observa claramente el perfil de los isómeros de 4-NP obtenido mediante GC-EI-MS (Céspedes, Máster, 2001), muy similar al obtenido en otros estudios (Dachs y col., 1999).

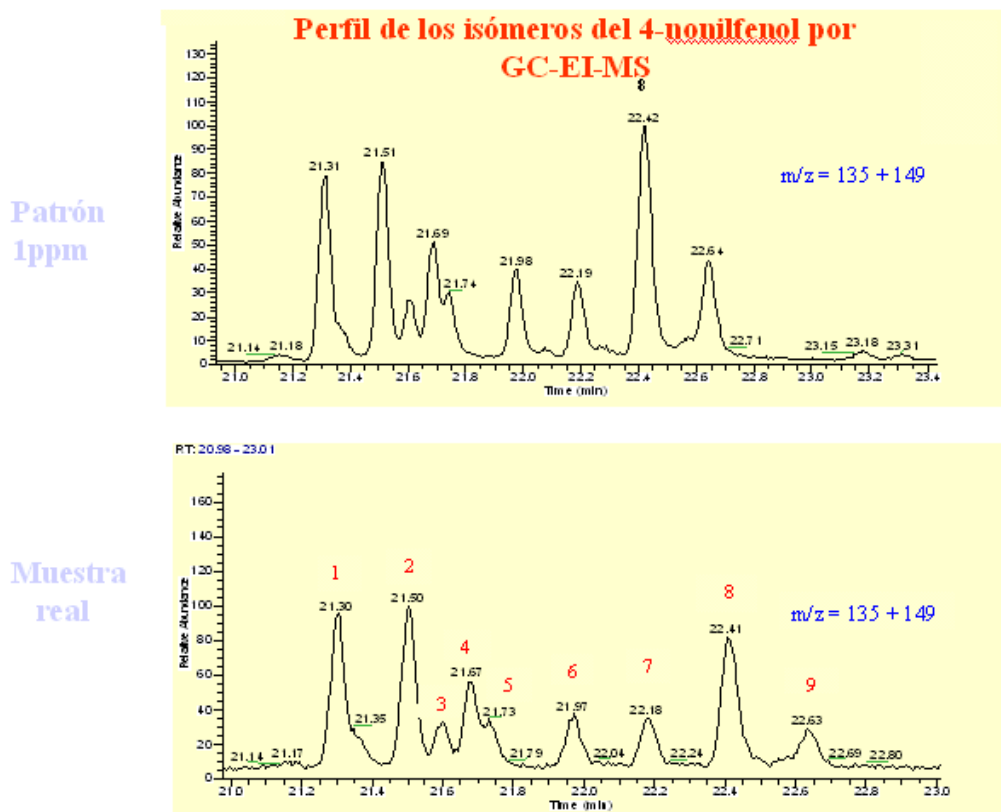


Figura 1.3.2. Perfil de los isómeros de 4-nonilfenol obtenido mediante GC-EI-MS en un patrón y en una muestra de agua (Céspedes, Máster, 2001).

Respecto a las técnicas de ionización, se han utilizado dos técnicas complementarias para el análisis de compuestos fenólicos mediante GC-MS: La Ionización electrónica (EI) es la más utilizada para cuantificación e identificación (Mol y col., 2000; Ding y col., 2000; Kojima y col., 2003; Liu y col., 2004), aunque la ionización química (CI) en modo negativo (NICI) también se ha aplicado, principalmente para aumentar la sensibilidad, particularmente cuando se analizan los derivados de pentafluoro. En contraste, la ionización química positiva (PCI) ha sido apenas utilizada para analizar estos compuestos. En algunos casos, como los derivados de HFB o TFA, PCI es la mejor ionización (Lerch y col., 2003). La CI se utiliza para obtener compuestos con iones específicos, ya que la detección por EI da mucha fragmentación, lo cual puede ser un inconveniente para hacer una segunda fragmentación y disminuir los LODs por MS-MS. En otro estudio donde se forman derivados de PFB, obtienen una elevada sensibilidad utilizando la MS con el modo de NICI (Kuch y col., 2001). Por tanto los APs y APEOs se han analizado principalmente mediante GC-EI-MS.

Una manera de mejorar los LODs en GC en lugar de utilizar la MS en tándem, es inyectando grandes volúmenes. Una comparación hecha entre la aplicación de GC-MS con la inyección de 40 μL de muestra y GC-MS/MS con inyección de 2 μL , demuestra que los límites de cuantificación para los derivados con BSTFA son similares utilizando las dos técnicas debido a la inyección de grandes volúmenes en GC-MS (Jeannot y col., 2002). En función del tipo de inyección que se lleva a cabo, se hace necesario el uso de patrón interno para la cuantificación (Ding y col., 2000; Kojima y col., 2003).

Tabla .1.3.7. Métodos GC-MS aplicados a la determinación de **compuestos alquilfenólicos** y **BPA**. Adaptado y actualizado de (Gallart-Ayala y col 2010).

Compuesto	Matriz muestra	Derivatización	Columna	Técnica de Ionización	Analizador de Masas	Modo de Adquisición	Método de Cuantificación	LODs	Ref.
NP _n ECs	Soluciones estándar	BF3: MeOH	5% fenil-metil-polisiloxano	EI NICI isobutano	IT	SIM	Calibración externa	-	Hao y col., 2000
NP, OP, BPA	Agua superficial Agua de consumo	PFBCI	5% fenil-metil-polisiloxano	NICI (metano)	Q	SIM	Dilución isotópica Patrón Interno	0.04-0-05 ng/L	Kuch y col., 2001
BPA Cl _n BPAs	Agua residual	BSTFA	5% fenil-metil-polisiloxano	EI	Q	SIM	-	-	Fukazawa y col., 2001
BPF, BPA, BFDGES, BADGES	Agua residual	BSTFA	100% dimetil-polisiloxano	EI	Q	SIM	Patrón Interno	0.006-0.13 µg/L	Vilchez y col., 2001
NP NP ₁ EO, NP ₂ EO	Agua, fangos Sedimentos río	-	5% fenil-metil-polisiloxano	EI	Q	Full scan	Dilución isotópica	4-2122 ng/L	Planas y col., 2002
NP, NP _n EOs	Agua	DMS	5% fenil-metil-polisiloxano	EI	Q	SIM	-	30-150 ng/L	Díaz y col., 2002a
OP, NP, APs, NP ₁ EO, NP ₂ EO, BPA	Agua de río Agua de grifo	DMS	5% fenil-metil-polisiloxano	EI	Q	SIM	Patrón Interno	0.02 - 1.5 µg/L	Díaz y col., 2002b
NP, BPA	Fango	Anhídrido acético	5% fenil-metil-polisiloxano	EI	IT	SIM	Patrón Interno	0.125 ng/kg	Meesters y col., 2002
OP, NP, BPA	Fango Agua residual	BSTFA	5% fenil-metil-polisiloxano	EI	IT	SIM SRM	Patrón Interno	0.15–0-33 ng/L	Jeannot y col., 2002
APs, BPA	Agua de mar Sedimentos	BSTFA	100% dimetil-polisiloxano	EI	Q	SIM	Patrón Interno	1 µg/L (LOQ)	Li y col., 2001 y 2003
OP, BPA	Agua residual	BSTFA	5% fenil-metil-polisiloxano	EI	IT	ión Producto Scan	Patrón Interno	20 ng/L	Hernando y col., 2004
APs	Agua	PFBC	5% fenil-metil-polisiloxano	NICI (metano)	Q	SIM	Patrón Interno	1 µg/L (agua)	Botsov y col., 2004;
BPA 4n-OP	Sedimentos marinos	-	5% fenil-metil-polisiloxano	EI	IT	SIM SRM	-	0.16-1 ng/g	Morales-Muñoz y col., 2005
NP, BPA	Sedimentos	PFPA	5% fenil-metil-polisiloxano	EI	Q	SIM	Patrón Interno	0.1 µg/kg (BPA) 0.2 µg/kg (NP)	Peng y col., 2006
NPs y productos de degradación	Mezcla técnica	-	GCxGC 5% fenil-cianopropil	EI	TOF	Full scan	Patrón Interno	1 µg/L	Moeder y col., 2006
OP, NP, BPA, Cl _n BPA	Agua residual	BSTFA	5% fenil-metil-polisiloxano	EI	Q	SIM	Patrón Interno	4-60 ng/L	Ballesteros y col., 2006
OP, NP	Sedimentos	BSTFA	5% fenil-metil-polisiloxano	EI	Q	SIM	Patrón Interno	0.1 µg/kg	Fiedler y col., 2007
OP, NP, BPA		-	5% fenil-metil-polisiloxano	EI	TOF	Full scan	Patrón Interno	0.005 µg /L (LOQ)	Hernandez y col., 2007
NP	Suelos Aguas subterráneas	BSTFA	100% dimetil-polisiloxano	EI	IT	Full scan SRM	Dilución isotópica	500 ng/L (agua) 50 ng/g (suelo)	Stanford y col., 2008

Bisfenol A: GC-MS ha sido la técnica de identificación y cuantificación de las formas libres y derivatizadas del BPA más utilizada en todo tipo de muestras (Bolz y col., 2000; Ding y col., 2000; Vílchez y col., 2001; Vílchez y col., 2001; Jeannot y col., 2002; Liu y col., 2004; Ballesteros y col., 2006; Arditoglou y col., 2008; Zhang y col., 2008; Guitart y col., 2010; Iparagirre y col., 2012). Para la determinación de BPA mediante GC-MS, es necesario derivatizar el BPA para mejorar la sensibilidad, aumentando la especificidad, mediante una silylación (Vílchez y col., 2001; Liu y col., 2004), una esterificación (Kuch y col., 2001), o una acetilación. En la tabla 1.3.8. se muestran una serie de métodos cromatográficos para la determinación de BPA mediante GC-MS junto a APs y APEOs, ya que debido a sus similitudes estructurales, generalmente se determina junto a estos compuestos. Se han analizado BPA y sus derivados halogenados mediante la ionización electrónica (EI) y la ionización química iónica negativa (NICI), (Kuch y col., 2001; Lerch y col., 2003). Respecto a la fragmentación, utilizando GC-(EI)MS el ión base que se forma a m/z 213 corresponde al fragmento $[M-CH_3]^+$ y también se observa un pico a m/z 228 correspondiente al fragmento $[M]^+$. Algunos autores utilizan la CI para aumentar la sensibilidad y selectividad del método disminuyendo la fragmentación y obteniendo el pico base correspondiente $[M]$ y en segundo término el ión isotópico C_{13} $[M+1]$. (Gallart-Ayala y col., 2009).

Ftalatos: GC-MS ha sido la técnica más utilizada para la determinación de los PAEs, ya que generalmente ofrece mayor sensibilidad que LC-, aunque en el caso de los monoésteres y el ácido ftálico se requiere una derivatización previa (Psillakis y col., 2003). La GC se ha utilizado acoplada tanto al detector ECD (Prokupková y col., 2002; Holadová y col., 2007), relativamente sensible pero con menor especificidad, como al FID (Fatoki y col., 2001; Kotowska, y col., 2006; Adeniyi y col., 2008), utilizados en la mayoría de métodos desarrollados por la EPA para la determinación de ftalatos (métodos EPA 606, 8060, 8061A). Sin embargo, en los últimos años se han ido sustituyendo por la detección mediante MS (Psillakis y col., 2003), utilizando todos los tipos de analizadores de MS, incluyendo los instrumentos de cuadrupolo, triple cuadrupolo, trampa iónica y sector magnético y Orbitrap (Inoue y col., 2002; Earls y col., 2003; David y col., 2003; Ballesteros y col., 2006; Cavaliere, y col., 2008; Wille y col., 2012).

El elevado poder de identificación de la GC-MS utilizando la EI como fuente de ionización, que permite obtener librerías de espectros, queda limitada en este caso debido a la obtención de espectros característicos muy similares entre todos los ftalatos, que obtienen mayoritariamente el ión m/z 149, correspondiente al anhídrido ftálico, excepto para el DMP que da el ión base m/z 163, correspondiente a $[M-OCH_3]^+$. No es posible la distinción espectral entre los ftalatos ramificados y los lineales con el mismo número de carbonos, pero en el caso del DEHP y el DnOP, su identificación puede basarse en los diferentes tiempos de retención a los que eluyen. Sin embargo, en el caso de mezclas que contengan diferentes cadenas alquílicas y que coeluyan, la identificación y cuantificación queda limitada debido a la falta de fragmentación que permita la confirmación de su estructura (Psillakis y col., 2003). De todas formas, la (EI) MS es la técnica de detección más sensible y es la que se recomienda para cuantificar una mezcla bien resuelta. Utilizando GC-(EI)MS, la adquisición de datos generalmente se lleva a cabo en el modo *full-scan* para la identificación y en SIM la cuantificación, basado en la extracción del ión mayoritario de los ftalatos (m/z 149) (Psillakis y col., 2003). Utilizando GC-(EI)MS el ión base que se forma a m/z 213 y el pico que se observa a m/z 228, corresponden al fragmento $[M-CH_3]^+$ y $[M]^+$ respectivamente. Algunos autores optan por el uso de la CI en vez de la EI para aumentar la sensibilidad y selectividad del método, disminuyendo la fragmentación que se da en la ionización por EI y dando el pico base $[M]$ y en segundo término el ión

isotópico C₁₃ [M+1]⁻. En la tabla 1.3.8. se resumen diversos estudios para la determinación de ftalatos mediante GC-MS en diversos tipos de agua y en sedimentos, especificando los iones m/z utilizados para su identificación. Las columnas capilares utilizadas mayoritariamente tienen fases estacionarias con 5% difenil-95% dimetilpolisiloxano (Psillakis y col., 2003).

Tabla 1.3.8. Métodos GC-MS utilizados para la determinación de ftalatos. Adaptado de (Bermejo-Barrera y col 2010).

Compuestos	Matriz muestra	Columna analítica	Detector Iones	LODs (µg/L)	Ref.
DMP, DEP, DAP, DnBP, BBP, DCHP, DEHP	Agua	DB-5MS-fused silica (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm)	MS: m/z: 163/194, 149/177, 149/189, 149/223 149/206, 149/167, 149/279	0.02-0.05	Farani y col., 2008
DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, DOP	Agua	HP-5MS capilar (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm)	MS. m/z: 163/194, 149/177, 149/223, 149/206/91, 167/149/279, 149/279	0.003-0.01	Psillakis y col., 2003
DBP, DEHP	Agua residual	DB-17-HT (30m x 0.25mm, 0.1µm)	MS		Castillo y col., 2001
DMP, DEP, DBP, DEHP	Agua	PTETM-5 (30 m x 0.25mm, 0.25µm)	FID	28.5, 27.2, 42.7, 60.6 ng/L	Fatoki y col., 2001
DMP, DEP, DnBP, BBP, DEHP, BnOP,	Agua	HP-5MS (cross-linked 5% metil silicona) (30m x 0.25mm, 0.25µm)	MS. m/z: 149 para todos los ésteres de ftalato excepto para DMP (163)	2-27 ng/L	Peñalver y col., 2000
DMP, DEP, DnBP, BBP, DEHP, DnOP	Agua	DB-35 (35% fenil 65% polimetilsiloxano) (30m x 0.25mm, 0.15µm)	ECD	LOQ: 0.003- 0.05	Prokupkovy col., 2002
DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, DOP, DNP	Agua	HP-5MS (5% phenylmethylsiloxano) (30m x 0.20mm, 0.25µm)	MS. m/z: 163/194, 149/177, 149/223, 149/206/91, 167/149/279, 149/279, 149/167.	0.005-0.04	Luks-Betlej y col., 2001
DEP, BBP, BBP, DEHP, DOP	Agua	HP-5 capilar (30m x 0.32mm, 0.25µm)	MS. m/z:149.177, 149.104, 149.91, 149.167, 149.279	0.07-3.15	Cortazar y col., 2002
DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, DOP	Agua	HP-5MS (30 m x 0.25 mm, 0.25µm) (5% diphenyl, 95% dimetilpolisiloxano)	MS. m/z: 77/163, 149/177, 104/149, 91/ 149, 149/167, 149/ 279	0.1-10 ng/L	Prieto y col., 2008
DEP, DBP, BBP, DEHP	Agua, biosólidos y fango	DB-5MS- silica fundida (30m x 0.25mm, 0.25µm)	MS. m/z: 149/177, 149/223, 149/206, 149/279.	2.0 ng/L y 0.02 ng/g	Tan y col., 2008
DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, BOP	Agua de consumo	TRB-5MS (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm) (5% diphenyl, 95% dimetilpolisiloxano)	MS. m/z: 163/77, 149/177, 149/150, 149/91, 129/112, 149/279	0.15-0.6	Serodio y col., 2006
BBP, DOP	Agua	HP-5MS capilar (30m x 0.25mm, 0.25µm)	MS.	0.02	Brossa y col., 2005
DMP, DEP, DnBP, DuBeP, DEHP, DnOP	Suelos y biosólidos	DB-5MS- silica fundida (30m x 0.25mm, 0.25µm)	MS. m/z: 163 (DMP y DnOP), y 149 (otros PAEs).	0.1-5.0	Gibson y col., 2005
DMP, DEP, DBP, DEHP,	Suelo	Col-elite5 (39m x 0.25mm, 0.25µm)	FID		Adeniyi col., 2008
DEHP	Fango	TRB-Meta X5 Tracer, Technokroma, (30m x 0.25mm, 0.25µm)	MS: m/z: 149/167		Bagó y col., 2005
DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, DOP	Sedimentos	Columna capilar HP-5 (30m x 0.25mm, 0.25µm)	MS. m/z:163/77, 149/177, 149/223, 149/91, 149/167, 149/279	≤25 ng/kg	Cortazar y col., 2005
DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, DOP	Sedimentos	HP-5 fused silica (30m x 0.25mm, 0.25µm)	MS. m/z: 77/163, 149/177, 104/149, 91/149, 149/167, 149/279	0.5-22 ng	Bartolomé y col., 2005
DMP, DEP, DPP, DIBP, DBP, DEHP	Agua	HP-5 capillary column (30m x 0.32mm, 0.25µm)	FID	0.2-4	Kotowska y col., 2006
DMP, DEP, DBP, BBP, BEHP, DOP	Agua residual	ZB-5 MS Zebron (30m x 0.32mm, 0.25µm)	MS. m/z: 194/163/133, 177/149, 223/205/149, 205/149, 279/149,	6-90 ng/L	Ballesteros y col., 2006

1.3.3.2. Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS (MS))

Las desventajas que conlleva la derivatización, como la posible pérdida de muestra con la consecuente reducción en las recuperaciones, aumento en los tiempos de análisis y posible descomposición de algunos metabolitos, unidas al gran desarrollo en los últimos años de las técnicas de cromatografía de líquidos acopladas a espectrometría de masas y de las nuevas generaciones de espectrómetros de masas (de tipo triple cuadrupolo, trampa de iones (IT, *Ion Trap*), tiempo de vuelo o TOF (*Time of Flight*) y Orbitrap, han llevado a la utilización, cada vez más frecuente, de LC-MS y LC acoplada a MS en tándem (LC-MS/MS) para el análisis de contaminantes en general y de algunas clases de EDCs en particular, como es el caso de los compuestos alquifenólicos, el BPA y los esteroides naturales (Petrovic y col.; 2002; Loyo Rosales y col., 2004; Loos y col., 2007; Gallart-Ayala y col., 2010; Iparraguirre y col., 2014). El análisis de varios EDCs como los APs y BPA puede llevarse a cabo también mediante LC acoplada a un detector de fluorescencia (HPLC-FLD) (Huang y col., 2005; Liu y col., 2008; Chao y col., 2013) o de ultravioleta-visible (HPLC-UV/Vis) (Brossa y col., 2002; Shih y col., 2015). Sin embargo, la complejidad de algunas matrices como el agua residual y marina puede dificultar la identificación y cuantificación de los compuestos diana, siendo necesaria una extracción y/o *clean-up* exhaustivo, incrementando el tiempo de análisis y el consumo de disolventes. Estas limitaciones y las de GC-MS pueden evitarse analizando los compuestos mediante LC-MS/MS (Singh y col., 2015; Locatelli y col.; 2016; Scognamiglio y col., 2016).

La LC presenta las ventajas frente a la GC de poder determinar compuestos térmicamente inestables, polares y de alto peso molecular y de no requerir un proceso de derivatización (Petrovic y col.; 2002). Así, la técnica de LC-MS ha permitido ampliar el número de contaminantes orgánicos que se pueden identificar en las aguas, y que antes estaba limitado, por la polaridad, a los compuestos que se podían determinar por GC.

El uso de columnas monolíticas, LC a altas temperaturas y LC a altas ultra presiones (UHPLC) permiten reducir el tiempo de análisis de los EDCs sin comprometer la resolución ni la eficiencia de separación (Scognamiglio y col., 2016). Con el objetivo de aumentar la resolución cromatográfica en el análisis de EDCs, se ha ido disminuyendo el tamaño de partícula de la fase estacionaria hasta unas pocas micras, lo que ha obligado a utilizar sistemas capaces de soportar altas presiones para lograr que la fase móvil fluya a través de la columna analítica. De esta forma, dependiendo del tamaño del particulado que componga la fase estacionaria, puede considerarse la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) con partículas de hasta 3.5 μm , o la LC de ultra alta eficacia o resolución (UHPLC, *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*) con partículas < 2 μm . Las principales ventajas de la UHPLC es que permite disminuir los tiempos de adquisición con mayor resolución y sensibilidad y eficacia en la separación, con menor uso de disolventes. El bajo flujo requerido por las columnas capilares proporciona la máxima eficiencia de ionización en electrospray (ESI), y consecuentemente, se obtiene mayor sensibilidad. También se han utilizado columnas de tamaño de partícula sub-2 mm para mejorar la resolución y disminuir el tiempo de análisis, porque estas columnas proporcionan mejor eficiencia de pico (Gallart-Ayala y col., 2010). Se ha utilizado esta columna para determinar surfactantes como NPnEOs, NP, OP, NP₁EC y OP₁EC en agua residual textil (González y col., 2008). Adicionalmente, se ha propuesto la inyección directa de muestra usando análisis de inyección de flujo (FIA, *Flow injection analysis*) acoplado a espectrometría de masas, para el cribado o *screening* de estos compuestos en muestras de agua (Barceló y col., 2003).

La resolución cromatográfica y la sensibilidad del método mediante LC-ESI depende de la composición de la fase móvil. Utilizando ESI en combinación con disolventes apróticos como acetonitrilo (sin aditivos), los APnEOs y sus derivados halogenados muestran una gran afinidad por iones metal alcali, y los espectros de masas son siempre dominados por los iones $[M+Na]^+$. Si se utilizan disolventes próticos, como el metanol, entonces los iones $[M+Na]^+$ serán mayoritarios y constituirán el ión principal, aunque el ión molecular protonado $[M+H]^+$ y otros iones como $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+(H_2O)_n+Na]^+$, y $[M+(H_2O)_n+H]^+$ también están presentes en el espectro. Para APnEOs altamente etoxilados, también se han descrito iones aducto de amonio o sodio doblemente cargados, como $[M+_2NH_4]^{2+}$ y $[M+_2Na]^{2+}$. Los iones mono-cargados son utilizados actualmente para propósitos de cuantificación, como sucede por ejemplo en el análisis de rutina de APnEOs en muestras medioambientales, donde han sido monitorizados ambos iones, $[M+Na]^+$ (Petrovic y col., 2002b) y $[M+NH_4]^+$ (Andreuet y col., 2007). También se utiliza SIM basado es estos iones aductos para cuantificar los homólogos individuales de OPnEOs y NPnEOs con un analizador de masas de un solo cuadrupolo. Adicionalmente, puede obtenerse información sobre las cadenas etoxiladas registrando el espectro *full-scan*, porque este espectro muestra series de masas desplazadas 44 Da, que corresponden a unidades etoxi (CH_2CH_2O) (Petrovic y col., 2002b). Este perfil hace posible determinar la longitud de las cadenas etoxiladas y la distribución de los diferentes homólogos de APnEOs en un único pico cromatográfico (Andreu y col., 2007). Estos iones son relativamente estables, y generalmente no se observa más fragmentación.

Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem:

En los últimos veinticinco años las técnicas de LC-MS(MS) han avanzado en sensibilidad, especificidad y fiabilidad y actualmente LC-MS/MS es junto con GC-MS, la técnica más utilizada para determinar EDCs (Scognamiglio y col., 2016). La necesidad de determinar la presencia de contaminantes en el medioambiente a niveles de concentración cada vez más bajos y obtener datos de alta calidad ha incrementado el uso de la HPLC en tandem, que permite obtener bajos límites de detección sin derivatización previa y reducir el tiempo de adquisición (Petrovic y col., 2003; Careri y col., 2003; Gallart-Aya y col., 2010; Petrovic y col., 2010; Iparraguirre y col., 2014). Por tanto, la aplicación de tecnologías avanzadas LC-MS/MS al análisis medioambiental, ha permitido ampliar el rango de contaminantes medioambientales a determinar.

Con los grandes avances producidos en los últimos años en espectrometría de masas, principalmente instrumentos de alta resolución con espectrometría de masas en tándem, se han obtenido poderosas nuevas técnicas de identificación. Los espectrómetros de masa híbridos de alta resolución, como el QTOF, triple cuadrupolo hiperbólico, QqLIT LIT-FT y Orbitrap permiten obtener una alta exactitud de masa para identificar los compuestos diana y *non target* en matrices complejas. Por tanto, son ampliamente utilizados para el análisis de contaminantes orgánicos a nivel traza, debido a la información cualitativa imprescindible que obtienen al permitir la adquisición de espectros en *full scan*, que proporcionan la masa exacta del ion producto. De esta forma, el espectro de ion producto, la elucidación estructural de compuestos *non target* o desconocidos, así como la identificación de compuestos diana, puede ser alcanzada con un grado de certeza mucho más amplio permitiendo evitar falsos positivos, especialmente en estudios que incluyen nuevos productos de transformación y metabolitos (Galcerán y col., 2009). Basado en la bibliografía más reciente disponible, cada vez hay más estudios que desarrollan métodos multiresiduo y en particular,

metodologías analíticas para la determinación de compuestos alquilfenólicos y BPA en matrices medioambientales mediante LC-MS/MS (Salgueiro-González y col., 2017). En el capítulo 2 se incluye la determinación de las familias de EDCs seleccionadas mediante –LC-MS(MS).

Los avances en la técnica triple cuadrupolo permiten obtener mayor selectividad, especificidad y sensibilidad en los métodos desarrollados, lo cual permite cuantificar a concentraciones de sub-ppb y sub-pt. Los instrumentos híbridos QqTOF y QqLIT son ampliamente utilizados, sin embargo, la aplicación del Orbitrap en laboratorios es menos frecuente debido al elevado coste que hace esta técnica no sea económicamente asequible a la mayoría de laboratorios medioambientales (Petrovic y col., 2010). Recientemente Chen y col., determinaron estrógenos, APs y BPA de un total de 20 compuestos en aguas con extracción SPE y compararon el análisis mediante espectrometría de masas de triple cuadrupolo y un híbrido Orbitrap con cuadrupolo y MS de alta resolución, obteniendo mejor linealidad y precisión del método con QqQ-MS pero mayor efecto matriz con muestras de aguas superficial y entradas de EDARs, mientras que con el Q-Orbitrap-HRMS obtuvieron límites de detección entre 2-33 veces más bajos (Chen y col., 2016).

En la HPLC-MS en tándem, la cuantificación se realiza mediante los diferentes iones resultantes de la fragmentación de los iones precursores para la disociación inducida por colisión (CID) en el modo de monitorización de reacción múltiple (MRM) o monitorización de reacción seleccionada (SRM). Pueden monitorizarse 2 transiciones SRM para cada compuesto: el primero, más abundante, para cuantificación, y el segundo, para confirmación (Díaz-Cruz y col., 2003). Aunque exista una fragmentación que proporcione más información de los analitos para su confirmación, incluso así, algunos autores establecen unos criterios de confirmación para la identificación de los analitos, como son que los tiempos de retención de los analitos no han de diferir más de un 2% de los de los estándares. Por otra parte, las abundancias relativas absolutas de como mínimo dos iones de transición seleccionados no tienen que diferir más de un 20% de las abundancias de los iones obtenidos a partir de los estándares (Zhang y col., 1999; Gentili y col., 2002; Díaz-Cruz y col., 2003; Locatelli y col., 2016).

Las interfases de ionización más utilizadas en LC-MS/MS son la API, más adecuada para la determinación de compuestos de polaridad media o baja, mientras que la principal ventaja de la interfase ESI es que permite la ionización de un amplio rango de compuestos incluyendo analitos más polares (Petrovic y col., 2010; Locatelli y col. 2016). Sin embargo, el efecto matriz asociados a ESI, son superiores a los observados con otros tipos de técnicas de ionización (Benijts y col., 2004). Estas interferencias debidas especialmente a matrices complejas, constituyen una de las principales dificultades de la LC-MS/MS, que causa la supresión de la señal del analito produciendo resultados erróneos. Como consecuencia, se requiere un eficiente *clean up* o limpieza de las muestras más complejas (Scognamiglio y col., 2016).

Se ha realizado la determinación de EDCs mediante diferentes modos de **electroforesis capilar (CE)**, técnica de separación rápida, con alta eficacia y sensibilidad para la extracción de compuestos, como la electroforesis capilar por zonas (CZE) y la cromatografía micelar electrocinética (MEKC, *Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography*). Así, se han determinado esteroides sexuales naturales y sintéticos, alquilfenoles y BPA (Regan y col., 2003), siendo la MEKC la técnica electroforética que presenta más ventajas (Fogarty y col., 2003), con la que se han extraído DMP, DEP, DBP, DEHP y DOP en sedimentos, obteniendo LODs en el rango de 0.050-0.063 mg/kg (Bao-Yuan Guo y col., 2005).

Supresión iónica y efecto matriz

El **efecto matriz** es un tema crítico para el análisis cuantitativo en LC-MS, y requiere suficiente atención durante el desarrollo del método. Los extractos de muestras reales deben ser usados en una etapa inicial del desarrollo del método, porque el efecto matriz puede tener un serio impacto en la elección del tratamiento de muestra más apropiado, fuente de ionización de espectrometría de masas y modo de adquisición de datos (Galcerán y col., 2009).

El efecto matriz consiste en una disminución o aumento de la respuesta instrumental del analito debido a la presencia de otros componentes. Es decir, para la misma concentración de analito, el análisis de una muestra real o de una disolución estándar del analito puro no proporciona la misma respuesta instrumental. Puede provocar un error sistemático proporcional, es decir, dependiente de la concentración de analito en la muestra.

Uno de los problemas más comunes en el análisis de muestras del medio ambiente es que el extracto obtenido mediante las técnicas de extracción usuales contiene típicamente un gran número de componentes de la matriz, que pueden co-eluir con los analitos y comprometer el análisis cuantitativo (Petrovic y col., 2010). En el análisis de algunos EDCs mediante cromatografía principalmente en la LC, es común encontrarse con variaciones en la respuesta inducidas por componentes de la matriz, resultando en aumentos o supresiones de la señal cromatográfica y consecuentemente en la pérdida de la exactitud, precisión y sensibilidad del método que conducen a cuantificaciones incorrectas y a una confirmación insegura (Marín y col., 2009).

La **supresión iónica** es uno de los mayores problemas en LC-MS con fuentes de ionización API, especialmente con ESI. La supresión sucede por la competición entre varios iones en la fuente de ionización. Puede originarse principalmente por la presencia de aditivos tampón, componentes de la matriz de la muestra y separación cromatográfica deficiente (Gallart-Ayala y col., 2009). Respecto a la supresión iónica causada por el **efecto matriz**, la co-elución de componentes de la matriz puede interferir con la señal de los analitos. En este caso, las dos formas más efectivas de eludir este problema son, introducir una mejora en la preparación de la muestra y un aumento en la selectividad cromatográfica. Para reducir el efecto de la matriz, especialmente en muestras muy sucias, como son las aguas residuales y principalmente las muestras de fangos y sedimentos, hay autores que utilizan procedimientos de extracción muy selectivos y exactos, realizando una eficiente limpieza de la muestra (clean-up), o aplicando patrones internos o utilizando aditivos en la fase móvil (Petrovic y col., 2001)

Por tanto, a fin de corregir variaciones de la señal atribuidas en su gran mayoría a los efectos de la matriz resultante tras todo el proceso de extracción y purificación, se disponen de las siguientes estrategias:

- 1) dilución de la muestra o extracto: reduce el contenido de materia indeseada pero conlleva en la mayoría de los casos una disminución de la sensibilidad;
- 2) aplicación de métodos de extracción y purificación más selectivos (pre-tratamiento de la muestra) con el fin de eliminar los interferentes;
- 3) cambio de la fuente de ionización (cuando la ionización de los compuestos lo permite) a fuentes menos afectadas por compuestos interferentes; por ejemplo, cambiar de ESI a APCI;
- 4) uso de patrones internos (IS, del inglés *Internal Standard*).

La aplicación o no de las 3 primeras técnicas está limitada por la naturaleza de las muestras y de los analitos.

Consiste en adicionarle a las muestras patrones internos, es decir, compuestos de la misma naturaleza que los analitos o en muchos casos los mismos analitos, pero marcados isotópicamente. Cualquier variación sufrida por estos IS se atribuye a los efectos de matriz, permitiendo corregirlos.

Si se usan como IS compuestos similares en estructura a los analitos (por ejemplo, equilin como IS para analizar los estrógenos), el efecto que la matriz provoque sobre estos compuestos será similar a la causada sobre los analitos, pero no idéntica. Las principales limitaciones que presentan el uso de patrones internos son la ausencia de disponibilidad comercial de ciertos compuestos marcados y su elevado coste, aumentando ambas desventajas a medida que crece la multiresualidad del método.

Por otro lado, el uso de patrones internos estables marcados isotópicamente (SILIS, del inglés *Stable Isotopically Labeled Internal Standard*) permite corregir satisfactoriamente el efecto de la matriz y otras posibles fuentes de errores durante todo el proceso de extracción y preparación de la muestra (Marin y col., 2009), de forma que constituye la mejor forma de eliminar la influencia del efecto matriz en la cuantificación. Por ese motivo el uso de compuestos marcados isotópicamente del tipo 2H (deuterio), 13C, 15N o 17O al inicio del proceso de extracción, se ha transformado en una herramienta cada vez más aplicada por los científicos (a pesar de su alto coste) para el control de todos los efectos indeseados causados durante todo el proceso de análisis. Sin embargo, la disponibilidad limitada de estos patrones descarta la aplicación general de un método de dilución isotópica (ID, *Isotope Dilution*, donde la señal de cada analito se corrige de forma individual por la señal resultante de la adición de su propio análogo marcado isotópicamente al inicio del proceso (por ejemplo, DEHP-d₄ como IS para analizar DEHP). Esta técnica exige la aplicación de un gran número de SILIS, lo que la transforma en una técnica de altísimo coste que no todos los laboratorios están en condiciones de utilizar.

En el caso de los compuestos alquilfenólicos, además de la falta de patrones marcados, hay una necesidad de patrones puros de compuestos alquilfenólicos individuales. La complejidad de las mezclas hace difícil una cuantificación precisa de las muestras medioambientales porque los factores de respuesta no son siempre idénticos para los diferentes oligómeros, y los isómeros introducen incertidumbre en los resultados cuantitativos. Además, las muestras medioambientales normalmente contienen mezclas con una composición diferente de la de los patrones disponibles, Por tanto, la falta de patrones (nativos y marcados) es un problema crítico en el análisis cuantitativo de estos compuestos.

Por tanto, para **solucionar el efecto matriz** y los problemas con las recuperaciones en el tratamiento de las muestras, si los patrones marcados están disponibles comercialmente, generalmente se utilizan patrones de recuperación (*surrogates*) y cuantificación mediante dilución isotópica. Esta aproximación permite corregir el efecto matriz y las recuperaciones, porque los analitos y los compuestos marcados tendrán ambos el mismo comportamiento que los analitos a determinar. Sin embargo, si los patrones marcados no están disponibles, varios estudios presentan alternativas al propio analito marcado, usando generalmente como IS otros compuestos similares a los analitos a determinar para el análisis cuantitativo cuya probabilidad de encontrarse en la muestra a analizar es muy baja o nula y que comparten ciertas características con los analitos que les hacen comportarse de manera similar en el proceso de ionización. Adicionalmente, compuestos con cierta semejanza estructural pueden comportarse de manera muy diferente frente a la ionización y verse afectados de modo distinto por el efecto matriz (Gallart-Ayala y col., 2009). En conclusión, el efecto matriz continúa siendo un reto en el desarrollo de métodos cuantitativos fiables, aunque el uso de las nuevas fuentes de ionización que son menos sensibles al efecto matriz ofrece nuevas posibilidades.

El análisis de muestras de control (blancos) para verificar la ausencia de contaminación del procedimiento analítico es una práctica habitual, pero en algunos casos es difícil de llevar a cabo, porque puede producirse fácilmente contaminación del ambiente del laboratorio, de forma que pueden detectarse varios compuestos en el material del laboratorio, como por ejemplo contaminación por DEHP o NP.

1.3.3.5. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación de un método analítico consiste en la confirmación, proporcionando evidencias objetivas de que el método desarrollado cumple los requisitos particulares para un uso específico propuesto y que genera resultados de calidad verificable. Es decir, la validación de los métodos analíticos permite caracterizar la eficacia de los métodos analíticos y asegurar la calidad de los resultados.

Diferentes organismos internacionales como la EPA (la Agencia de Protección Ambiental de USA, *The Environmental Protection Agency*), el EURACHEM (*European Analytical Chemistry*), la IUPAC (*Union of Pure and Applied Chemistry*) y otros, han desarrollado criterios y directrices generales para la validación de métodos, los cuales son similares y generan la base para asegurar su fiabilidad.

El estudio de la validación de un método analítico ha de incluir información sobre:

- Exactitud y precisión
- Intervalo lineal de trabajo. Linealidad
- Límite de detección
- Límite de cuantificación
- Estudios de recuperación.
- Selectividad

Se ha determinado el límite de cuantificación (LOQ, *limit of quantification*) y el límite de detección (LOD, *limit of detection*) es decir, la menor concentración de analito que puede cuantificarse y detectarse respectivamente con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones del experimento establecidas, mediante el el procedimiento descrito por la IUPAC, en el cual el valor del LOQ y el LOD han de ser respectivamente 10 y 3 veces superior a la relación señal/ruido (S/N) Hao y col., (2007) describen los procedimientos DIN 32645 del Instituto de Estandarización Alemán y el procedimiento de la EPA. y revisan los métodos en los cuales se han utilizado. Para la determinación del LOQ, para el análisis de los EDCs en el medio acuático se ha utilizado el procedimiento descrito por la IUPAC, en el cual el valor del LOQ ha de ser 10 veces superior a la relación señal/ruido (S/N) (Hao y col., 2007).

Se ha determinado la linealidad del método analítico o la capacidad de mantener invariable la pendiente de la función de calibrado para el intervalo de concentraciones de trabajo, midiendo la intensidad de la señal por triplicado en cada nivel de 6 concentraciones crecientes de estándares analíticos en LC-MS(MS) La linealidad del método se verifica mediante el coeficiente de regresión (r^2) de las rectas de calibrado utilizadas para la cuantificación de los compuestos, considerada aceptable a valor $\geq 0,995$.

El Intervalo lineal de trabajo o intervalo de concentraciones para las cuales la intensidad de la señal es lineal, se ha determinado entre el límite de cuantificación del método optimizado y la concentración lineal más alta del método analítico desarrollado.

La precisión, expresada como Desviación Estándar Relativa (RSD%), y evaluada a distintas concentraciones, cuantifica la variabilidad de los resultados analíticos, en función del operador, de las manipulaciones inherentes al método y al medio ambiente del laboratorio entre otros

Se han realizado medidas de precisión de las posibles fuentes de variabilidad:

- *la repetitividad o repetibilidad*, medida efectuada en las mismas condiciones sobre el mismo analito y durante un corto intervalo de tiempo, se ha realizado analizando la misma muestra consecutivamente con el mismo equipo, mientras que
- *la reproducibilidad o* medida de la precisión de los resultados del método analítico sobre el mismo analito, se ha realizado en condiciones diferentes para incluir posibles fuentes de variación aleatoria de los datos, de forma que se evalúa mediante la obtención de resultados de experimentos independientes, llevados a cabo en diferentes días.

La exactitud o grado de concordancia entre el valor real o valor de referencia y el valor medido, se expresa cómo % de recuperación. Los errores sistemáticos o determinados (ej: errores instrumentales, del método y personales), tienen una causa asignable y un valor definido y afectan a la exactitud, mientras que los errores aleatorios o indeterminados corresponden a variables no controladas y no pueden corregirse, y afectan a la precisión.

Recuperación: es el porcentaje de la concentración real de analito recuperado durante el proceso analítico. Consiste por tanto en la exactitud (R, Recuperación, *Recovery*) y en la repetibilidad (CV%, coeficiente de variación) del método. Se han calculado las recuperaciones de los diversos EDCs estudiados para validar el método analítico con muestras fortificadas, realizando entre cinco y seis réplicas por muestra, obteniendo las desviaciones estándares relativas (RSD) para cada compuesto. Se considera aceptable entre el 80%-120%.

Muchas veces, como medida para evaluar la fiabilidad de los métodos analíticos desarrollados es recomendable organizar y participar en los llamados estudios interlaboratorio. Este tipo de ejercicios son muy comunes en el campo de la Química analítica ambiental. Las determinaciones en el laboratorio están sometidas a múltiples fuentes de error y en su conjunto determinan la calidad del análisis. Con los estudios interlaboratorio se pueden detectar las posibles fuentes de error, las cuales pueden clasificarse en tres:

- Errores en la etapa de pre-tratamiento y preparación de la muestra (por ejemplo, extracción, pre-concentración y purificación).
- Errores en la etapa de medida (por ejemplo, errores en el calibrado, interferencias en la separación y detección de los analitos)
- Errores del propio laboratorio (por ejemplo, los errores cometidos por el analista).

La AOAC ("*Association of Official Analytical Chemists*") define un ensayo interlaboratorio como un estudio analítico que involucra diferentes laboratorios que analizan una misma muestra con la finalidad de validar los métodos utilizados en el análisis. Generalmente, diferentes laboratorios determinan el mismo grupo de sustancias, en las mismas matrices ambientales, mediante métodos diferentes (cada laboratorio

utiliza el método que ha desarrollado), o a veces todos los laboratorios utilizan el mismo método. El objetivo principal es asegurar la comparación de los datos generados, mediante la aplicación de diferentes métodos analíticos. Muchas veces se organizan estudios interlaboratorio dentro del marco de proyectos europeos, para comparar y evaluar la fiabilidad de los resultados generados por los propios participantes a lo largo del proyecto (Farré y col., 2008).

Por otra parte, la exactitud se comprueba verificando la trazabilidad de los resultados de un método analítico mediante la comparación con una referencia. De acuerdo a las indicaciones de la Comisión Europea y el NIST (del inglés "*National Institute for Standardization*"), otra manera de validar los métodos analíticos consiste en el análisis de materiales de referencia certificados o CRM (*Certified Reference Materials*). Un CRM es un "material de referencia que tiene certificados uno o varios de sus valores de una o más de sus propiedades por procedimientos técnicamente válidos llevados a cabo por un organismo competente" (ISO 1992). La validación de métodos cromatográficos permite que tengan gran aplicación en protocolos analíticos estandarizados, como por ejemplo el método de la EPA 539, basado en el análisis mediante LC-MS/MS en modo de ionización positivo y negativo, proporcionando LOD de 0,1 ng/mL para algunas hormonas (Scognamiglio y col., 2016).

1.3.4. ANÁLISIS BIOLÓGICO DE COMPUESTOS DISRUPTORES ENDOCRINOS

Las técnicas biológicas tienen un gran potencial como dispositivos pequeños y rentables para determinaciones *in-situ*. Adicionalmente, muchas de estas técnicas se presentan en formatos sencillos de usar, dan resultados de forma rápida y rentable, y ofrece nuevas herramientas analíticas para aplicaciones medioambientales, especialmente a nivel de *screening* o cribado. Las técnicas biológicas aplicadas junto al análisis químico dan información más completa sobre el posible impacto biológico de los efluentes, matrices complejas. Sin embargo, la validación de estas técnicas es muy importante, especialmente si van a ser introducidas en el mercado e incorporadas en programas de control de la contaminación (Farré y col., 2005).

Las técnicas biológicas más relevantes y más aplicables al *monitoring* y evaluación medioambiental son clasificadas comúnmente como bioensayos, técnicas inmunoquímicas y biosensores, de acuerdo a sus principios técnicos (Farré y col., 2005; Zhao y col., 2009; Suri y col., 2009; Blasco y col., 2009).

Bioensayos: Aplicados al análisis medioambiental, tienen como objetivo medir efectos biológicos globales de una sustancia o mezcla, como toxicidad, genotoxicidad o estrogénicidad, o evaluar parámetros globales, como la demanda biológica de oxígeno (BOD). Una característica importante de los bioensayos es que miden la toxicidad conjunta de todos los compuestos presentes en la muestra, tanto conocidos como desconocidos (*non target*). Los bioensayos son un componente importante para examinar la presencia e integrar los efectos de sustancias biológicamente activas (como los estrógenos) en mezclas complejas, ya que estos efectos no siempre pueden ser elucidados de sus concentraciones. Los bioensayos complementan las técnicas analíticas y son generalmente significativamente más sensibles que los métodos químico-analíticos e inmuno-analíticos. Adicionalmente, proporcionan una combinación de potencia y dosis, y no requieren un conocimiento previo de la naturaleza química de una muestra. Los bioensayos pueden ser *in vivo* o *in vitro*; estos últimos son herramientas muy adecuadas para examinar la presencia de mezclas complejas de concentraciones bajas.

Inmunoensayos: Usan complejos de anticuerpo y antígeno (también denominados inmunocomplejos) para medir la presencia de un analito específico en una muestra. Las técnicas inmunoquímicas y en particular el inmunoensayo enzimático ELISA, son ampliamente descritos a continuación y en el capítulo 3 de esta tesis.

Biosensores: son un dispositivo analítico constituido por un componente biológico tal como una enzima, un anticuerpo o una célula, que es inmovilizado en un elemento de reconocimiento, el cual está comunicado con un sistema de transducción que transforma la señal bioquímica en eléctrica cuantificable (Ocampo y col., 2007). Rodríguez-Mozaz y col. (Rodríguez-Mozaz y col., 2006) describieron la aplicación de uno de los primeros biosensores ópticos desarrollados (River ANALyser, RIANA) al análisis simultáneo de tres contaminantes orgánicos medioambientales relevantes (atrazina, isoproturón y estrona) en muestras de agua reales. (Rodríguez-Mozaz y col., 2004).

1.3.4.1. Técnicas biológicas o bioensayos. Clasificación

Tal y como hemos visto, los bioensayos son herramientas biológicas para la determinación del efecto (positivo o adverso) de una sustancia o mezcla, cuantificando este efecto en organismos vivos o sus componentes. A continuación, se describen los principales tipos de bioensayos referentes a las distintas expresiones de toxicidad, desde el punto de vista del análisis medioambiental (toxicología acuática, genotoxicidad y estrogénicidad) (Farré y col., 2005):

Bioensayos toxicológicos: las respuestas biológicas en diferentes organismos vivos a una sustancia o mezcla tóxica son diversos, y dependen de la sensibilidad de los organismos. Para estudiar la toxicidad de una sustancia o mezcla, se recomiendan baterías de diferentes tests para especies de los distintos niveles tróficos. Según Farré y col. (Farré y col., 2005), los bioensayos de toxicidad pueden ser clasificados en función de:

- Las especies a testar: bioensayos individuales, bioensayos implicando diferentes especies y bioensayos basados en infraorganismos (ej: células o tejidos) o respuestas bioquímicas.
- El tiempo de exposición; su toxicidad puede agruparse en aguda (tiempo de exposición corto, 96h), sub-aguda (implicando que el organismo testado sobrevive a la exposición y la medida está basada en el crecimiento o reproducción); crónica (el test examina los efectos de exposición prolongada y por tanto los efectos sub-agudos) y tests de reproducción, que pueden ser dirigidos a una única generación o, especialmente para peces, a un ciclo de vida completo.
- El tipo de especies involucradas a testar: se utilizan varios vertebrados e invertebrados acuáticos, gusanos de tierra, protozoos y semillas para realizar bioensayos de toxicidad.

Bioensayos de genotoxicidad: la genotoxicidad está asociada con diferentes estructuras como fenoles y constituyen un *screening* o cribado precoz (*early screening*) para posible cáncer induciendo actividad de contaminación. Entre los basados en microorganismos, el más utilizado ha sido el test de Ames, establecido como método de análisis de rutina. Otros bioensayos de genotoxicidad son los basados en *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* o *Escherichia coli*, bastante utilizado (Moreau y col., 1976).

Bioensayos de estrogénicidad: se han desarrollado varios bioensayos para determinar la actividad de los compuestos estrogénicos en el medioambiente. Los ensayos basados en la fuerza de unión de una sustancia al receptor de estrógenos están bien establecidos. En el próximo apartado se incluyen los ensayos *in vivo* e *in vitro* más utilizados para la determinación de la estrogénicidad de la muestra (E-SCREEN, YES, ER-CALUX, etc). (García Reyero y col., 2004):

Los **ensayos biológicos (BBA, Biological Based Assays)** proporcionan métodos de detección alternativos a los tradicionales análisis basados en la masa y pueden darse por diversos mecanismos, incluyendo proliferación celular, enlaces a ligandos, inducción de vitellogenina, inducción de luciferasa o interacciones anticuerpo-antígeno. En particular, los principales tipos de BBA para la determinación de EDCs en base a la clasificación de EDCs en monitorización medioambiental (Campbell y col., 2006; Chang y col., 2009) son:

Ensayos con organismos completos (Whole Organism assays): Para monitorizar la contaminación en el medio acuático, un potencial procedimiento es la medida de la disrupción endocrina en anfibios, peces, pájaros e insectos (Campbell y col., 2006). Las poblaciones de ranas son particularmente sensibles a la exposición de EDCs, con la observación de anomalías en las gónadas del 10-92% de ranas macho (*Rana pipiens*) en Estados Unidos (Hayes y col., 2002). Por ejemplo, la US EPA ha desarrollado algunos ensayos de peces y otros utilizando las siguientes especies (en inglés): *rainbow trout*, *fathead minnow*, *sheephead minnow* y *Zebrafish* (Folmar y col., 2000; Legler y col., 2002a). Algunas de estas especies han sido diseñadas genéticamente para responder a los EDCs (ej: los peces cebra (*zebrafish*) transgénicos (Legler y col., 2002a) y los peces medaka (Kuraichi y col., 2005)). Presentan la ventaja de evaluar *in vivo* el impacto real de la estrogenicidad en especies diana. Adicionalmente, algunas de estas especies habitan en diferentes ecosistemas y por tanto pueden servir como indicadores biológicos de áreas particularmente impactadas. Por otra parte, la principal limitación es la falta de especificidad de respuesta de un organismo a varios EDCs. Pueden no identificar causa y efecto o una localización específica como origen. Sin embargo, estos indicadores tienen el potencial de proporcionar una respuesta estrogénica acumulativa a la exposición de una mezcla de EDCs en un determinado ecosistema (Campbell y col., 2006).

Bioensayos celulares (Cellular bioassays): Son ensayos con buena sensibilidad, pero que pueden no proporcionar de forma consistente una respuesta cuantitativa repetible para EDCs específicos en muestras medioambientales complejas. Algunos bioensayos celulares y la correspondiente respuesta que proporcionan son:

- E-SCREEN, ensayo en el que se generan más células en la presencia de estrógeno y proporciona una respuesta de proliferación celular, por ejemplo, células de cáncer de mama MCF-7 (Soto y col., 1995).
- YES (*Yeast Estrogen Screen*), respuesta colorimétrica (Routledge y Sumpter 1996; Silva y col., 2002; Legler y col., 2002). El ensayo YES tradicional se refiere al desarrollado por Routledge y Sumpter (Routledge y Sumpter 1996). Las células están diseñadas con un gen receptor de estrógenos humano, el cual enlaza a un elemento de respuesta estrogénico, plásmido de expresión regulada (*lac-Z*) codificado para expresar β -galactosidasa (Campbell y col., 2006).
- ER-CALUX, respuesta luminiscente, bioensayo comercialmente disponible que utiliza células humanas de adenocarcinoma de mama para expresar el enzima luciferasa, que será luminiscente cuando esté expuesto a un compuesto químico estrogénico (Legler y col., 2002).

Ensayos no celulares (Non cellular assays): (Campbell y col., 2006). Muchos son cuantitativos y proporcionan límites de detección razonables para la medición de EDCs, como por ejemplo el ensayo inmunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), basado en la unión de un anticuerpo a un disruptor endocrino y el ensayo ELRA (*Enzyme Linked Receptor Assay*), que consiste en una enzima unida a un receptor como proteína de unión. Ambos ensayos miden la concentración de EDCs (Seifert, 2004) y han sido aplicados a muestras medioambientales directamente (Seifert y col., 1999; Hock y col., 2002).

Ensayos *In Vitro* vs ensayos *In Vivo*

Los bioensayos *in vitro* (también llamados bioensayos *effect-directed*) están reconocidos como herramientas bioanalíticas sensibles de *monitoring* para *screen* o cribar contaminantes en base a su acción biológica, mientras que los métodos analíticos químicos e inmuno (*compound-directed*) proporcionan un método de absoluta cuantificación de ciertos compuestos en muestras de agua, pero las propiedades toxicológicas de estos compuestos no siempre son conocidas.

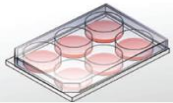

Ensayos *In Vitro*: A su nivel más simple, miden el grado de enlace, normalmente al receptor de estrógenos (ER), conocido como *competitive ligand binding assay*. Los ensayos *in vitro* para identificar nuevos EDCs y para elucidar su mecanismo de acción son sensibles, rápidos, su alta especificidad les permiten obtener límites de detección más bajos que con análisis químico (Gomes y col., 2003), presentan un alto rendimiento en lo que al número de muestras que pueden procesar se refiere (high throughput), y son más económicos que los tests *in vivo*. Son capaces de determinar la actividad disruptora endocrina de un químico vía un modo de acción específico y pueden también investigar efectos sinérgicos o aditivos (Silva y col., 2002). Sin embargo, el valor de estos ensayos es limitado para los estudios de evaluación de riesgos, ya que no tienen en cuenta la complejidad de los animales (Eertmans y col., 2003). Por otro lado, hay sustancias que, aunque no sean estrogénicas *in vitro* pueden ser transformadas en metabolitos estrogénicamente activos *in vivo* (Ankley y col., 1998). Zacharewski y col., publicaron un completo resumen de los estudios *in vitro* y sus limitaciones (Zacharewski y col., 1997).

En la tabla 1.3.9. se incluyen algunos de los ensayos *in vitro* comunes. Los Ensayos de "gen reportero" (*Reporter gene assay*) o *Recombinant Receptor-Reporter Assays* evalúan la capacidad de las sustancias para activar o inducir la transcripción de un gen después de la activación del receptor hormonal. Se emplean cultivos celulares de mamíferos o de levaduras como la *Sacharomyces Cerevisiae*. Fueron desarrollados para utilizarlos en un test para identificar compuestos que pueden interactuar con el receptor de estrógenos humano (hER). El principio consiste en integrar la secuencia de DNA de un receptor humano en un cromosoma principal de la levadura (Routledge y Sumpter, 1996). Pueden ser utilizados en varios ensayos agonistas y antagonistas. Entre los distintos ejemplos de ensayos, destaca por su relación con esta tesis el:

- *Yeast estrogen screen* (YES) en aguas superficiales (Grover y col., 2011) en efluentes de EDARs (Li y col., 2010, Brix y col., 2010) y en agua embotellada (Wagner y col., 2009).

Ensayos *In Vivo*: Hay un amplio rango de ensayos *in vivo*, que utilizan cambios fenotípicos, como expresión de proteínas o efectos en el peso de un órgano (Gomes y col., 2003). Las especies mamíferas más utilizadas son las ratas, ratones, conejos y perros. Los bioensayos generalmente consisten en administrar la sustancia a testar por un determinado periodo de tiempo con un *endpoint* endocrino/reproductivo determinado (por ej: fertilidad y fecundidad, anormalidades y malformaciones de los fetos, etc). También existen varios bioensayos medioambientales con peces, pájaros, reptiles e invertebrados (ej: *Daphnia magna*). Su aplicación a la determinación de compuestos con actividad estrogénica es limitada, porque son ensayos caros y que requieren tiempo, y adicionalmente su uso para estos propósitos puede levantar cuestiones éticas. Su principal aplicación la constituye la validación de otras técnicas, ya sea para cribado o vigilancia ambiental. Son necesarios para la evaluación de impactos de contaminantes sobre el sistema endocrino, y se ha propuesto que los estudios de reproducción multigeneracional son el último ensayo para identificar efectos adversos y deberían ser llevados a cabo con estudios de toxicidad.

Tabla 1.3.9. Ventajas, limitaciones y principales aplicaciones de los ensayos *in vitro* e *in vivo*.

	Ensayos IN VITRO 	Ensayos IN VIVO 
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Sensibles ✓ Alta especificidad ✓ Rápidos y fáciles de usar ✓ Alto rendimiento (<i>high throughput</i>) ✓ Más económicos ✓ Pueden determinar: <ul style="list-style-type: none"> • la actividad disruptora endocrina • efectos sinérgicos o aditivos 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Mejor previsibilidad ✓ Evaluación del sistema endocrino entero
Limitaciones	<ul style="list-style-type: none"> • Necesita confirmación o validación mediante otras técnicas • No apropiado para estudios de evaluación de riesgos (porque no tienen en cuenta la complejidad de los animales) • Falta de previsibilidad 	<ul style="list-style-type: none"> • Ensayos caros • Requieren bastante tiempo • Requerimientos éticos y de bienestar animal si se realizan ensayos con vertebrados u otros animales protegidos por ley
Principales aplicaciones	<ul style="list-style-type: none"> • Ensayos de <i>screening</i> o cribado para compuestos con actividad estrogénica 	<ul style="list-style-type: none"> • Ensayos de confirmación o validación de otras técnicas para cribado o vigilancia ambiental • Estudios de evaluación de riesgos
Principales ensayos	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Test de unión al receptor endocrino humano (Receptor binding assays)</u>: (Grunfeld y col., 2004, Pillon y col., 2005) • <u>Ensayos de proliferación celular (Cell proliferation assays)</u>: uno de los más utilizados para la detección de compuestos estrogénicos, <ul style="list-style-type: none"> ○ Ensayo <i>E-Screen</i> (Soto y col., 1995). • <u>Ensayos de "gen reportero" (Reporter gene assay)</u>: emplean cultivos celulares de mamíferos o de levaduras como la <i>Sacharomyces Cerevisiae</i> (Routledge y Sumpter, 1996). Ej: <ul style="list-style-type: none"> ○ <i>Yeast estrogen screen</i> (YES) (Li y col., 2010; Brix y col., 2010; Grover y col., 2011) ○ <i>Yeast Androgen Screen</i> (YAS) (Li y col., 2010). ○ <i>Yeast Anti-Androgen Screen</i> (YAAS) (Grover y col., 2011). ○ <i>Retinoic Acid Receptor (RAR)</i> (Allinson y col., 2011). 	<ul style="list-style-type: none"> • Ensayo uterotrófico de 3 días en roedores (ensayo <i>in vivo</i> más utilizado. (Owens y col., 2002)) • Ensayo de Hershberger de 5 y 7 días en roedores. (Hershberger y col., 1953). • Ensayo de pubertad en roedores hembra y macho. (Gray y col., 2002). • Ensayo de reproducción en peces. (Hutchinson y col., 2000). • Ensayo de la metamorfosis de la rana. (Yaoita y col., 1997).

Los bioensayos se utilizan predominantemente como herramientas para identificar y confirmar compuestos o muestras con actividad de disruptión endocrina. En conclusión, ningún test *in vivo* o *in vitro* es apropiado para determinar si algún compuesto (o mezcla) es, parece ser o no es un disruptor endocrino. Por tanto, los métodos propuestos se han focalizado en identificar un grupo de técnicas y un rango de puntos finales (*end points*) que serán lo suficientemente robustos.

Generalmente, la sensibilidad de los ensayos *in vitro* es menor que la de los ensayos *in vivo* (Gomes y col., 2003) pero, en cualquier caso, los resultados obtenidos con los bioensayos *in vitro* tienen que ampliarse mediante tests *in vivo*, en los que la interacción con el mecanismo de regulación del sistema endocrino de un animal es más compleja. Estos tests *in vivo* se pueden emplear para estudios de evaluación de riesgos (Eertmans y col., 2003).

La estrogenicidad ha sido también medida como la presencia de **vitelogenina (VTG)** en peces macho. VTG es una proteína plasmática específica de las hembras (Sumpter y Jobling, 1995; Heppell y col., 1995), ampliamente aceptada como bioindicador de exposición a compuestos estrogénicos en peces e invertebrados acuáticos (Matozzo y col., 1998). Es un precursor de la yema de los huevos en hembras, mientras que en peces macho no tiene ninguna función biológica y su síntesis puede producir efectos negativos a nivel tanto individual como poblacional, por lo que su detección en peces macho es una reconocida respuesta a la presencia de compuestos químicos estrogénicos (Tyler y col., 1998). El contenido anormal de VTG en hembras, así como modificaciones en el balance de hormonas sexual ha sido propuesto como un biomarcador fiable y complementario de perturbaciones reproductivas potenciales (Folmar y col., 1996, 2001). La vitelogenina puede medirse por muchos métodos: RIA, ELISA y Western Blot (Gomes y col., 2003).

1.3.4.2. Ensayos con Levaduras Recombinantes: RYA (*Recombinant Yeast Assay*).

Entre los diferentes ensayos de estrogenicidad funcionales disponibles en la actualidad, el ensayo de levaduras recombinantes (RYA) es uno de los más convenientes para evaluar el potencial endocrino de disrupción de una sustancia o de una muestra ambiental (Céspedes y col., 2004). RYA nos ofrece una información cualitativa de la capacidad de disrupción endocrina de los contaminantes.

Desde el punto de vista científico, el estudio de las levaduras como modelo biológico ha contribuido de manera muy importante a elucidar los procesos básicos de la fisiología celular. La levadura, es un organismo del que se conoce totalmente su genoma, además, es considerado como modelo de célula eucariótica. En particular, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* fue el primer eucariota cuyo genoma fue secuenciado en su totalidad. Posee un genoma pequeño, solamente una cuantas veces mayor que el de *Escherichia coli* y 200 veces menor que el de células de mamífero, lo cual simplifica de manera importante el análisis genético y molecular del mismo.

El ensayo RYA está basado en una cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* modificada genéticamente, desarrollada por el departamento de Genética de Glaxo (Inglaterra). Routledge y Sumpter (1996) pusieron a punto el ensayo con la finalidad de analizar los principales grupos de agentes tensioactivos debido a la aparición de daños en el sistema reproductivo, problemas en el desarrollo y la elevada incidencia de cánceres, detectados tanto en los seres humanos como en la vida silvestre, relacionados con los contaminantes ambientales capaces de imitar las actividades biológicas de los estrógenos. La modificación a la que se sometió consiste en la adición de un receptor estrogénico humano en el ADN de la levadura (hER- α) instalándose como un gen cromosomal, y un gen reportero a nivel plasmidial (Lac-Z), el cual codifica para la síntesis del enzima β -galactosidasa gracias a la ayuda de un promotor transcripcional o elemento de respuesta estrogénica (ERE) y a un promotor fuerte (PGk) (Roda y col., 2006). Un esquema semejante se ha usado en la construcción de la cepa usada en esta tesis (Noguerol y col., 2006).

En la figura 1.3.3. se muestra la comparación entre el mecanismo de la respuesta hormonal a una célula de mamífero y a una célula de la levadura *S. Cerevisiae*, a la que se ha incorporado el receptor de estrógenos humano y el ERE (elemento de respuesta a estrógeno) del gel de la vitelogenina de *Xenopus laevis*. En la figura 1.3.4. se muestra la aplicación, el mecanismo de acción de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante en el ensayo Yeast Estrogen Screen (YES).

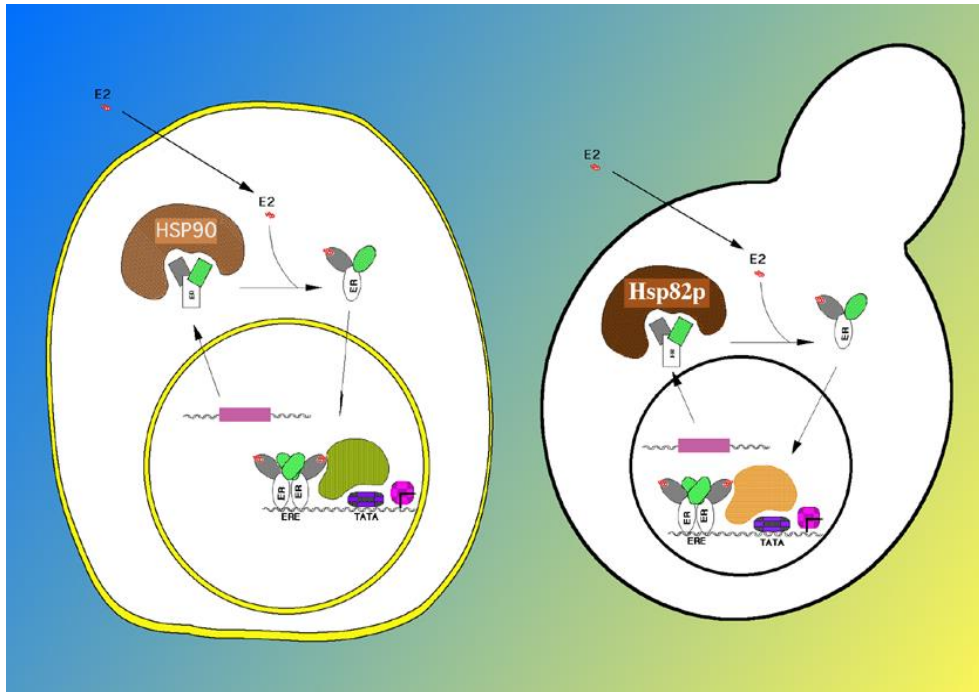


Figura 1.3.3. Comparación entre el mecanismo de la respuesta hormonal a una célula de mamífero (izquierda) y a una célula de la levadura *S. cerevisiae* (derecha).

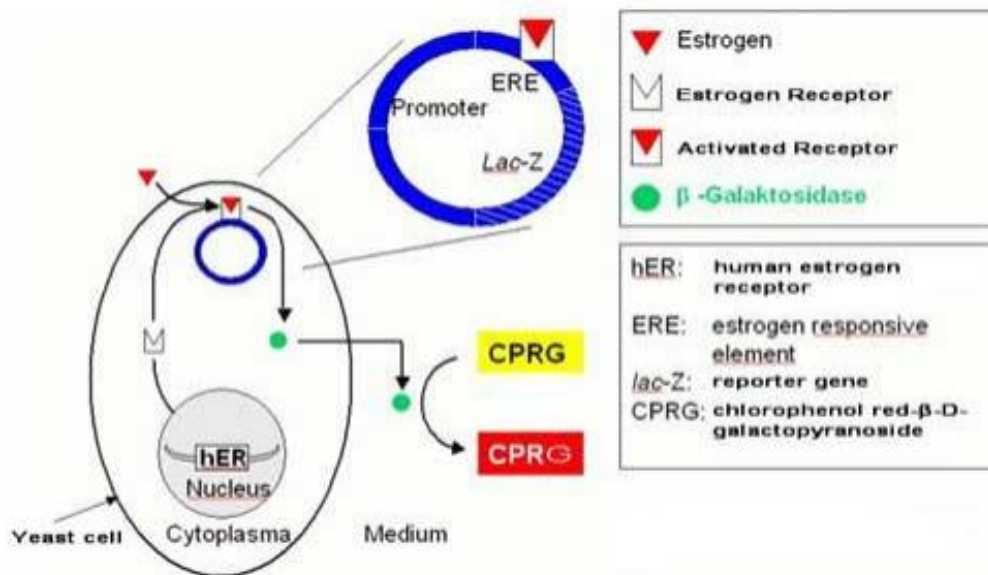


Figura 1.3.4. Mecanismo de acción del *Saccharomyces cerevisiae* recombinante en la técnica YES. Esquema que muestra las reacciones en cadena en la levadura (*S. Cerevisiae*) inducidas por la unión de un compuesto estrogénico a su receptor específico (ER). Ensayo YES con detección colorimétrica (Routledge & Sumpter, 1996).

Dos características de la célula de levadura contribuyen al éxito de los ensayos RYA. En primer lugar, la levadura no tiene un sistema endógeno homólogo a receptores de vertebrados que podrían interferir en el ensayo. En segundo lugar, el proceso de post traducción y plegamiento de la proteína de vertebrado en levaduras es muy similar a la de las células de mamíferos, lo que resulta en la preservación de la estructura del receptor nativo cuando se expresa en levadura. Esto es de interés primordial, ya que la estructura correcta del dominio de unión a ligando del receptor determina la especificidad del sistema, es decir, su capacidad para distinguir entre los ligandos y los no-ligandos (Noguerol y col., 2006, Noguerol, 2007).

Una gran ventaja del ensayo de levaduras recombinante es que mide directamente la respuesta total de estrógeno y se tienen en cuenta los eventuales efectos sinérgicos o antagonistas de las mezclas químicas. Sin embargo, los ensayos RYA tienen algunos inconvenientes. En algunos casos, las especies que interactúan con los receptores celulares de los vertebrados *in vivo* no son el compuesto original, sino uno de sus metabolitos, fruto de las biotransformaciones. Además, los ensayos RYA no permiten la caracterización química exacta de los ligandos de los receptores hormonales, es decir, del compuesto con actividad disruptiva endocrina, sólo la detección y cuantificación de la actividad total, agonista o antagonista de un compuesto dado o de la muestra que lo contiene. Sin embargo, el uso de levaduras para estudiar la estrogenicidad tiene muchas ventajas por su bajo coste, fácil manipulación y crecimiento rápido en el laboratorio, lo que proporciona la oportunidad de probar un gran número de muestras o compuestos pobremente caracterizados, así como evaluar simultáneamente su toxicidad aguda (Céspedes y col., 2004; Noguerol y col., 2006). Todo ello ha hecho que los ensayos RYA, que ofrecen una información cualitativa de la capacidad de disrupción endocrina de los contaminantes, sean uno de los métodos más elegidos en este campo. Por ejemplo, la detección de Vtg (vitelogenina) en sangre e hígado de peces se considera un método estándar para detectar disrupción endocrina. Requiere un anticuerpo específico para cada especie de pez que se quiere analizar, así como una cantidad relativamente elevada de muestra, obtenida por extracción de sangre o por disección del hígado.

Estudios previos han indicado que el uso de ensayos basados en levaduras modificadas genéticamente puede ser una metodología altamente fiable para un primer nivel de cribado en la evaluación de la calidad del agua en términos de actividad estrogénica (Pawlowski y col., 2003; Reddy y col., 2005; Schmitt y col., 2005). Los bioensayos para la determinación de la actividad estrogénica basados en levaduras se utilizan principalmente con fines de investigación dentro de la vigilancia ambiental (Thomas y col., 2004; Céspedes y col., 2005; Tollefsen y col., 2007). Sin embargo, un enfoque diferente consistiría en cribar muestras ambientales desconocidas para su actividad estrogénica total sin conocimiento de la presencia de compuestos individuales. En este enfoque, la idea es usar el ensayo como un método de selección previo a su análisis químico; por lo tanto, básicamente debe dar respuestas afirmativas o negativas respecto a si hay o no actividad hormonal. Las muestras con una respuesta positiva pueden ser analizadas adicionalmente por técnicas cromatográficas para identificar y cuantificar los compuestos activos. El propósito de este tipo de pruebas es realizar una eliminación rápida y barata de muestras que tienen bajas actividades estrogénicas y permitir así un mayor análisis en profundidad de las muestras que dan una clara respuesta positiva en el bioensayo (Brix y col., 2010).

En este sistema cualquier compuesto con actividad estrogénica presente en el medio se une al receptor hormonal de estrógenos (hER) y forma un complejo que dimeriza. Este dímero se une al Elemento

de Respuesta a Estrógenos (ERE) y se activa la transcripción del gen LacZ. El enzima β -galactosidasa se libera al medio transformando un determinado sustrato en un producto fácilmente detectable (Noguerol, 2007). El producto de la reacción se detecta mediante lectura espectrofotométrica a 550 nm. La cinética de la aparición del nuevo compuesto está directamente relacionada con la cantidad de enzima producido, que a su vez se relaciona con la concentración del compuesto estrogénico (Noguerol y col., 2006). Con este tipo de ensayo se pueden detectar una gran variedad de compuestos estrogénicos, ya que el hER no sólo se une a esteroides femeninos, como 17- β -estradiol y sus derivados, sino que puede unirse a otros tipos de estructuras químicas con efectos feminizantes. Gran cantidad de compuestos naturales, farmacéuticos o industriales como plaguicidas, presentan actividad estrogénica, es decir, pueden actuar como ligandos del hER y dar positivo en el ensayo (Céspedes y col., 2004; Noguerol, 2007).

La levadura detecta la presencia de un contaminante con potencial estrogénico. El contaminante se une al receptor hormonal (hER), el cual se transforma en un receptor activo, éste estimula al activador transcripcional y se expresa el gen reportero produciéndose el enzima β -galactosidasa, el cual sale al medio y actúa sobre un sustrato cromógeno. El producto de la reacción se detecta mediante lectura espectrofotométrica a 550 nm. La cinética de la aparición del nuevo compuesto está directamente relacionada con la cantidad de enzima producido, que a su vez se relaciona con la concentración del compuesto estrogénico (Noguerol y col., 2006).

En RYA, la expresión del gen reportero es monitorizada por su actividad enzimática o fluorescente, utilizando técnicas cuantitativas. Esta actividad está directamente relacionada a la concentración efectiva de compuestos estrogénicos a través de una curva típica sigmoideal de dosis respuesta. El sistema no proporciona una medida directa de la concentración molar (o en masa) de los EDCs, sino de su actividad estrogénica. Para simplificar, los resultados son dados en "equivalentes hormonales", definidos como la cantidad de un ligando estándar (el estrógeno para los receptores de estrógenos, progesterona para el receptor de progesterona y testosterona o dihidrotestosterona para el receptor de andrógenos, etc), que debería estar presente en una muestra dada para ser la causa de toda la respuesta observada. También se suele utilizar la detección por fluorescencia en lugar de la colorimétrica. En este caso, el enzima β -galactosidasa actúa sobre el sustrato Mu-Gal que se añade al medio, cuyo producto genera fluorescencia (Noguerol y col., 2006) y se lee con una longitud de onda de excitación y de emisión de 360 nm y de 460 nm respectivamente.

La finalidad de un *screening* con un ensayo basado en levaduras, es obtener una respuesta si/no respecto a la actividad estrogénica. Es decir, la idea no es utilizar este ensayo cuantitativamente. Esto quiere decir que los parámetros más importantes a evaluar son las respuestas de falsos positivos, falsos negativos, las variaciones estándar y el límite de detección:

- Las respuestas falsos positivos en teoría no son un problema, ya que la muestra será analizada posteriormente mediante una técnica analítica (LC-MS(MS) en nuestro caso). Sin embargo, los falsos negativos son más importantes, ya que la muestra no será posteriormente analizada y por tanto los posibles compuestos estrogénicos permanecerán sin detectar.

- El límite de detección, especialmente en la presencia de una matriz, es muy importante. Si el ensayo no tiene un LOD suficientemente bajo con una preparación de muestra razonablemente simple, no se cumplirá el requerimiento de fácil de usar.

Se determinaron los falsos positivos y negativos. Solo hubo una muestra que no dio ninguna respuesta estrogénica, y correspondió a la muestra de metanol. Después de eliminar los *outliers*, solamente fue posible para esta muestra un resultado, y por tanto no parece ser un problema cuando hay una mayor frecuencia de respuestas positivas. Respecto a las respuestas de falsos negativos, depende de a que concentraciones se espera que el ensayo sea capaz de detectar estrogénicidad.

El LOD para la determinación cinética de la actividad β -galactosidasa puede ser calculada como los mínimos valores de la pendiente significativamente diferentes de los del control negativo. En el caso de ER-RYA, en el cual la actividad basal es bajo los límites de detección, los valores significativos de pendiente ($\sigma \leq 0.05$) corresponden a valores de β -Galactosidasa entre el 7 y el 10% de los valores a la concentración saturada de estradiol. En conclusión, los valores de LOD calculados con este método coinciden aproximadamente con EC_{10} , la concentración del ligando que obtiene al 10% de la respuesta máxima. Cuando una curva de dosis-respuesta se lleva a cabo con concentraciones de estradiol crecientes, este valor de EC_{10} corresponde a 0.34 M de los estudios anteriores.

En conclusión, las muestras con las concentraciones más bajas dan los resultados con mayor variación relativa. Los coeficientes de variación vistos en este estudio son demasiado altos para que el ensayo funcione con éxito como método de *screening* o cribado y son indicadores de que, en cierto modo, el sistema no está bajo control. Por tanto, tiene que ser considerado con un tipo de test o sistema adecuado que debería ser introducido al protocolo.

Potencia estrogénica

El potencial estrogénico de NP en mamíferos fue descubierto por Soto y col., (Soto y col., 1991) y confirmado mediante diversos ensayos *in vitro* (Expresión génica (White, 1994; de Weert y col., 2008), E-screen (Soto y col., 1995; Preuss y col., 2006), Yeast screen (Routledge y Sumpter, 1996) y en estudios con bioensayos *in vivo*.

La evaluación de la potencia de una sustancia estrogénica se realiza normalmente por comparación con la estrogénicidad del E2 y puede estimarse mediante distintos ensayos. Los valores se expresan como factor de equivalencia al estradiol (EEF). No existe un valor universal de EEF asociado a cada compuesto, sino que estos valores están muy relacionados con los valores con el ensayo utilizado.

En función del ensayo empleado, los resultados de los estudios *in vitro* pueden ser bastante diferentes (Gomes y col., 2003). No existe un valor universal de EEF asociado a cada compuesto, sino que estos valores están muy relacionados con los valores con el ensayo utilizado. La potencia relativa del nonilfenol en relación al 17β -estradiol en estos sistemas presenta una alta variabilidad. El ensayo de levaduras recombinantes es el sistema más ampliamente utilizado para análisis de rutina, pero su límite de detección en comparación a la línea celular MCF-7 es más bajo. La potencia estrogénica del E2 es superior en el ensayo ER-calux a la que resulta de aplicar el ensayo con levaduras recombinantes (Legler y col., 2002).

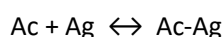
En la tabla 2.8. del capítulo 2 se comparan valores de potencia estrogénica relativa individual de los EDCs estudiados en esta tesis, con valores encontrados en la bibliografía para diversos ensayos (YES, Ensayo MCF7 y ER-CALUX) con los obtenidos mediante el ensayo de levaduras recombinantes (RYA).

1.3.4.3. Técnicas Inmunoquímicas o Inmunoensayos. Clasificación

Los mecanismos de reconocimiento molecular juegan un papel fundamental en el funcionamiento de la gran mayoría de los procesos biológicos. La especificidad de este fenómeno de reconocimiento selectivo de las biomoléculas se ha utilizado para detectar y cuantificar diferentes tipos de analitos, como metabolitos, drogas, biomoléculas, etc. Muchas veces la detección tiene lugar a nivel de trazas, como la determinación de contaminantes del medio ambiente o de residuos en los alimentos. Los sistemas basados en el reconocimiento por parte de anticuerpos son los que actualmente han dado mejores resultados, dando lugar a las técnicas inmunoquímicas, bien establecidas y ampliamente utilizadas en diversos ámbitos analíticos, a nivel clínico, en las áreas medioambientales y agroalimentarias, para la determinación de contaminantes y residuos. Una alternativa al uso de receptores de origen natural la ofrecen los receptores moleculares sintéticos o artificiales, que por una parte intentan mimetizar el fenómeno de reconocimiento molecular que se da en la naturaleza, pero que a la vez intentan limitar los inconvenientes que a veces originan el uso de las biomoléculas, principalmente aquellos derivados de su estabilidad en según que medios, así como su procedimiento de obtención, que en ocasiones se vuelve largo y costoso

Las técnicas inmuno-químicas tienen su origen a final de los años 50 cuando Yalow y Berson desarrollaron un ensayo inmunológico para la detección cuantitativa de la insulina humana a niveles de picogramos por mL en fluidos corporales. A partir de ese momento las técnicas inmuno-químicas se aplicaron tanto a la Bioquímica como a la Endocrinología o a la Química Clínica. Sin embargo, no fue hasta los años 80 que estas técnicas fueron introducidas en el análisis ambiental (Hammock y Mumma, 1980). Desde entonces hasta la actualidad se han desarrollado un gran número de protocolos para la detección de contaminantes, que incluyen desde plaguicidas a residuos industriales.

Las técnicas inmuno-químicas se basan en el mecanismo de reconocimiento inmunológico entre el antígeno (Ag) y el anticuerpo (Ac), elemento clave en el desarrollo de estas técnicas. La reacción Ag-Ab es una interacción reversible que viene determinada por la ley de acción de masas y está basada en interacciones débiles: electrostáticas, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals. Para el sistema Ac-Ag se puede definir una constante de equilibrio o afinidad (K_a), que en ocasiones puede alcanzar valores extremadamente altos (10^{10} M^{-1}):



$$K_a = \frac{[\text{AbAg}]}{[\text{Ab}] [\text{Ag}]}$$

Este elevado grado de afinidad ha convertido estas técnicas en herramientas muy útiles para la detección de compuestos (contaminantes, fármacos, etc) a muy bajas concentraciones y niveles de traza, requiriendo además cantidades de muestra muy pequeñas (de μL a mL). Basándose en esta reacción se han desarrollado diversas técnicas, algunas como herramienta analítica para la detección y cuantificación de sustancias, o en el desarrollo de métodos de tratamiento de muestra para aislar un analito de matrices complejas, en procesos de limpieza y preconcentración de muestras.

Clasificación de las técnicas inmuno-químicas: las más representativas son las siguientes:

- **Análisis Inmunológicos por Inyección de Flujo (FIIA)**
- **Ensayos Inmunológicos:** están basados en el uso de marcadores para la detección de la reacción inmunológica: Radio-Inmunoensayos (RIA), ensayos de Fluorescencia o Fluoroimmunoensayos (FIA); ensayos de Químio-Luminiscencia (CLIA); ensayos Inmuno-Enzimáticos (EIA); Ensayos Inmuno-Enzimáticos en Soporte Sólido (ELISA, *enzyme linked immunosorbent assay*).
- **Inmunosensores**
- **Cromatografía de Inmuno-Afinidad (CIA)**

Las principales ventajas y limitaciones de las técnicas inmunoquímicas son:

Ventajas de las técnicas inmunoquímicas: se caracterizan generalmente por su simplicidad, rapidez de análisis, sensibilidad (pueden detectarse varios analitos a niveles de partes por billón o ng/mL) y especificidad, ya que estas técnicas son diseñadas para ser muy específicas para el análisis de un compuesto individual o una clase de compuestos (Lesnik et al., 2000), por ej. PAHs o PCBs. Una vez se han producido los anticuerpos, se trata de técnicas relativamente económicas. Por otra parte se trata de metodologías que permiten una adaptación a programas de vigilancia y control por el gran número de muestras que en general pueden analizarse en poco tiempo: posibilidad de automatización, pequeños volúmenes de muestra y uso mínimo de disolventes orgánicos. Gracias a su portabilidad, ya que muchos inmunoensayos se venden en kits comerciales que utilizan aparatos muy pequeños, resulta muy fácil utilizarlos para tomar medidas en el campo *in situ*, aunque se ha de tener un gran cuidado en seguir todas las condiciones indicadas, como el intervalo de temperatura eficaz, ya que trabajar fuera de él puede ocasionar la obtención de falsos positivos (Lesnik et al., 2000). El rápido tiempo de respuesta constituye otra ventaja, pudiendo obtener en muchos casos un resultado *in situ* en menos de 1 hora. Este hecho implica un gran ahorro de costes respecto a los métodos convencionales, que comportan el envío de las muestras al laboratorio y la obtención de resultados unos días después, añadido al bajo coste de análisis por muestra comparado con técnicas convencionales como los métodos cromatográficos. Sin embargo, a pesar de las múltiples ventajas, estas metodologías presentan también ciertas limitaciones:

Limitaciones de las técnicas inmunoquímicas: dado que los inmunoensayos son utilizados principalmente como métodos de cribado o *screening* cualitativos, es necesario realizar la confirmación posterior mediante técnicas analíticas convencionales. Por ejemplo en el caso de matrices reales complejas hace falta evaluar con cuidado los posibles efectos no específicos sobre la cuantificación final, ya que estos pueden conducir a una sobre-estimación o dar falsos positivos. La contribución a la respuesta final puede provenir de señales de tipo específico, debidos a la presencia de compuestos estructuralmente relacionados con el analito y que sean también reconocidos en mayor o menor grado por el anticuerpo (fenómeno de reactividad cruzada), o de tipo inespecífico (dando lugar al efecto matriz) procedente de cambios en el medio (ya sea el pH, la salinidad, etc) o de la interacción no específica de los inmunoreactivos con otros componentes de la matriz. Este último puede producir cambios significativos en los principales parámetros del ensayo y que por tanto pueden inducir al error en la medida. Los falsos negativos por otra parte, aunque son más críticos en las técnicas inmunoquímicas, son muy poco habituales, de forma que pueden constituir herramientas de *screening* rápido, complementarias de las técnicas analíticas convencionales.

El inmunoensayo es una de las técnicas más utilizadas actualmente. La cantidad presente del complejo Ac-Ag se cuantifica mediante el uso de marcadores y habitualmente bajo condiciones de competencia, en el caso de analitos de bajo peso molecular (< 500 Da). El procedimiento general consta de una etapa de competencia entre una concentración fija del derivado análogo al analito marcado adecuadamente y el analito libre para una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de antígeno marcado puede entonces ser medida y cuantificada, y en consecuencia también la concentración de analito libre. Se pueden utilizar distintos tipos de marcadores según la respuesta que proporcionan.

Los inmunoensayos pueden realizarse en solución (formato homogéneo) o mediante la inmovilización de uno de los inmunoreactivos sobre un soporte sólido (formato heterogéneo). Las microplacas (de 96 o 385 pocillos) son el formato más habitual para el soporte de manera que permite el procesado de gran número de muestras simultáneamente, siendo necesario poco volumen de muestra. En los ensayos heterogéneos es necesaria una etapa de separación entre la fracción unida y la libre, mientras que en los homogéneos, la detección se lleva a cabo manteniendo las dos fracciones en solución en la mezcla de reacción. Los ensayos homogéneos son más rápidos y simples y pueden adaptarse más fácilmente a analizadores automáticos. Aún así, suelen ser menos sensibles y se encuentran más expuestos a interferencias procedentes de la matriz, de manera que suele ser habitual llevar a cabo etapas de lavado para eliminarlas.

Se han desarrollado un gran número de inmunoensayos para la detección de contaminantes a nivel de traza, como por ej. plaguicidas, residuos industriales o fármacos, tanto en matrices ambientales como de origen biológico. En la tabla 3.2. se incluyen diversos inmunoensayos utilizados para la determinación de compuestos disruptores endocrinos (Goda y col., 2000; Fránek y col., 2001; Ose y col., 2002, DeMeulenaer y col., 2002; Zhao y col., 2002; Matsunaga y col., 2003). En el caso de los plaguicidas, muchos de los inmunoensayos desarrollados han sido comercializados y algunos han sido validados por la EPA e incluidos en sus métodos.

1.3.4.4. Inmunoensayo ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

La técnica ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*) se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, puede ser medido espectrofotométricamente. Está basada en la utilización de marcadores enzimáticos (como la peroxidasa del rábano picante, HRP), y operan en condiciones heterogéneas. Este ensayo inmuno enzimático o inmunoensayo es versátil, robusto, simple en su realización, emplea reactivos económicos y consigue, mediante el uso de la fase sólida, una separación fácil entre la fracción retenida y la fracción libre. Además se han propuesto y desarrollado diferentes métodos de amplificación de la señal (luminiscentes, cascadas enzimáticas,...) que han permitido aumentar la sensibilidad de algunos ELISA siendo superior a la obtenida en el RIA (radioinmunoensayo) hormonal. ELISA constituye el ensayo inmunoenzimático heterogéneo más utilizado debido a su elevada sensibilidad, sencillez y rapidez, y ha tenido una enorme aplicación en todos aquellos campos en los que se precisa la cuantificación de productos mediante anticuerpos: diagnóstico clínico, detección viral, clasificación de anticuerpos en isotipos, búsqueda de anticuerpos monoclonales, etc.

Se han ensayado numerosas fases sólidas, desde los tubos de cristal de los orígenes a las actuales microplacas de 96 pocillos de plástico tratado para aumentar su capacidad de absorción de moléculas y con

fondos de pocillo ópticamente claros para poder realizar las medidas de densidad óptica en espectrofotómetros de lectura de placas (lectores ELISA). Se han desarrollado dispositivos de mayor capacidad, por ejemplo con 384 y 1536 pocillos, adecuados para los sistemas de 'screening' masivo de los sistemas robotizados (HTS, 'High throughput system').

Tipos de ensayo ELISA: Se han desarrollado múltiples variantes de ensayos ELISA que permiten la detección de un anticuerpo, la cuantificación de un antígeno en solución, o la determinación de la subclase (idiotipo) de un Ac. Las configuraciones más comunes de estos ensayos son:

1. Inmunoensayos **Competitivos** (con reactivo limitante): los formatos directo e indirecto se realizan bajo condiciones de competencia, y están diseñados principalmente para la detección de moléculas de bajo peso molecular

2. Inmunoensayos **no Competitivos** (con reactivo en exceso): en esta configuración no se establece competencia y es aplicable para la detección de sustancias grandes como péptidos y proteínas

▪ **ELISA Competitivo Directo:** las placas ELISA se preparan recubriendo los pocillos con las soluciones en las que se sospecha se encuentra el antígeno. En este formato el Ac se inmoviliza sobre la superficie de la fase sólida o a través de un elemento orientador, que puede ser una proteína de elevado peso molecular. En la etapa de competencia, durante la incubación, se establece un equilibrio entre el Ac, el analito libre y el analito o competidor marcado enzimáticamente (el trazador enzimático), ambos en solución. Tras la incubación, se lavan los inmuno-reactivos que resten en disolución para eliminar los que no están unidos y se mide la cantidad de marcador o enzima unido al Ac, de manera que la respuesta enzimática obtenida o concentración del marcador presente en la muestra, es **inversamente** proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra. Es necesario incluir controles negativos (muestras del mismo tipo que las analizadas pero en las que se tenga la certeza de la ausencia del Ag buscado) y controles positivos (soluciones donde existe o se añade el Ag buscado). En otra versión de una configuración directa, menos utilizada, se inmoviliza el derivado del analito unido a una molécula transportadora (el Ag de tapizado), y se encuentra el analito y el Ac específico marcado enzimáticamente en solución.

▪ **ELISA Competitivo Indirecto:** Las placas ELISA se preparan de una forma idéntica a la anterior. Los controles positivos y negativos son los mismos. Sin embargo, en este caso el sistema de detección emplea dos Ac: uno primario contra el Ag, y uno secundario marcado contra el primario. La detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o más Ac secundarios por cada primario. En este formato el antígeno de tapizado se inmoviliza en la placa, pero en este caso la cantidad de analito presente en la muestra se cuantifica **indirectamente** midiendo la cantidad de Ac unido mediante un segundo Ac convenientemente marcado (Anti IgG-enzima) que reconoce específicamente el fragmento Fc del Ac. El analito y el Ac se hallan en disolución. Tras establecerse el equilibrio, a mayor cantidad de analito, menor cantidad de Ac se fija sobre el Ag de tapizado, menor cantidad de segundo Ac marcado se puede unir y menor es la coloración desarrollada. Este formato contempla una etapa más, pero en ocasiones puede ser más robusto al menos respecto a las interferencias que puede provocar la matriz de la muestra sobre la actividad del enzima, ya que la muestra no está nunca en contacto con el reactivo marcado. Es el ensayo más popular, pues un mismo Ac secundario marcado y un mismo sistema enzimático permite cuantificar una gran cantidad de antígenos.

- **ELISA Sándwich:** Ensayo de captura de Ag y detección mediante inmunocomplejos.

En la figura 1.3.5.se representan de forma esquemática los 2 tipos de ensayo estudiados en esta tesis

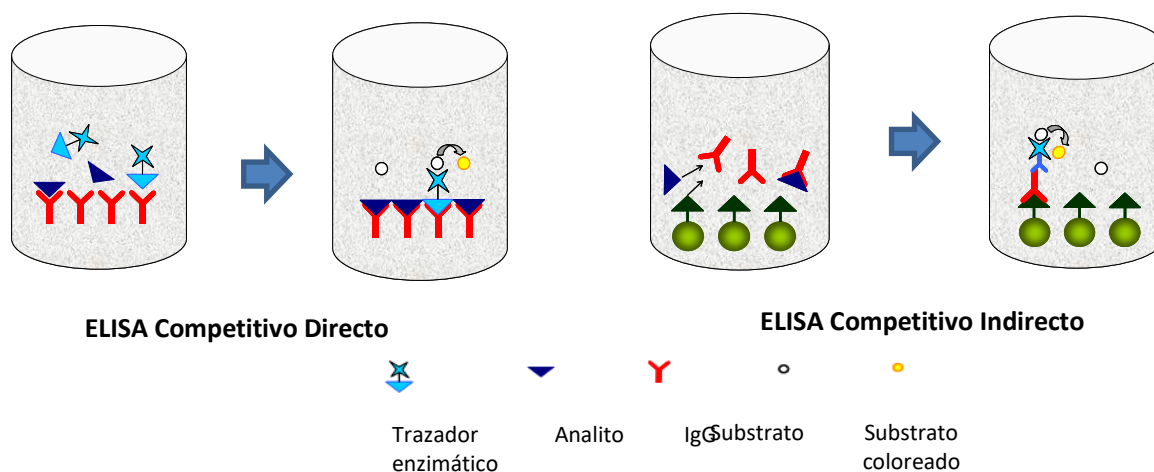


Figura 1.3.5. Principales formatos del inmunoensayo ELISA estudiado (ELISA competitivo Directo e Indirecto)

El **anticuerpo (Ac, en inglés antibody Ab)**, es el elemento clave en el desarrollo de las técnicas inmunoquímicas, dado que su calidad contribuye enormemente a la selectividad y especificidad (Henion, MC., 1998). La producción y uso de Ac para la determinación de insulina fue la primera aproximación en el desarrollo de técnicas inmunoquímicas como metodologías de análisis. Desde ese momento se ha producido un avance importante, en las áreas del análisis clínico, medioambiental y alimentaria, en parte debido también al importante progreso observado en áreas de investigación centradas principalmente en la biología molecular o la ingeniería genética, de forma que se ha favorecido la producción y obtención de Ac más específicos, en cantidades mayores y con menor coste para gran variedad de sustancias.

Los anticuerpos (Ac) son proteínas globulares, de la familia de las inmunoglobulinas (Ig), generadas por el sistema inmune como mecanismo de defensa contra agentes externos (antígenos, Ag) y que contienen cientos de aminoácidos dispuestos en una secuencia dada. Hay cinco familias de inmunoglobulinas diferentes (IgG, IgM, IgA, IgD e IgE) según la estructura y función inmune de la región constante, que se diferencian por la carga, las dimensiones, la secuencia de aminoácidos y el número y tipo de carbohidratos unidos. Según la familia, los efectos que desencadenan al unirse a diferentes proteínas son diferentes. La clase más abundante y utilizada en aplicaciones inmunoquímicas, en el suero de mamíferos, es la clase IgG (de aproximadamente 150 kDa de peso molecular).

Las etapas generales de generación de Ac son (Henion, MC., 1998):


- 1) selección de la molécula diana; 2) diseño de un hapteno, que consiste en la síntesis de un derivado de las moléculas diana para que contenga un grupo apropiado para acoplarse a una proteína; 3) enlace covalente del hapteno a una proteína transportadora (*carrier*) para formar un conjugado hapteno-*carrier*; 4) inmunización del animal.

Actualmente, según la técnica empleada para la producción de Ac se puede trabajar con tres tipos de anticuerpos diferentes: los policlonales, los monoclonales y los recombinantes:

Los **anticuerpos policlonales (PAC)** se obtienen directamente del suero del animal inmunizado, siendo a veces necesaria una etapa de purificación previa a su utilización, de manera que lo que se extrae es una familia de clones que reconocen la estructura general del hapteno de inmunización, y donde cada uno de los cuales muestra una especificidad mayor o menor por los diferentes epítomos o determinantes antigénicos de la molécula. Así pues, la afinidad del suero policlonal será una combinación de la actividad de cada uno de los clones por separado. El conejo acostumbra a ser el animal más utilizado para inmunizar. El mayor inconveniente del uso de PAC proviene de la variabilidad animal, de forma que en muchas ocasiones se observa una falta de reproducibilidad de un animal a otro, lo que puede suponer un problema cuando es necesario el suministro constante del mismo suero.

Por otra parte, los **anticuerpos monoclonales (MAc)** se obtienen por fusión de las células protectoras de Ac (células B) procedentes del bazo del animal inmunizado (habitualmente ratones de la línea BALB/C) con células tumorales derivadas de mielomas. En este caso, y siguiendo un procedimiento largo y laborioso de cribaje y selección, se aísla una única IgG, procedente de un único clon inmortalizado de células B, de manera que teóricamente esta tecnología puede proporcionar cantidades ilimitadas de Ac con la misma afinidad por el antígeno, siempre y cuando la línea celular del hibridoma sea estable. Aun así, todos los procesos involucrados encarecen la producción de MAc, habitualmente superior a la de PAC. Finalmente, dado el progresivo avance observado en las tecnologías de ADN recombinante, se desarrollaron los **anticuerpos recombinantes (RAc)**,

Tabla 1.3.10. Características de los anticuerpos policlonales vs los monoclonales (elaboración propia).



	Anticuerpos <u>policlonales</u>	Anticuerpos monoclonales
Derivados de ...	Múltiples líneas de células B	Una sola línea (clon) de células B
Epitopo	Mezcla de moléculas de inmunoglobulina secretadas contra un antígeno específico pero cada una contra un epítomo diferente	Moléculas idénticas entre sí: reconocen el mismo epítomo
Suministro	Limitado	Ilimitado
Uniformidad	Cambio de propiedades con diferentes sueros y sangrías	Propiedades constantes. Variable según clon
Afinidad	Mezcla de Abs con diferentes afinidades. Puede seleccionarse a posteriori	Puede seleccionarse a priori
Reactividad cruzada	Variable en función de diferentes selectividades	Diferente, depende cada Ab individual
Clases y subclases	Muchos isotipos	Un isotipo definido
Demanda en antígeno	Se requiere alta pureza para un antisuero específico	Pueden ser antígenos impuros, o mezcla de antígenos para inmunización. Antígenos puros para <i>screening</i>
Tiempo de desarrollo	Costo (2-3 meses)	Largo (12 meses)
Coste	Bajo	Alto

La mayoría de las técnicas inmuno-químicas pueden estar basadas en la utilización de anticuerpos MAc o PAC. La utilización de MAc persigue aumentar la especificidad del ensayo y se asegura la disponibilidad de

inmuno-reactivo a largo plazo, pero hay que tener en cuenta los elevados costes que suponen la obtención de MAc. Por otro lado, en ocasiones es más interesante la obtención de Ac capaces de reconocer toda una familia de compuestos y no uno sólo específicamente. Este es el caso de muchos ensayos utilizados en análisis ambiental a nivel de diagnóstico.

Las técnicas inmuno-químicas han ofrecido una nueva visión al análisis medioambiental, por estar basadas en reactivos biológicos ofreciendo al mismo tiempo un gran nivel de especificidad, sensibilidad y capacidad de respuesta. Los Programas de Vigilancia Ambiental (PVA) requieren analizar un gran número de muestras. Mientras los métodos analíticos convencionales requieren instrumentación cara, purificación extensiva y técnicos expertos, el inmunoensayo ELISA constituye una técnica simple y económica alternativa al análisis instrumental, especialmente cuando se requiere el análisis simultáneo de muchas muestras (HTS, *high throughput screening*), que los hace especialmente adecuados para llevar a cabo estudios de campo o vigilancia a gran escala como PVA. Adicionalmente, la capacidad de reconocer no solo el analito diana, sino también otras moléculas estructuralmente relacionadas (reactividad cruzada) puede incluso ser una ventaja al permitir la detección simultánea de por ejemplo un compuesto y sus metabolitos.

Se han producido anticuerpos y se han puesto a punto un gran número de ensayos ELISA para la determinación de contaminantes orgánicos en el medio acuoso que abarcan la detección y cuantificación de familias de compuestos cuyas propiedades químico-físicas son completamente diferentes, como es el caso de los EDCs. Hay que destacar la sensibilidad que presentan muchos de estos ensayos incluso para moléculas de bajo peso molecular y elevada polaridad como ciertos fenoles. Se han desarrollado ensayos para la determinación de EDCs como alquilfenoles polietoxilados (Matsunaga y col., 2003; Goda y col., 2004), nonilfenol (Goda y col., 2000; Fránek y col., 2001; Zerávik y col., 2004; Martíanov y col., 2004 y 2005; Céspedes y col., 2005), octilfenol (Rose y col., 2002; Zerávik y col., 2004; Li y col., 2014), BPA (Galve y col., 2000; Noguera y col., 2002; Zhao y col., 2002; Moreno y col., 2011), estrógenos (England y col., 2002; Hirobe y col., 2004), etc. En la tabla 1.3.11. se resumen diversos estudios de técnicas inmunoquímicas realizados para la determinación de diversos compuestos disruptores endocrinos estudiados en el periodo en el que se llevó a cabo esta tesis doctoral (2000-2005), principalmente los compuestos los alquilfenólicos. Se incluye el correspondiente anticuerpo, sensibilidad (límite de detección y/o IC₅₀), matrices, rango lineal y referencias.

Las principales ventajas que presentan este tipo de técnicas son especificidad y sensibilidad (en función de la calidad de los anticuerpos), capacidad de respuesta, son generalmente técnicas rápidas y que permiten llevar a cabo un gran número de muestras simultáneamente, se pueden llevar a cabo con cantidades muy pequeñas de muestra y no requieren manipular grandes cantidades de disolventes orgánicos. Sin embargo, las principales limitaciones de esta técnica son la reactividad cruzada y los efectos de la matriz de las muestras.

Tabla 1.3.11. Técnicas inmunoquímicas desarrolladas para la determinación de diversos EDCs estudiados. (Los dos estudios llevados a cabo en esta tesis se resaltan en verde).

Analito	Tipo de ensayo	Anticuerpo	Matrices	LOD ^a y/o IC ₅₀ ^b (ng/L)	Rango lineal (ng/L)	Referencias
NP	ELISA	monoclonal	Tampón	LOD = 10		(Goda y col., 2000)
NP	ELISA Directo	monoclonal	Tampón	LOD = 76	250- 10.000	(Fránek y col., 2001)
NP	FIIA	monoclonal	Tampón	LOD = 52 IC ₅₀ = 1033	100- 5000	(Fránek y col., 2001)
NP	ELISA Indirecto	policlonal	Tampón	IC ₅₀ = 590	nr	(Fránek y col., 2001)
NP	PFIA	policlonal	Tampón	LOD = 7900 IC ₅₀ = 42000	nr	(Fránek y col., 2001)
NP	ELISA Directo	monoclonal	Tampón	IC ₅₀ = 769	8 - 8192	(Rose y col.,2002)
NP	Biosensor CIA-GDH	monoclonal	Tampón	IC ₅₀ = 4.481		(Rose y col., 2002)
NP	Kit comercial ELISA Directo	monoclonal		nr	50 – 2.000	www.takeda.com.jp (2003)
NP	FIIA	monoclonal	Tampón	LOD = 52 IC ₅₀ = 1033		(Badea y col., 2003)
NP	ELISA Colorimétrico	monoclonal	Muestras de agua	LOD = 0.76	10 – 100	(Samsonova y col.,2003)
NP	ECL	monoclonal	Muestras de agua	LOD = 0.06 IC ₅₀ = 2.0		(Samsonova y col.,2003)
NP	PFIA	policlonal	Tampón	LOD = 8000 IC ₅₀ = 53000 MC LOD = 9000 IC ₅₀ = 42000	53 mg/ L	(Yakovleva y col., 2003)
NP	FPIA	policlonal	Muestras de agua	LOD = 7000 IC ₅₀ = 53000	18 – 300 µg/ mL	(Yakovleva y col., 2004)
NP	ELISA Directo	policlonal / monoclonal	?	IC ₅₀ = 11.5 (4-n-NP) IC ₅₀ = 40 (4-NP _{téc.})		(Zerávik y col., 2004)
NP	ELISA	policlonal	Muestras de agua	LOD = 10		(Mart'ianov y col., 2004)
NP	ELISA Indirecto	policlonal	Muestras de agua	LOD = 10 IC ₅₀ = 246-291		(Mart'ianov y col., 2005)
NP	ELISA Directo	policlonal	Muestras de agua		5 - 1000	(Céspedes y col., 2006)
AP	ELISA	monoclonal	tampón	LOD = 10	70 - 1000	(Goda y col., 2000)
AP	ELISA	monoclonal	Suelos Aguas superf. subt. y resid.	LOD = 1.5 GW	0.01 5000 0.25-1000 LC-MS/MS	(Goda y col., 2000)
AP	ELISA PFIA	policlonal	tampón	LOD = 1 nM	50 – 1000	(Meulenberg y col., 2007)
APnEOs	ELISA	monoclonal		LOD = 16 IC ₅₀ = 79		(Matsunaga y col., 2003)
APE	(BMPs) based immunoassay	monoclonal		LOD = 6.6	6.6 - 66000	(Goda y col., 2004)
APes	ELISA Directo Kit Comercial	monoclonal		nr	50 – 2.000	(Matsunaga y col., 2003)
APnEOs	ELISA	monoclonal		LOD = 16 IC ₅₀ = 79		(Matsunaga y col., 2003)
APE	(BMPs) based immunoassay	monoclonal		LOD = 6.6	6.6 - 66000	(Goda y col., 2004)
APes	ELISA Directo Kit Comercial	monoclonal		nr	50 – 2.000	(Matsunaga y col., 2003)

Analito	Tipo de ensayo	Anticuerpo	Matrices	LOD ^a o IC ₅₀ ^b (ng/L)	Rango lineal (ng/L)	Referencias
AE(C ₁₂ EO ₇)	Plate-type ELISA	monoclonal	Agua fortificada destilada, de grifo y de río	IC ₅₀ = 71 LOQ = 20	20 – 1000	www.takeda.com.jp
AE(C ₁₂ EO ₇)	Tube-type ELISA	monoclonal	Agua fortificada destilada, de grifo y de río	IC ₅₀ = 12 LOQ = 2	2 – 100	(Goda y col., 2005)
BPA	ELISA	monoclonal	Tampón	LOD = 5.0	5 – 500	(Goda y col., 2000)
BPA	ELISA Indirecto	policlonal	Agua	IC ₅₀ = 570		(De Meulener y col., 2002)
BPA	ELISA	policlonal	¹ agua ² Suero	LOD = ¹ 0.1 LOD = ² 2	1 – 10.000	(Zhao y col., 2002)
BPA	Cromatografía inmunoafinidad	policlonal		nr		(Zhao y col., 2003)
BPA	ELISA	monoclonal		LOD = 0.05		www.takeda.co.jp
BPA	Inmunoensayos BMPs	monoclonal	Tampón	LOD = 0.0023	0.0023 - 2300	(Matsunaga, y col., 2003)
BPA	ELISA	policlonal			2 - 1000 .	(Kim y col., 2007)
BPA	ELISA Directo	policlonal		LOD = 0.035 nM		(Meulenberg y col., 2007)
BPA	ELISA Directo	monoclonal	Revest. Latas de comida	LOD = 50 IC ₅₀ = 0270		(Moreno y col., 2011)
Ésteres de ftalato / DBP	ELISA Directo	monoclonal	Tampón	LOD = 200	200 - 4000	(Goda y col., 2000)
E2	ELISA	Policlonal	Suero	50	1.8–250.04	(England y col., 2002)
E1, E2, EE2	ELISA	Policlonal	Efluentes EDAR	LOQ = 50	50–5.000	(Hirobe y col., 2004)
E1, E2, EE2	ELISA	Policlonal	Agua residual	50	50–5.000	(Farré y col., 200X)
E1, E2, EE2, E3, PROG, TES	ELISA	Policlonal	Agua residual entrada y efluente agua potable, agua cruda	LOD = 0.2–5 LOQ = 5	2–4.000	(Swart y col., 2007)
E1, E2, EE2, TES	ELISA	Policlonal	Agua residual entrada y efluente	LOD = ±0.97	NR	(100 y col., 2013)
E1, E2, EE2	ELISA		Sedimentos	LOQ = 0.43–1.8 ng/g	NR	(102 y col., 2014)
E1, E2, E3, EE2, PROG	ELISA	Policlonal	Agua residual	0.2- 5	50–5.000	(Manickum y col., 2015)
Atrazina	FIIA	monoclonal		LOD = 0.05 IC ₅₀ = 3.8	0.15 - 10	(Fránek y col., 2000)
Atrazina	ELISA Kit	policlonal	tampón	LOD = 0.02		(Banks y col., 2003)
Atrazina	Inmunoensayo fluorescente		tampón	LOD = 0.5		(Feng y col., 2003)
Atrazina	Polielectrolito-ELISA	policlonal	Agua superficial y residual	Test midpoint = 12	3 - 100	(Framer y col., 2005)
Atrazina	Express-FIIAA	policlonal	Agua superficial y residual	Test midpoint = 5	0.3 - 100	(Kramer y col., 2005)
Simazina	FIIA	monoclonal		LOD = 0.15 IC ₅₀ = 10.4	0.15 - 10	(Fránek y col., 2000)

3.1.3.5. COMBINACIÓN DE TÉCNICAS QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS

El análisis químico es generalmente insuficiente para evaluar contaminantes presentes en el medio ambiente y estimar su potencial endocrino, ya que lo que se detecta viene dictado por lo que se está buscando, es decir, las concentraciones individuales de los compuestos *target* para los cuales se han optimizado previamente los métodos analíticos.

Adicionalmente a los métodos químico-analíticos e immuno-analíticos que están previstos para detectar compuestos individuales y proporcionan un método de absoluta cuantificación de ciertos compuestos en muestras de agua, pero las propiedades toxicológicas de estos compuestos no son siempre conocidas, los métodos biológicos complementan las técnicas analíticas ya que, entre otros, pueden medir la actividad total estrogénica y androgénica resultante de todos los EDCs presentes en el medio acuático, incluyendo los desconocidos (*non target*). Los efectos de mezclas químicas no siempre pueden ser elucidados de sus concentraciones, por tanto los bioensayos son un componente importante para examinar su presencia, e integrar los efectos de mezclas complejas de EDCs.

Los bioensayos son generalmente significativamente más sensibles, rápidos y económicos que los métodos químico-analíticos e immuno-analíticos. Adicionalmente, proporcionan una combinación de potencia y dosis y no requieren un conocimiento previo de la naturaleza química de una muestra. Los resultados bioanalíticos han confirmado que un número considerable de efluentes en Europa son estrogénicos (Brack y col., 2007). Los bioensayos combinados con fraccionamientos basados en la toxicidad, pueden tener en cuenta interacciones dentro de mezclas complejas que no son posible considerar en análisis químico de residuos convencional. Sin embargo, actualmente se utilizan varios ensayos diferentes y uno de los problemas a resolver es la estandarización e inter-comparación de los diferentes efectos medidos. Adicionalmente, debido a los diferentes modos de acción y *end-points*, un único bioensayo no es suficiente y una batería de ensayos, incluyendo los *in vitro* y *in vivo*, que evalúan ambos mecanismos de acción, mediados por receptor y no-receptor, parecen ser el camino más apropiado para evaluar el potencial de EDCs en muestras medioambientales complejas (Petrovic y col., 2004). Por tanto, para la evaluación del riesgo de mezclas complejas medioambientales, debe intentarse identificar posibles contaminantes en vez de enfocarse solamente en los contaminantes diana seleccionados a priori (Brack y col., 2005).

La combinación de ensayos biológicos y análisis químicos ha seguido dos tendencias diferentes: una es el desarrollo de nuevas herramientas bioanalíticas y la evolución de las ya existentes, como por ejemplo los biosensores. La otra tendencia deriva del requerimiento de relacionar la contaminación química en ecosistemas a efectos ecotóxicos medibles (Blasco y col., 2009). La integración de ambos tipos de técnicas, químicas y biológicas permite obtener una información global más completa. En la siguiente tabla (Tabla 1.3.12.) se resumen las principales ventajas y limitaciones de cada tipo de técnicas (químicas y biológicas), así como de la integración de ambas técnicas, que permite relacionar causa y efecto.

Tabla 1.3.12. Características de las técnicas biológicas vs las técnicas químicas y ventajas de la integración de ambas, adaptado de (Gomes y col., 2003).

	Técnicas BIOLÓGICAS	Técnicas QUÍMICAS
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Determinación de actividad endocrina para una muestra o compuesto individual ✓ Identifican actividad endocrina con consideración de interacciones metabólicas 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Proporcionan identificación e información estructural de compuestos diana individuales presentes en la muestra ✓ Cuantifican analitos a niveles traza (ng/L o menores)
Limitaciones	<ul style="list-style-type: none"> • Pueden cuantificar EDCs como EEq • Pueden sufrir reactividad cruzada y generalmente específicos a compuestos químicos individuales • Es común su confirmación por análisis químico • Variación entre bioensayos y cuando se compara con técnicas químicas 	<ul style="list-style-type: none"> • Requieren una extensa preparación de muestra, especialmente con matrices complejas • No pueden determinar la actividad disruptora endocrina de una muestra o mezcla • No dan información o interacción con otros químicos en matrices complejas
INTEGRACIÓN de Técnicas QUÍMICAS & Técnicas BIOLOGICAS		
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Pueden unir o relacionar causa y efecto ✓ Aumento de sensibilidad y selectividad 	

Algunos puntos a tener en cuenta en la combinación de técnicas químicas y biológicas según (Wadhia y col., 2007) son:

1. Los métodos biológicos complementan el análisis químico para la evaluación de la toxicidad y ofrecen beneficios significativos
2. La necesidad y demanda por tests de ecotoxicidad para la protección del medioambiente continuará en aumento
3. Los bioensayos convencionales que incluyen continuas técnicas de cultivo, son intrínsecamente caros para uso rutinario
4. Los microtestes, ofrecen potencialmente una solución a bajo precio para realizar tests de rutina de muestras medioambientales.

Análisis Dirigido a Efecto (EDA) e Identificación y Evaluación de Toxicidad (TIE)

Los procedimientos más innovadores que combinan métodos químicos y biológicos son aquellos capaces de detectar e identificar tóxicos conocidos y desconocidos (*non-target*) basado en sus efectos en el medioambiente y en relacionar causa y efecto (Bakker y col., 2007). Los dos únicos procedimientos bien establecidos que existen actualmente para identificar directamente los contaminantes causantes de la toxicidad observada en aguas naturales son: Identificación y Evaluación de Toxicidad (TIE, *Toxicity-Identification Evaluation*) y Análisis Dirigido a Efecto (EDA, *Effect-Directed Analysis*). Ambos combinan métodos químicos y biológicos con más éxito para la evaluación medioambiental integrada (Bakker y col., 2007). La diferencia entre TIE y EDA es difícil de establecer. Ambos enfoques tienen el mismo objetivo, identificar tóxicos, pero utilizan distintas suposiciones, estrategias, metodologías y a menudo *end points*. Burgess y col. describen como se llevan a cabo EDA y TIE, semejanzas y diferencias entre ambas técnicas, ejemplos de sus aplicaciones, etc. (Burgess y col., 2013). En la tabla 1.3.13. se resume la comparación entre ambas técnicas.

Tabla 1.3.13. Comparación de los parámetros de los procedimientos EDA y TIE (Burgess y col., 2013)

Parámetros	EDA	TIE
Endpoints toxicológicos típicos	<i>In vitro</i> : disrupción endocrina, mutagenicidad, genotoxicidad	Organismo entero: supervivencia, crecimiento, reproducción,
Clases de tóxicos <i>target</i>	Énfasis en contaminantes orgánicos	Todos los químicos potencialmente tóxicos
Importancia de biodisponibilidad	No consideración específica de biodisponibilidad	Gran consideración
Forma de muestra	Extractos de disolventes orgánicos de agua, sedimentos, agua intersticial, mezclas técnicas, productos de consumo, biota	Muestras enteras (ej: agua, sedimentos, agua intersticial)
Importancia del análisis químico	Crítico, típicamente análisis <i>non-target</i> y elucidación estructural	De apoyo a crítico, típicamente análisis <i>target</i> de los tóxicos esperados, basados en el tipo de muestra
Grado de identificación tóxico/s	Especificidad muy alta	Alta para clases de tóxicos, moderada para tóxicos específicos
Rol de relevancia ecológica	Objetivo secundario	Objetivo primario

Análisis Dirigido a Efecto (EDA, *Effect-Directed Analysis*): EDA se refiere al uso integrado de tests biológicos y químicos en un contexto más amplio, para el cual no hay disponibles guías estandarizadas. También incluye separación gradual, paso a paso, y simplificación de una muestra para aislar componentes con actividad tóxica. Las manipulaciones son dirigidas por bioensayos hasta que es posible identificar los compuestos responsables por análisis químico (Brack y col., 2007). Dependiendo de las diferentes estrategias de EDA, se utiliza la etapa de reconocimiento biomolecular antes o después de la separación, ya sea *off-line* o *online*. Por tanto, EDA utiliza los efectos biológicos como la base para reducir el enorme número

de posibles tóxicos, y su objetivo es dirigir el análisis químico a aquellos químicos que contribuyen significativamente a efectos tóxicos medibles. Por tanto, en EDA, los bioensayos son considerados herramientas para detectar de forma sensible compuestos químicos con modos de acción o *endpoints* biológicos similares (Burguess y col., 2013).

Las principales etapas de EDA son (Brack y col., 2003):

- 1) separación de químicos orgánicos de la matriz de la muestra incluyendo extracción, *clean up*, preconcentración y fraccionamiento;
- 2) análisis o tests biológicos (*biotesting*);
- 3) análisis químico incluyendo herramientas basadas en computadoras para la elucidación de la estructura química y
- 4) confirmación, como TIE .

Las partes más complejas del fraccionamiento de la muestra son la identificación de tóxicos por la técnica analítica y su confirmación como la causa de los efectos medidos. La evaluación del riesgo de mezclas complejas medioambientales deberían preferentemente tratar de identificar cada vez más posibles contaminantes en vez de enfocarse solamente en los contaminantes diana seleccionados *a priori* (Brack y col., 2005).

Finalmente, un estudio interesante (Grote y col., 2005) avanza la metodología para confirmación de mezclas en EDA, incorporando conocimiento disponible sobre la previsibilidad de efectos combinados de mezclas. Publicaciones que dan excelentes resúmenes de las posibilidades y las limitaciones de EDA para identificar tóxicos orgánicos en el medioambiente son: (Brack y col., 2008; Schymanski y col., 2008; Schymanski y col., 2009; Hecker y col., 2009; Brack y col., 2016). Barceló y col., resume los aspectos más importantes de diversos estudios realizados en cuencas de ríos europeos, que demuestran el poder de combinaciones de análisis biológico y químico y en particular de EDA (Barceló y col., 2009). Adicionalmente, establecer relaciones causales entre contaminación química y efectos ecotoxicológicos observados en muestras medioambientales es un gran reto en ecotoxicología. EDA es una herramienta poderosa para identificar los tóxicos responsables en muestras medioambientales contaminadas y peligrosas. Estos estudios han sido llevados a cabo en sitios específicos en cuencas de ríos europeas, en muestras de aguas y sedimentos y demostraron el poder de combinar procedimientos biológicos y químicos analíticos- Sin embargo, EDA también tiene varias limitaciones, por ej: el número de etapas que conllevan bastante tiempo y alto coste, y que no son adecuadas para *monitorings* e inaplicables en situaciones dramáticas en las cuales han sucedido vertidos accidentales o deliberados y es necesario tomar medidas rápidamente para tratar de solucionar la situación).

En una revisión de Análisis Dirigido a Efecto de toxicidades clave en cuencas de ríos europeos, Brack y col. (Brack y col., 2007) identifican como tóxicos clave en los ríos europeos el nonilfenol, los ftalatos, la estrona, el 17- β -estradiol y el estriol entre otros contaminantes (el AP y los estrógenos confirmados como causa del efecto medido), destacando y comentando ampliamente el estudio llevado a cabo en esta tesis en la cuenca del río Llobregat como identificador del NP (Céspedes y col., 2005). El RYA es bastante sensible a los estrógenos, y en menor grado a los compuestos alquilfenólicos, detectados en la cuenca del río Llobregat en este estudio y otros anteriores y posteriores (Solé y col., 2001; Céspedes y col., 2005; Brix y col.,

2010) y atribuyendo la mayor parte de estrogenicidad de las muestras a los compuestos alquilfenólicos. La combinación del RYA con el análisis químico mediante LC-MS y LC-MS/MS ha permitido relacionar causa y efecto identificando los contaminantes clave que proporcionan estrogenicidad en la cuenca del río Llobregat (Brix y col., 2010).

Posteriormente a los estudios realizados en esta tesis, se ha visto que el NP ya no es un contaminante importante en el río Llobregat, debido a una mejora en la depuración de las aguas residuales industriales y a la eliminación en el proceso de curtido de pieles, ya que se ha prohibido su uso en la D. 2003/57/CE tal y como se describe en la evolución de los niveles de NP en la cuenca del río Llobregat en el capítulo 5.

Identificación y Evaluación de la Toxicidad (TIE, Toxicity-Identification Evaluation): Describe procedimientos estandarizados en tres fases que fueron desarrolladas por la US EPA a principios de los 90, inicialmente para la evaluación de la calidad de los efluentes de EDARs e identificar la causa de la toxicidad (EPA/600/6-91/003, 1991) (Norberg y col., 1991, Ankley y col., 1992). Posteriormente, TIE fue ampliada para la aplicación de la contaminación en suelos y sedimentos. Sin embargo, durante la última década el procedimiento TIE se ha convertido en una herramienta establecida y poderosa para determinar las causas de los efectos (como toxicidad aguda, (geno)toxicidad y potencial disruptor endocrino) en muestras medioambientales acuosas y sólidas (Petrovic y col., 2004). En la figura 1.3.6. se describen las 3 fases establecidas en el procedimiento TIE:



Figura 1.3.6. Fases del procedimiento TIE. Adaptado de (Ho y col., 2009)

- Fase I (Caracterización): etapa es, basada exclusivamente en tests *in vivo*. Se examina un efluente para determinar y evaluar las clases de tóxicos potenciales que causan la toxicidad observada usando un test de toxicidad inicial, mediante la comparación de las toxicidades de las muestras resultantes con las de efluentes no tratados para ver si la toxicidad es reducida por los tratamientos y sin hacer suposiciones sobre la causa de la toxicidad observada. Esta etapa es, al menos teóricamente, basada exclusivamente en tests *in vivo*.
- Fase II (Identificación): basada en los resultados de la Fase I, la siguiente etapa consiste en la aplicación de varias técnicas analíticas para identificar los tóxicos específicos causantes de la toxicidad observada.

- Fase III (Confirmación): a continuación, el ensayo de la Fase III confirma si esta hipótesis es correcta o no, comparando la actividad de mezclas individuales y estándares de los compuestos identificados, utilizando el mismo bioensayo (es decir, usando líneas independientes de evidencia).

Los métodos TIE son útiles en la evaluación para relacionar la exposición a estresores y los efectos y establecer mejor la causalidad. Sin embargo, la aplicación del método TIE es comúnmente llevada a cabo en el laboratorio, mientras que ejemplos *in situ* son muy limitados.

En la Figura 1.3.7. se muestra el esquema general del análisis basado en efectos del procedimiento TIE, aplicado a compuestos disruptores endocrinos:

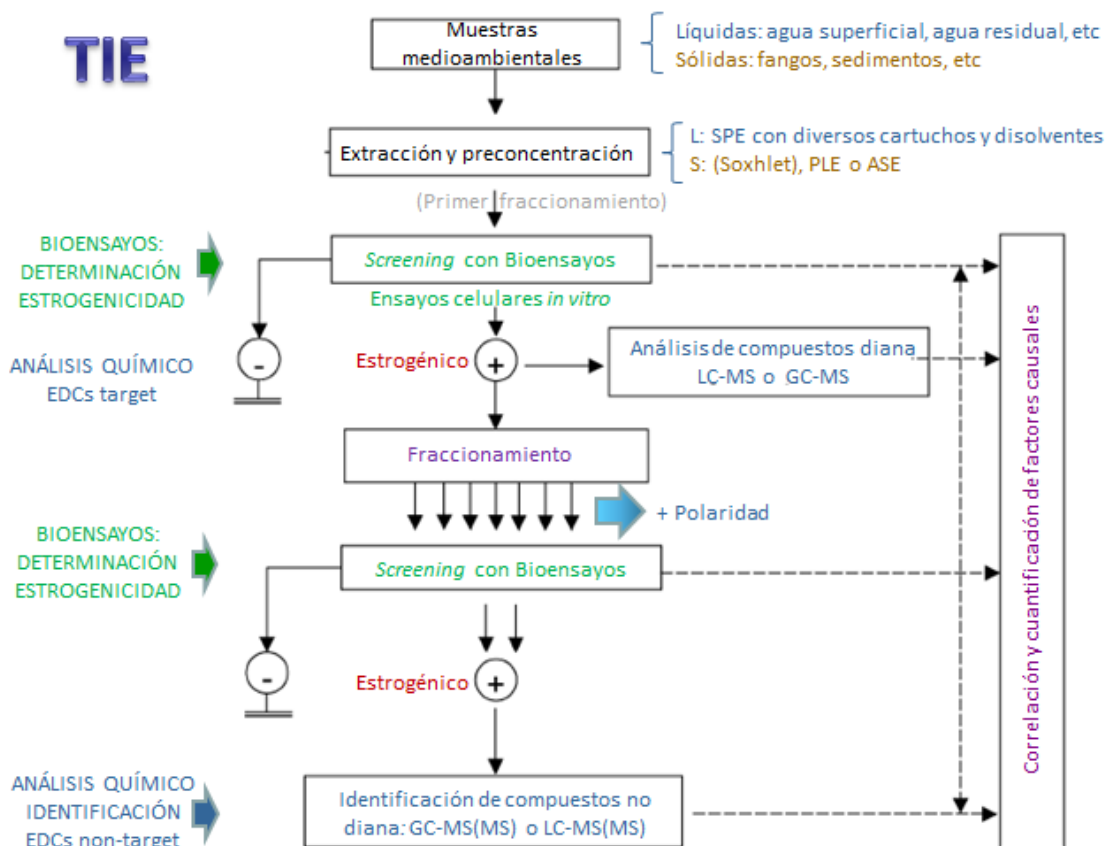


Figura 1.3.7. Esquema de las etapas del Procedimiento TIE (Identificación y Evaluación de la Toxicidad) utilizado para el análisis basado en la determinación de estrogenicidad en muestras medioambientales. Adaptado de (Petrovic y col., 2004) y (Gomes y col., 2003).

Esta estrategia permite la determinación de los agentes causantes, y los resultados obtenidos de la aplicación de bioensayos en la primera etapa son usados para dirigir la atención al análisis químico de fracciones detallado, hasta que se consigue la correlación de resultados. El proceso entero puede ser repetido, aplicando un procedimiento de fraccionamiento adicional hasta que la complejidad química de las fracciones es suficientemente reducida. Así, el análisis químico de compuestos *non-target* permite la detección o identificación de compuestos desconocidos responsables de los efectos observados (en nuestro caso, estrogenicos) (Petrovic y col., 2004).

Algunas aplicaciones incluyen la evaluación de las fases I y II de los métodos TIE para: agua dulce, sedimentos y agua intersticial (Kay y col., 2008; Phillips y col., 2009); identificación de estrógenos en fangos (Kay y col., 2008; Fernández y col., 2009), caracterización de toxicidad de sedimentos en lagunas (Picone y col., 2009) y la costa del mar (Macken y col., 2009) y, determinación de la efectividad de la migración de pesticidas en sistemas para tratar verduras (Hunt y col., 2008). Recientemente,

Se han desarrollado diferentes procedimientos TIE para la evaluación del potencial disruptor endocrino de muestras medioambientales, integrando el análisis químico de EDCs diana y una variedad de ensayos de *screening* biológicos. Varios procedimientos TIE han sido aplicados específicamente a una familia de EDCs, como por ejemplo a los estrógenos (Desbrow y col., 1998, Snyder y col., 1999, Huang y col., 2001, Fawell y col., 2001; Leger y col., 2008; Viganó y col., 2008), otros estudios a los compuestos alquifenólicos APs, APEOs (Fenet y col., 2003) o a varias familias de EDCs simultáneamente (Galassi y col., 2000; Korner y col., 2000; García-Reyero y col., 2001; Thomas y col., 2001; Hilscherova y col., 2002; Murck y col., 2002; Legler y col., 2003; Fenet y col., 2003; Noguerola y col., 2006; Fernández y col., 2009).

Los principales estudios realizados con metodologías y procedimientos TIE para la determinación de EDCs se resumen en la tabla 1.3.14. Como ejemplo, Fernández y col., desarrollaron un procedimiento TIE para determinar la mayoría de compuestos EDCs estudiados en esta tesis: estrógenos, estrógenos conjugados, NP, NPEO y BPA en aguas residuales y fangos de depuradoras (Fernández y col., 2009). El procedimiento consiste en el fraccionamiento de las muestras mediante SPE usando un cartucho C₁₈ en 3 fracciones: F.I contiene NP; NP₁EO y NP₂EO, F. II BPA y las hormonas naturales y sintéticas, y F.III los conjugados de las hormonas. Las tres fracciones fueron analizadas paralelamente mediante el ensayo de levaduras recombinantes (RYA) aplicado en esta tesis y las técnicas analíticas GC-MS o LC-MS/MS. Las muestras de agua tomadas diariamente durante una semana en la EDAR, contenían entre 0.45 y 7.22 µg/L de NP > NP₁EO > NP₂EO y por tanto fueron responsables de la estrogenicidad de las muestras. Los resultados obtenidos fueron que en las fracciones II y III no se detectó estrogenicidad, dadas las bajas concentraciones de los estrógenos, demostrando que el NP fue el principal compuesto causante de la estrogenicidad en la EDAR estudiada. Por otra parte, en el fango solamente se acumularon los alquifenoles, con concentraciones entre 8.69 y 26.3 mg/kg ms de NP₁EO > NP₂EO > NP y se observó que la carga química que provocó la estrogenicidad detectada en los influentes fue eliminada eficientemente a lo largo del proceso de la EDAR. En conclusión, este estudio demuestra que la combinación de técnicas analíticas y bioensayos permiten una mejor determinación de la estrogenicidad real de las muestras.

Por tanto, este procedimiento de combinación o integración de técnicas químicas y biológicas permite obtener una información más completa de las muestras medioambientales y la determinación de la estrogenicidad real de las muestras y son capaces de detectar e identificar tóxicos conocidos y desconocidos (*non-target*) basado en sus efectos en el medioambiente y relacionar causa y efecto. TIE está recomendado como el procedimiento más apropiado para la identificación de compuestos estrogénicos en muestras medioambientales, mientras que EDA, procedimiento con el mismo objetivo, implica bastante tiempo y coste por el número de etapas que conllevan, y no son adecuadas para *monitorings* e inaplicables en situaciones en las que es necesario tomar medidas rápidamente para solucionarlas.

Tabla 1.3.14. Metodologías utilizando TIE para la determinación de EDCs en muestras medioambientales, adaptado de (Gomes y col., 2003) y (Petrovic y col., 2004) y ampliado.

Muestra (matriz)	Método de extracción	Fraccionamiento	Análisis químico	Compuestos diana	Bioensayo	Ref.
Efluente EDAR	SPE C ₁₈	1.SPE elución secuencial 2.RP HPLC, 3.RP HPLC gradiente superficial	GC-MS	17β-estradiol 17α-etilestradiol estrona	YES	(Desbrow y col., 1998)
Efluente EDAR y agua superficial	SPE SDB Elución secuencial	NP HPLC (3 fracciones de diferente polaridad)	RP HPLC	17β-estradiol etinilestradiol	RIA	(Snyder y col., 1999)
Agua residual de vertedero y efluente textil	2 x SPE LiChrolut	RP-HPLC LiChrosphere C ₁₈ aumentando hidrofobicidad	GC/MS GC-ECD	NP Ftalatos	<i>Ehippia de D. magna</i>	(Galassi y col., 2000)
Influyente y Efluente EDAR	SPE resina copolímero de poliestireno y C ₁₈	-	GC-MS	Alquilfenoles BPA	MCF-7 (E-screen)	(Korner y col., 2000)
Agua de estuario, sedimento	C ₈ Polímero base poliestireno-carbono no poroso	RP HPLC	GC-MS	17β-estradiol DEHP, NP, androsterona	YES	(Thomas y col., 2001)
Agua de río, efluentes EDARs	SPE C ₁₈	-	LC-MS	NP, NPEOs, estrógenos y progestógenos	YES	(García-Reyero y col., 2001)
Efluente EDAR y agua superficial	SPE C ₁₈	HPLC C ₁₈	GC/MS/MS	17β-estradiol etinilestradiol	ELISA policlonal	(Huang y col., 2001)
Influyente y Efluente EDAR	No especificado	-	GC-MS-MS	Esteroides	YES	(Fawell y col., 2001)
Sedimentos río	Soxhlet	Florisil Elución secuencial	HPLC-FL GC-MS LC-MS	Alquilfenoles Ftalatos NP, NPEO	MCF-7 (E-screen)	(Hilscherova y col., 2002)
Sedimentos, partículas suspendidas, biota	Soxhlet	-	GC-MS	Alquilfenoles APEOs Ftalatos	ER-CALUX	(Murck y col., 2002; Leger y col., 2003)
Agua y sedimentos de río	SPE C ₁₈	Elución secuencial SPE	GC-MS	Alquilfenoles	MELN	(Fenet y col., 2003)
Entrada EDAR Efluente y fango EDAR	SPE C ₁₈	SPE Oasis HLB y Extracción ASE+ cleanup Florisil	GC-MS LC/MS/MS	Estrógenos (E1, E2, E3, EE2), NOR y conjugados, NP, NPEOs y BPA	RYA	(Noguerola y col., 2006)
Efluente EDAR	SPE C ₁₈		GC-MS	17β-estradiol 17α-etilestradiol estrona	YES	(Leger y col., 2008)
Efluente EDAR	SPE C ₁₈		GC-MS	17β-estradiol 17α-etilestradiol estrona	YES	(Viganó y col., 2008)
Entrada EDAR Efluente y fango EDAR	SPE C ₁₈	SPE Oasis HLB Y Extracción ASE+ cleanup Florisil	GC-MS LC/MS/MS	(E1, E2, E3, EE2), NOR y conjugados, NP, NPEOs y BPA	RYA	(Fernández y col., 2009)
Peces expuestos a efluentes de EDARs			HPLC GC-MS		YAS Actividad (anti) androgénica	(Hill y col., 2010)
Lixiviados vertederos	Microtox	Fraccionamiento RP-HPLC	GC-MS	BPA	Bioluminiscencia Toxicidad pez embrio	(Lei y col., 2010)
Suelos de vertederos/lixivados			GC-MS	BPA	Bioluminiscencia Toxicidad pez embrio	(Legler y col., 2010)

ER-CALUX: *Estrogen receptor-mediated chemical activated luciferase gene expression*; Ehippia (huevos latentes) de *D. magna* MELN: *Recombinant-receptor reporter gene assay*; Proliferación celular MCF-7 (E-screen); RIA: *Radio Immunoassay*; RYA: *Recombinant Yeast Assay*; YAS: *Yeast recombinant androgen receptor transcription screen*; YES: *Yeast estrogen screen*