

**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

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



CAPÍTULO 2

METODOLOGÍAS PARA LA

DETERMINACIÓN DE

COMPUESTOS DISRUPTORES ENDOCRINOS

2.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS -----

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

2.1.1. Determinación de los EDCs estudiados mediante LC-MS

Hormonas esteroideas: El análisis de estos compuestos mediante la aplicación de HPLC y LC-MS/MS ha ido progresivamente en aumento. Las principales ventajas de estas técnicas son que el paso de derivatización puede ser obviado (Petrovic y col., 2002), y que se evita la hidrólisis enzimática necesaria para realizar inmunoensayos tanto con las hormonas esteroideas conjugadas como con las no conjugadas (López de Alda y col., 2001), por lo cual permiten determinar conjuntamente ambos tipos de hormonas sin tener que derivatizar. Para la separación cromatográfica en LC las fases estacionarias más extendidas son las basadas en los sorbentes C₁₈.

Como fase móvil, se usan normalmente las mezclas de agua-metanol y, más frecuentemente, agua-acetonitrilo con solvente orgánico, utilizando el gradiente de elución de 10 a 50% a 100% (López de Alda y col., 2003). Estas fases suelen contener pequeñas cantidades de aditivos o modificadores con el objeto, fundamentalmente, de potenciar la ionización (Barceló y col., 2004) para mejorar la separación cromatográfica o la sensibilidad MS, como ácido acético 0,1% (López de Alda y col., 2003), ácido fórmico 0.2% (López de Alda y col., 2003), acetato de amonio 10 mM (López de Alda y col., 2003), o formiato amónico (López de Alda y col., 2003; LaFleur y col., 2011). Sin embargo, varios estudios muestran que una mezcla de agua y acetonitrilo sin añadir aditivos, es la mejor opción para la determinación óptima de los estrógenos (López de Alda y col., 2003a; López de Alda y col., 2003b). No obstante, algunos autores prefieren metanol afirmando que obtienen un aumento significativo en la intensidad de la señal (Gentili y col., 2002; Reddy y col., 2005; Koh y col., 2007). La ionización de los estrógenos usando ESI en el modo negativo (NI) ha mostrado una mejora mediante la adición post-columna de una base débil o condiciones ligeramente básicas durante la cromatografía (Baronti y col., 2000; Gentili y col., 2002; Isobe y col., 2003; Komori y col., 2004; Laganá y col., 2004; Reddy y col., 2005; Roda y col., 2006; Koh y col., 2007; Chen y col., 2007).

Para la determinación de estrógenos se utiliza mayoritariamente el modo de ionización negativo (NI), siendo la interfase ESI la más utilizada (Baronti y col., 2000; López de Alda y col., 2000; López de Alda y col., 2001; Ferguson y col., 2001; Benjits y col., 2002; Isobe y col., 2003; Laganá y col., 2004; Céspedes y col., 2004; Benjits y col., 2004a; Benjits y col., 2004b), y que proporciona mejores límites de detección (López de Alda y col., 2001) trabajando en modo negativo [M-H]⁻ (López de Alda y col., 2000; Baronti y col., 2000), debido a la elevada sensibilidad que tiene la fuente de ionización ESI en modo NI para la mayoría de estrógenos, comparada con la de APCI en el modo NI y la ESI en el modo PI. No obstante, con la fuente ESI puede darse una supresión en la señal (supresión iónica) obtenida debido al efecto matriz observado en muestras complejas, como por ejemplo aguas residuales o muestras biológicas. Algunos autores han referido problemas con efecto matriz y prefieren utilizar APCI en el modo PI para la determinación de estrógenos, ya que según algunos estudios (Laganá y col., 2000; Kim y col., 2007), APCI (PI) permite obtener LODs comparables (Seifert y col., 1999; Laganà y col., 2000; Rose y col., 2002) en muchos casos a ESI en el modo NI (López de Alda y col., 2003). Adicionalmente se ha visto que utilizando la

MS en tándem con la interfase APCI también se obtienen sensibilidades comparables en muchos casos a la ESI en el modo NI (López de Alda y col., 2003) y a las que se obtienen por GC-MS (Laganá y col., 2000). Sin embargo, APCI no ioniza eficientemente los derivados más polares del estriol y los sulfatos (Schlüsener y col., 2005). La fragmentación de los estrógenos por HPLC-(ESI) MS en el modo NI también es muy débil, dando únicamente el ión desprotonado $[M-H]^-$. La cuantificación se realiza seleccionando este único ión mayoritario en el modo SIM. Por eso, en los casos que se tiene disponibilidad de trabajar con la MS en tándem, esta se utiliza para realizar la confirmación de los analitos de una forma más exacta. Por tanto, la técnica seleccionada y preferida que permite la determinación de estrógenos de forma selectiva y sensible es la LC/ESI-MS/MS en el modo NI, que presenta LOD de 0,1 a 10 ng/mL (Díaz-Cruz, y col., 2003; Beck y col., 2006; Koh y col., 2007).

Para la determinación de progestrónos se han utilizado tanto la ionización por electrospray como por APCI, ambas en modo positivo (López de Alda y col., 2000; López de Alda y col., 2001), siendo más utilizada la de APCI. Normalmente se da poca fragmentación y los iones predominantes que se seleccionan para obtener la máxima sensibilidad en SIM son los aductos de la molécula de analito con un átomo de sodio $[M+Na]^+$ formados con la interfase ESI y el ión molecular protonado $[M+H]^+$ en APCI.

Cuando se trabaja con HPLC-MS se establecen diferentes criterios para realizar la confirmación de los analitos; se tiene en cuenta el análisis en el modo *full-scan*, buscando que haya correspondencia entre los tiempos de retención y el espectro registrado en el modo de ionización correspondiente. Sin embargo, posteriormente se ha confirmado la presencia y niveles de los estrógenos mediante LC-MS/MS.

También se han acoplado a LC otro tipo de detectores para la determinación de estrógenos, como por ejemplo los detectores ultravioletas (UV) y de diodo array (DAD), los de fluorescencia (FD), o incluso los electroquímicos (EC). Diversos estudios reportan la utilidad de los detectores de espectrofotometría y DAD en la determinación de estrógenos en muestras medioambientales (Czarny, 2017). López de Alda y col., utilizaron un DAD junto con la (ESI) MS en el modo NI para la determinación de estrógenos. Para llevar a cabo la confirmación tuvieron en cuenta el espectro ultravioleta registrado y la comparación de los tiempos de retención obtenidos utilizando dos columnas analíticas diferentes. Consideraron que la aproximación de comparar estos tiempos de retención es más fiable que basarse en la comparación de las señales de MS obtenidas para dos o más iones de un compuesto en el mismo análisis cromatográfico (López de Alda y col., 2000). Los detectores UV son más ampliamente utilizados en laboratorios de análisis por su bajo coste y sencillez de uso. Así, se analizaron estrógenos en aguas superficiales mediante HPLC-UV a una longitud de onda (λ) de 200 nm obteniendo bajos LODs entre 0.24-0.45 ng/L y LOQs entre 0.80 y 1.51 ng/L (Naing y col., 2016). Se detectaron E1 y E2 en agua mediante HPLC con detector UV-Vis, obteniendo LODs entre 10 y 100 ng/L a una λ de 280 nm. Chen y col., determinaron 17-a-EE en aguas a una λ de 210 nm, con alta sensibilidad y un LOD de 44 ng/L (Chen y col., 2016). 17- β -E2 fue identificado con el uso de DAD a 230 nm y con LOQ entre 1000 y 5000 ng/L (Xu y col., 2014). No obstante, aunque en algunas ocasiones se han descrito LODs comparables a los obtenidos por métodos de MS (especialmente usando FD), su escaso poder de identificación los ha dejado en un segundo plano como herramientas de análisis.

Respecto a la detección mediante MS, la mayoría de los estudios para la determinación de estrógenos utilizan triple cuadrupolo en tándem con espectrometría de masas debido a su alta selectividad y sensibilidad cuando trabaja en modo SRM. Tal y como se ha descrito anteriormente, los LODs están en el rango de ng/L (normalmente bajo 20 ng/L) incluso para muestras de entrada de depuradora (Postigo y col., 2009). En algunos casos se han utilizado con éxito instrumentos TOF y Q-TOF para identificar los compuestos utilizando su masa exacta (Reddy y col., 2005; Farré y col., 2007). Por ejemplo, el método LC-MS/MS desarrollado por Naldi y col., permite la determinación de estrógenos en matrices acuáticas a nivel de 1 ng/L (Naldi y col., 2016). Iparraguirre y col., optimizaron otro método mediante LC-MS/MS, evaluando las interfases ESI y APCI en ambos modos, PI y NI, concluyendo que se obtenían mejores resultados con ESI en modo negativo, con LODs de 1 ng/L y 12 ng/L para E1 y EE2 respectivamente (Iparraguirre y col., 2014). Otros estudios también han determinado estrógenos con la misma interfase y modo de ionización (ESI-NI), obteniendo LODs en el rango de 0.012-0-693 ng/L (Aftafa y col., 2014) y 10-30 ng/L (Capriotti y col., 2016). En todos estos métodos se realizaron las determinaciones en LC-MS/MS en modo SRM, que es el modo más fiable para determinar la presencia de los analitos en las muestras.

En la tabla 2.1. se resumen métodos LC-MS(MS) descritos en la bibliografía para la determinación de estrógenos en muestras de agua, mayoritariamente E1, E2, E3 y EE2.

Tabla 2.1. Métodos LC-MS y LC-MS/MS para la determinación de hormonas esteroideas en muestras del medioambiente acuático. Adaptado de (Briciu y col., 2009).

Compuestos	Matriz	Preparación muestra	Método de detección	LODs (ng/L)	Ref.
E1,E2,E3, 17 α EE2 y compuestos relacionados	Mar Báltico	Filtración/SPE (Oasis HLB)	ESI-MS/MS	0.1 - 3 ng/L	Beck y col., 2006
E1,E2,E3, 17 α EE2	STP	Filtración/SPE	ESI-MS	0.07 - 0.18 ng/L	Ferguson y col., 2001
E1,E2,E3, EE2 y derivados sulfonados	Río Tamagawa, Japón	Filtración/SPE (Shodex EDS-1)/Purificación con Fluorisil	ESI-MS/MS	0.2- 34 ng/L	Isobe y col., 2003
E1,E2,E3, EE2 y derivados sulfonados y glucuronados	EDARs y Agua de río	SPE(Carbograph 4)	ESI-MS/MS	0.003- 15 ng/L	Gentili y col., 2002
E1,E2,E3 y EE2	EDARs	SPE (Oasis HLB)	ESI-MS/MS	0.04 – 0.24 ng/L	Reddy y col., 2005
E1,E2,E3 y EE2	Agua de río	SPE(Superclean Envi+)	ESI-MS/MS	5.1 – 6.4 ng/L	Yamamoto y col., 2006
E1,E2,E3 y EE2	Agua de río	Filtración/SPE	(IT)-MS/MS	2.3 – 10.6 ng/L	Benjits y col., 2002
E1,E2,E3 y EE2	EDARs	Filtración/SPE	ESI-MS ESI-MS/MS	2 – 200 ng/L	Croley y col., 2006
E1,E2,E3,EE2 E1 y 3S	EDARs	SPE(C ₁₈)/Evaporación	ESI-MS/MS	0.1 – 0.2 ng/L	Koh y col., 2007
E1,E2 y EE2	Aguas New York	Extracción (discos SDB-XC)	ESI-MS ESI-MS/MS	4 ng/L	Palmer y col., 2008

En referencia a la **sensibilidad** y a los **límites de detección** alcanzados con cada técnica para la determinación de estrógenos, Díaz-Cruz y col. (2003), realizaron un completo estudio en el que compararon en términos de sensibilidad distintas técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas (GC-MS, LC-MS y LC-MS/MS), distintos instrumentos, fuentes de ionización (ESI y APCI), modos de ionización (NI y PI), y modos de monitorización selectiva (de iones o SIM y de transiciones o SRM), concluyendo que LC-ESI(NI)-MS/MS es la técnica más adecuada para el análisis de estrógenos (Díaz-Cruz y col., 2003). En este mismo estudio, los LODs obtenidos con LC-ESI-MS en modo SIM fueron comparables a los obtenidos por LC-ESI-MS/MS en modo SRM, pero la selectividad que proporciona la espectrometría de masas en tándem es esencial para evitar falsos positivos en la determinación de muestras reales. Es por ello que en esta tesis se han analizado por LC-MS/MS las muestras en las que han sido detectados estrógenos mediante LC-MS, para confirmar la presencia y niveles de los mismos en el medioambiente acuático.

Los límites de detección de GC-MS tienen un rango de 1-20 µg/L con los niveles más bajos correspondientes a los estrógenos, mientras que los LODs de LC/ESI-MS (en modo SIM) varían ligeramente en función del compuesto y del instrumento utilizado para su análisis, siendo entre 0.4-10 µg/L con un cuadrupolo y entre 0.1-20 µg/L con un instrumento de triple cuadrupolo (Díaz-Cruz y col., 2003). Por tanto, para estrógenos, los LODs son entre 1-10 veces inferiores con el triple cuadrupolo en el modo SIM (0.1 – 10 µg/L), que para un único cuadrupolo (1 – 10 µg/L), mientras que, para los progestógenos, la sensibilidad alcanzada con el instrumento MS de un cuadrupolo (0.4 µg/L) es mejor que con el triple cuadrupolo en el modo SIM (10-20 µg/L). Esta diferencia puede ser debida a los distintos picos base monitorizados en cada instrumento. En LC-ESI-MS y LC-ESI-MS/MS, el ión predominante (utilizado como pico base en el modo SIM o como ión precursor en el modo SRM), corresponde en el caso de los estrógenos a la molécula desprotonada $[M-H]^-$, independientemente del instrumento utilizado. Sin embargo, en el caso de los progestógenos, varía en función del instrumento utilizado, de forma que con MS el ión mayoritario corresponde a los aductos de la molécula con un átomo de sodio $[M+Na]^+$, mientras que en el MS de triple cuadrupolo corresponde a la molécula protonada $[M+H]^+$ (Díaz-Cruz y col., 2003). En su estudio sobre la sensibilidad instrumental de los distintos equipos, obtuvieron que los mejores límites de detección fueron obtenidos con LC-MS/MS con interfase ESI, seguidos de GC-MS y por último LC-APCI-MS/MS en el siguiente orden:

LC-ESI(NI)-MS/MS (SRM) (0.1-10 ng/mL) > LC-ESI(NI)-MS (SIM) (0.1-20 ng/mL) > GC-MS (1-20 ng/mL) > LC-APCI-MS/MS (5 - >1000 ng/mL) (Díaz-Cruz y col., 2003), confirmando la sensibilidad de estas técnicas en el análisis de estrógenos reportado previamente en otro estudio, clasificadas en el siguiente orden: LC-MS/MS > GC-MS/MS > LC-MS (Croley y col., 2000).

En conclusión, LC-ESI-MS/MS es la técnica seleccionada para la determinación de estrógenos (tanto las formas libres como las conjugadas) de forma selectiva y sensible, siendo determinadas mejor en modo de ionización negativo (NI), mientras que los progestógenos deben ser analizados en modo de ionización positivo (PI) (Díaz-Cruz y col., 2003).

Compuestos alquilfenólicos: La separación cromatográfica de los APEOs y sus metabolitos en una sola inyección presenta varias dificultades que hace complicado seleccionar una única columna analítica y un modo de separación. La mayor dificultad de los productos comercialmente disponibles (mezclas de isómeros alquil y homólogos de unidades etoxi (EO)), además del amplio rango de polaridades que los APEOs tienen desde los APs más lipofílicos hasta los oligómeros de cadena larga más hidrofílicos, es el principal inconveniente para obtener un buen rendimiento cromatográfico necesario para un análisis cuantitativo (Vega-Morales y col., 2009).

La determinación de APEOs por HPLC puede realizarse tanto en fase inversa (Ferguson y col., 2000; Petrovic y col., 2001) como normal (Sahag y col., 1999; Saho y col., 2002). Cuando se utiliza la fase normal, los APEOs se separan en función del número creciente de unidades de óxido de etileno (que es lo que les marca su carácter hidrofílico), mientras que los oligómeros correspondientes con el mismo número de unidades etoxi, pero diferentes sustituyentes alquil co-eluyen. En cambio, con la fase inversa, la separación se da en función del carácter hidrofóbico (marcado por el grupo alquilo). En este caso, la longitud de la cadena de óxido de etileno no influye en la separación y los oligómeros que tienen el mismo carácter hidrofóbico co-eluyen en un pico. El pico aumenta de intensidad y, por tanto, se observa un aumento en la sensibilidad del método. Cuando se utiliza la espectrometría de masas, la concentración de los oligómeros individuales (NP₁EO, NP₂EO,...) se puede obtener extrayendo los correspondientes iones característicos del cromatograma que contiene todos los iones. También hay casos en que la separación se basa en mecanismos de exclusión de medida de fase inversa (separación en modo mixto). De esta manera se obtiene una buena resolución para los APEOs y APs con la misma cadena alquílica. Por ejemplo, la separación entre los NPEOs y el 4-NP (Ferguson y col., 2001).

La determinación de los APEOs por HPLC-MS se puede llevar a cabo utilizando las interfases ESI y APCI, ambas en condiciones de ionización positiva (PI) previamente descritas en el apartado 1.3.3.2. de esta tesis. Los espectros típicos de los alquilfenoles polietoxilados que se obtienen utilizando la interfase de ESI muestran la característica de señales espaciadas con la misma diferencia de masa de 44 Da, correspondiente a una unidad de óxido de etileno (EO). En cambio, utilizando la fuente de APCI, el espectro que se obtiene muestra diferentes series de señales espaciadas de una manera equidistante. La serie principal corresponde a los iones $[M+H]^+$, y las siguientes series corresponden respectivamente a los iones $[M-C_9H_{18}]^+$ y a los aductos del ión molecular $[M+NH_4]^+$ (Petrovic y col., 2001). Utilizando ESI y un solvente aprótico (como el acetonitrilo), los AP_nEOs muestran afinidad por los iones metálicos alcalinos (el ión Na⁺), resultando en la formación únicamente del principal aducto $[M+Na]^+$ (Petrovic y col., 2001). En cambio, el uso de disolventes próticos (como el metanol), genera un rango de aductos más extenso, con H⁺, K⁺, NH₄⁺ y H₂O. Para una mejor fragmentación en la disociación inducida por colisión, son mejores los aductos de amonio que proporcionan una disminución de los LODs en la detección por monitorización de reacción múltiple (Honde y col., 2002; Jonkers y col., 2003). Con la fuente de APCI, independientemente del disolvente, se forman un rango de iones aducto, con alguna variabilidad en la abundancia. Como resultado de las diferencias, la interfase de ESI ofrece mejor sensibilidad que APCI para un amplio rango de oligómeros (Petrovic y col., 2000).

Los APs pueden determinarse tanto con la interfase de ESI como la de APCI en el modo de ionización negativo (NI), pero la fuente de ionización ESI es la más utilizada debido a su elevada sensibilidad para determinar APs (de 40 a 50 veces mayor que usando APCI). ESI da exclusivamente los iones $[M-H]^-$ y se necesita la MS en tándem para llevar a cabo su confirmación. En cambio, la APCI a elevados voltajes proporciona espectros que tienen una fragmentación similar a la que se obtiene con la MS en tándem (Pedersen y col., 1999).

Uno de los principales problemas cuando se determinan los APs y los APEOs por MS es la supresión de señal del analito en muestras de aguas residuales y principalmente de fangos y sedimentos. Para reducir este efecto de la matriz hay autores que utilizan procedimientos de extracción muy selectivos y exactos, realizando una limpieza de la muestra, aplicando patrones internos o utilizando aditivos en la fase móvil (Petrovic y col., 2001). Benijts y col. (2004) estudiaron la influencia de los aditivos utilizados para modificar la fase móvil (ácidos y tampones), la importancia de utilizar una limpieza eficiente de la muestra y el papel que tiene la adición de patrones internos en la eficiencia de ionización para 35 EDCs, entre ellos el 4-*t*-OP y el 4-NP, en HPLC-(ESI)MS/MS en modo NI. Con los diferentes pasos de limpieza eficiente de la muestra de la SPE, se consigue una importante eliminación de los componentes de la matriz que interfieren en la señal. Comprobaron que la forma más efectiva para compensar el efecto matriz es la utilización de patrones internos (Benijts y col., 2004).

En la Tabla 2.2. se resumen diversos estudios realizados mediante técnicas de LC acoplada a MS o MS en tándem, para la determinación de compuestos alquilfenólicos y BPA en el medio acuático. En la mayoría de estudios se ha utilizado LC-MS/MS con interfase de ESI, excepto en dos de ellos que utilizan APCI en modo positivo (Cantero y col., 2004 y 2005) y APCI en ambos modos para el análisis de suelos y fangos (Andreu y col., 2007). En general los estudios se han llevado a cabo en fase inversa con C_{18} , utilizando como método de cuantificación el patrón interno, patrón de recuperación y calibración externa. Loos y col., determinaron diversos EDCs (BPA, alquilfenoles, alquilfenoles etoxilados y carboxilados) en agua residual mediante LC-MS/MS, cuantificando mediante patrón interno y dilución isotópica (Loos y col., 2007).

Tabla 2.2. Métodos LC-MS(MS) aplicados a la determinación de **compuestos alquilfenólicos y BPA**. Adaptado de (Gallart-Ayala y col 2010).

Compuestos	Matriz muestra	Cromatografía Líquida	Fase móvil	Fuente de Ionización	Analizador de Masas	Modo de Adquisición	Método de Cuantificación	LODs	Ref.
NP, NPnEOs	Sedimentos	Fase normal: ciano	Tolueno: tolueno-MeOH-agua	ESI (+) ESI (-)	Q	SIM	-	2-10 ng/g	Shang y col., 1999
APs, XAPs, APnEOs	Agua, sedimentos	Fase Inversa: C ₈	MeOH:Agua	ESI (+) ESI (-)	Q	SIM	Patrón de recuperación	0.04-0.92 ng/L	Ferguson y col., 2000
NP, NPnEOs	Agua residual, sedimentos	Modo mixto: C ₁₈ + exclusión de tamaño	MeOH:NaAc	ESI (+) ESI (-)	Q	SIM	Patrón de recuperación Patrón Interno	0.78-37.3 ng/g	Ferguson y col., 2001
APs, APEOs, APECs, BPA	Sedimentos, agua	Fase Inversa: C ₁₈	MeOH o ACN:Agua	ESI (+) ESI (-)	Q	SIM	Calibración externa	0.5-5 ng/g (sedimentos) 20-100 ng/L (agua)	Petrovic y col., 2001 2002a & 2002b
APs, APnEOs	Biota	Modo mixto: C ₁₈ + exclusión de tamaño	MeOH: Agua (NH ₄ Ac)	ESI (+) ESI (-)	QqQ	SRM	Patrón Interno	4-12 ng/g	Shmitz-Afonso y col., 2003
NP, XNP, NPnEOs, NPnEC...X	Agua, Fangos	Fase Inversa: C ₁₈	MeOH:Agua	ESI (+) ESI (-)	QqQ	SIM SRM	Calibración Externa Patrón Interno	1-20 ng/L (agua) 1-1500 ng/g (fango)	Petrovic y col., 2003 y 2003b
APs APnEOs	Agua superficial, sedimentos	Modo mixto: C ₁₈ + exclusión de tamaño	MeOH:NH ₄ Ac	ESI (+) ESI (-)	QqQ	SRM	Patrón Interno	0.004-29 ng/L (agua) 0.02-8.1 ng/g (sedimentos)	Loyo-Rosales y col., 2003 y 2007
APs, APEOs, APECs	Agua	Fase Inversa: C ₁₈	MeOH:Agua (NH ₄ Ac)	ESI (+) ESI (-)	QqQ	SRM	Calibración externa	0.04 – 12 ng/L	Jahnke y col., 2004
OP, NP, BPA	Agua de río	Fase Inversa: C ₁₈	ACN: NH ₄ For	ESI (-)	QqQ	SRM	Patrón Interno	0.5-20 ng/L	Benjits y col., 2004
APs, APEOs, APECs	Fangos, Agua	Fase Inversa: C ₈	ACN:MeOH:Agua (NH ₄ Ac)	APCI (+) ESI (-)	IT	Full scan	Calibración externa Patrón Interno	0.09-0.38 mg/kg (fango) 14-193 ng/L (agua)	Canterro y col., 2004, 2005 & 2006
OP, NP, BPA	Agua superficial marina	Fase Inversa: hidro-RP	MeOH:Agua (NH ₄ Ac)	ESI (-)	QqQ	SRM	Patrón Interno	0.04-0.14 ng/L	Beck y col., 2005
NPnEOs, AP ₁ EC	Agua, sedimentos	Fase Inversa: C ₁₈	MeOH:HAc + TEA	ESI (+) ESI (-)	IT	Full Scan	-	0.05-0.5 ng/mL (agua) 1-10 ng/g (sedimentos)	Lara-Martín y col., 2006
APs, BPA, OPnEC, NPnEC, OPnEO, NPnEO; n: 1-3	Agua residual	Fase Inversa: C ₁₈	ACN:HAc (NP, OP) ACN: agua (BPA)	ESI (+) ESI (-)	QqQ	SRM	Patrón Interno Dilución Isotópica	1-100 ng/L	Loos y col., 2007
OP, NP, APnEOs	Suelos, fangos	Fase Inversa: C ₁₈	MeOH:Agua (NH ₄ Ac)	APCI (+) APCI (-)	Q	SIM	-	0.3-30 ng/g	Andreu y col., 2007
APs, APEOs, APECs	Agua residual	Fase Inversa: C ₁₈ (sub2 μm)	ESI(+) MeOH:ACN: NH ₄ AC/HAc ESI(-) ACN:water	ESI (+) ESI (-)	QTOF	Ión Producto ion scan	-	10-100 μg /L	González y col., 2008
BPA	Sedimentos	Fase Inversa: C ₁₈	MeOH:Agua	ESI (-)	QqQ	SRM	Patrón de recuperación	0.02-0.15 ng/g	Chu y col., 2005
BPA	Agua de río	Fase Inversa: C ₁₈	ACN:Agua	ESI (-)	Q	SIM	Patrón de recuperación	5-10 pg/mL	Sambe y col., 2006
BPA, X _n BPA	Agua residual	Fase Inversa: C ₁₈	MeOH:Agua	ESI (-)	IT	Ión Producto Scan	Adición estándar	0.016-0.38 μg/L	Gallart-Ayala y col., 2007

Respecto a los alquilfenoles, cabe destacar la importancia de diferenciar correctamente entre los compuestos a determinar, es decir, aquellos utilizados técnicamente y presentes en el medioambiente, y aquellos que pueden utilizarse como patrón interno o de recuperación. Teniendo en cuenta tanto su uso industrial como su toxicidad y actividad endocrina, en esta memoria se consideran los isómeros ramificados y lineales del 4-octilfenol y del 4-nonilfenol. Estos APs se describen brevemente a continuación en la Tabla 2.3:

Tabla 2.3. Compuestos APs con su N° CAS y las principales aplicaciones.

Acrónimo EDC	Compuesto	N° CAS	Aplicaciones
4-tert-OP	para-tert-octilfenol ramificado	140-66-9	Isómero utilizado técnicamente y liberado al medioambiente. Utilizado en detergentes no iónicos, plastificantes, antioxidantes, etc.
4n-OP	4n-octilfenol lineal	1806-26-4	Isómero lineal no utilizado técnicamente, (no presente en el medioambiente).
4n-NP	4n-nonilfenol lineal	104-40-5	Uso en la preparación de plastificantes, lubricantes, antioxidantes, etc. Su principal fuente en el medioambiente viene dada como producto de biodegradación del NPnEO.
4-NP	4-nonilfenol ramificado	84852-15-3	NP utilizado técnicamente, presente en el medioambiente. AP ampliamente utilizado como aditivo en plásticos, adhesivos , selladores y productos de recubrimiento . Sustancia que lixivia de tubos de plástico.
NP	nonilfenol	2154-52-3	Se encuentra principalmente en detergentes industriales aniónicos y no iónicos, y plasitificantes del PVC, etc.

- Los isómeros ramificados, el 4-tert-OP y el 4-NP, son los isómeros que se utilizan industrialmente y son liberados al medioambiente ([OSPAR Commission, 2003](#)) y por tanto su presencia es frecuente y son los compuestos que deben ser monitorizados. A diferencia del 4-tOP que es sólo un isómero, el NP usado técnicamente es una mezcla formada por 211 isómeros de cadena nonil ramificada de difícil diferenciación, lo que complica su estudio ([Loos y col., 2008](#)) y constituye principalmente el ~90% del 4-NP para-substituido (No. CAS 84852-15-3). Se ha estimado que, en matrices relevantes biológica y medioambientalmente, hay aproximadamente 50–80 isómeros presentes ([Guenther y col., 2003 y 2006](#)).

- Los isómeros lineales, el 4-n-OP y el 4-n-NP, a diferencia de los anteriores, tiene un uso industrial limitado, por lo que no deberían estar presentes en el medioambiente o su existencia es baja en comparación con los isómeros ramificados. Sin embargo, se ha detectado su presencia en las aguas, debido a la parcial degradación de los APEs en las EDARs. Por otra parte, diversos estudios han demostrado su toxicidad y su comportamiento como disruptores endocrinos. Por todos estos motivos, el estudio de los isómeros lineales también es importante.

Recientemente, en una revisión de 75 estudios para la determinación de compuestos alquilfenólicos y BPA, se observó como hay una alta tendencia a analizar los isómeros ramificados de los APs (62% y 55% respectivamente para NP y 4-tOP) respecto a los isómeros lineales (4-n-OP y 4-n-NP), incluidos únicamente en el 37% y 24% de los estudios revisados para 4-n-OP y 4-n-NP respectivamente ([Salgueiro-González y col., 2017](#)).

Bisfenol A: Debido en parte a los problemas relacionados con los procesos de derivatización, y en parte a la facilidad inherente a las técnicas de cromatografía líquida para los análisis multicomponentes, durante los últimos quince años se ha observado un incremento notable en el número de publicaciones que hacen uso de LC o UHPLC con diferentes sistemas de espectrometría de masas y normalmente columnas C₁₈ de fase inversa para la determinación de BPA en muestras medioambientales (Jeannot y col., 2002), especialmente LC-MS/MS (Lara-Martín y col., 2006; Loos y col., 2007; Gallart-Ayala y col., 2007; Pojana y col., 2007). En este tipo de sistemas la interfase más empleada es la ESI (Petrovic y col 2000; Petrovic y col., 2001; Laganá y col., 2004) en el modo NI, dando niveles de sensibilidad más altos que la APCI. No obstante, también hay bastantes estudios que emplean la fuente de ionización química o APCI (Pedersen y col., 1999; Zafra-Gómez y col, 2008). La fase móvil depende en función del detector al que está acoplado la LC. Así, agua y metanol son los disolventes binarios más utilizados para ESI-MS y APCI-MS, mientras que con detector de fluorescencia se utiliza más el agua y el acetonitrilo.

Aunque el uso de otros detectores acoplados a la GC y/o la LC se ha visto desplazado a un segundo plano debido en gran medida al poder de identificación de los detectores de espectrómetros de masas, no obstante también se han utilizado detectores ópticos como los de UV-Vis (Peñalver y col., 2002; Mitani y col., 2003) y de fluorescencia (FD) (Nerín y col., 2002; Inoue y col., 2003), con las longitudes de onda de excitación y emisión de 275 y 305 nm respectivamente, que se mantienen constantes en agua, acetonitrilo y metanol, los disolventes más utilizados como fase móvil. Inoue y col., compararon los límites de detección instrumental obtenidos para la determinación de BPA mediante LC acoplado a detector electroquímico (ED), FD y UV (Inoue y col., 2000). Los límites de cuantificación instrumental para BPA por LC-fluorescencia están en el rango 5-50 ng/mL (Ballesteros-Gómez y col, 2009) y aunque no es necesario para el análisis, se derivatiza para aumentar la especificidad de la determinación evitando las posibles interferencias de otros compuestos (Naassner y col., 2002).

Para el análisis de rutina de BPA, actualmente se utiliza la LC-MS/MS para evitar la etapa de derivatización, reducir la manipulación de la muestra y el tiempo de análisis. La cuantificación debería ser llevada a cabo por dilución isotópica (Vaughn y col., 2011) para corregir recuperaciones y superar el efecto matriz (Gallart-Ayala y col., 2009), aunque también se utilizan otros métodos de cuantificación, como por ejemplo patrón de recuperación y adición estándar (Xu y col., 2005; Gallart-Ayala y col., 2007) tal y como se ve en la tabla 2.2., que incluye diversos estudios de determinación del BPA mediante LC-MS(MS). Adicionalmente se recomienda el uso de blancos para evitar problemas de contaminación.

Respecto a la fragmentación en LC-MS., a diferencia de GC-MS, el BPA en HPLC-MS muestra un pico base a m/z 227 que corresponde al ión molecular [M-H]⁻ medido en modo de ionización negativo. Utilizando una interfase de ESI, que en modo NI da niveles de sensibilidad más altos que la APCI, el principal fragmento, se observa adicionalmente a m/z 212, que resulta de la pérdida de uno de los grupos CH₃. Utilizando la interfase de APCI se obtiene más fragmentación y se obtienen iones adicionales a m/z 211 y m/z 133 y a menudo se utilizan bajos

voltajes de fragmentación para maximizar la señal del ión molecular (m/z 227) y se obtienen LODs para muestras acuosas en el rango 25-100 ng/L (Petrovic y col., 2002).

La adición de ácido acético y acetato de amonio a la fase móvil, disminuye fuertemente la respuesta de NP, OP y BPA y la de sus derivados halogenados, aunque en menor grado, cuando se utiliza interfase ESI en modo negativo en combinación con metanol como modificador orgánico (Shao y col., 2005; Gallart-Ayala y col., 2007; Guerra y col., 2008). Sin embargo, algunos autores señalan que cuando la fase móvil es acetonitrilo, no afecta a la señal de BPA (Laganá y col., 2004; Shao y col., 2005; Gallart-Ayala y col., 2009).

Ftalatos: GC-MS ofrece generalmente mayor sensibilidad que LC-MS para la determinación de ftalatos. Sin embargo, LC-MS ofrece varias ventajas vs GC-MS, como mayor selectividad, cuantificación de PAEs en mezclas isoméricas más fiable, *clean up* más sencillo y tiempos de análisis más cortos (David y col., 2003). UHPLC permite reducir notablemente el tiempo de adquisición (*run time*), (Liu y col., 2014; Yang y col., 2014), y es más apropiado para analizar productos de degradación de PAEs, que los mismos PAEs, siendo especialmente útil como técnica alternativa para el análisis de metabolitos de ftalatos sin derivatización (Silva y col., 2004) y para la determinación de mezclas isoméricas de PAEs que no son suficientemente separadas por GC, tal y como ha comprobado Lin y col., (2003), al comparar a la GC-(EI)MS y la HPLC-(ESI)MSs (Lin y col., 2003). La separación de ftalatos mediante LC se lleva a cabo normalmente en fase reversa utilizando generalmente columnas C_{18} o C_8 , (Wu y col., 2008). En los últimos años se ha realizado también la determinación de los ftalatos mediante HPLC-MS/MS (Masia y col., 2013). La tabla 2.4. resume diferentes métodos para la determinación de PAEs en muestras medioambientales mediante LC-MS(MS), acopladas a diferentes detectores, incluyendo las condiciones de separación (tipo de columna, fase móvil, flujo, etc), los detectores y los límites de detección obtenidos.

Los PAEs pasan a través de una columna analítica empaquetada con una fase estacionaria en la cual son separados, generalmente apolar C_{18} ODS, usando una fase móvil que contenga un solvente orgánico como metanol o ACN y agua Milli-Q, ambos generalmente tamponados o acidificados (0.05–0.1% AcOH o TFA). Sin embargo, una columna C_8 proporciona mejores picos de separación para las mezclas isoméricas, con picos bien definidos y más estrechos que con la clásica C_{18} . Con la columna termostatazada entre temperatura ambiente y 80 °C, puede obtenerse mejor separación. En la Tabla 2.4. pueden verse las columnas utilizadas comúnmente en LC para el análisis de PAEs. Los detectores acoplados a la HPLC más utilizados para la detección de PAEs han sido el de UV-Visible y el de MS (Psillakis y col., 2003) para determinaciones medioambientales. Los PAEs pueden analizarse con detector MS en modo positivo, tanto con la interfase de APCI (Castillo y col., 2001) como con la de ESI (Masia y col., 2013), ambas en modo positivo:

- la HPLC-(APCI) MS proporciona el mismo ión base que la GC-(EI)MS, el m/z 149 para el DEP, DBP, BBP, DnOP y DEHP y el m/z 163 para el DMP, pero también proporciona otros iones característicos para cada ftalato que permiten su confirmación. En cambio,
- la HPLC-(ESI)MS se basa en la formación de los aductos de sodio, característicos para cada ftalato y para cada grupo isomérico, y proporciona información del ión molecular. Algunos estudios muestran que la fragmentación en HPLC-(ESI) MS/MS (PI) es similar a la de GC-(EI) MS, y ambas técnicas presentan LODs más bajos para la determinación de PAEs (Bermejo 2010)

Tabla 2.4. Métodos **LC-MS(MS)** utilizados para la determinación de ftalatos en el medio acuático. Adaptado de (Bermejo Barrera y col., 2010).

Compuestos	Matriz muestra	Columna analítica	Detector Iones	LODs / LOQ	Ref.
DEHP, DEP, 5 PAEs	Agua	Zorbax SB C8 (150 mmx 4.6 mm i.d. 5 µm diámetro partícula)	UV Longitud de onda (λ) : 280 nm	2.0, 1.0 5.0 ng/mL	Liang y col., 2008
DBP, DCHP, DOP DNP, DDP	Aguas	Zorbax Eclipse XDB C8 (150 mmx 4.6 mm i.d. 5 µm diámetro partícula)	UV λ: 226 nm		Cai y col., 2003
DEP, DnPP, DiPP DcHP DBP, DEHP	Agua de río y mar	Agilent Zorbax Eclipse XDBC8 (150 mmx 4.6 mm i.d. 5 µm diámetro part.	UV λ: 226 nm		Cai y col., 2003
DBP, DEHP	Agua residual	Inertsil ODS 2 (4.6 mm i.d. x 250 mm, 5 µm tamaño partt.) y Speriorex ODS (1.0 mm i.d. x 150 mm, 5 µm tamaño part.)	UV λ: 254 nm	LOQ : ≤ 0.1 y 0.5 ng/mL	Saito y col., 2002
BBP, DBP, DCP	Agua de río	MIGHTYSIL RP-18 GP 150 (150 mmx 4.6 mm i.d.)	UV λ: 254 nm		Katsumata y col., 2004
DEP, DnPP, DnBP, DcHP, DEHP	Aguas	Diamonsil-C ₁₈ (250 mm x 4.6 mm i.d. 4 µm diámetro partícula)	UV λ: 226 nm	0.12-0.17 µg/L	Li y col., 2008
DEP	Aguas	ChromCart (250 x 3.0 mm i.d.) empaquetada con Nucleosil C18-50 dp 5 µm. Termostatzada a 30 °C.	UV λ: 254 nm	LOQ: 5 ng/L	Kelly y col., 1999
DEP, DPP, BBP, DBP, DAP, DCHP, DHP, DEHP, DOP	Aguas	Hypersil ODS (150 mm x 4.6 mm i.d. 5 µm diámetro partícula)	UV λ: 225 nm		Mitani y col., 2004
DBP, DEHP	Muestras de agua medioambiental	A Genesis C ₁₈ (5cm x 4.6mm i.d. 4 µm diámetro partícula)	UV λ: 230 nm	1 y 2.5 µg/L	Chafer-Pericás y col., 2008
DPP, DIBP, DMP, DEP, DBP, BBP, DCHP, DEHP, DNOP, DAP, DHP	Soluciones patrón	Acquity UPLC BEH phenyl (Waters) (50mm x 2.1mm 1.7µm tamaño partícula a 45°C. Agilent SB-phenyl (250mm x 4.6mm, 5µm t.p. termostatzado a 25°C.	UV λ: 225 nm		Wu y col., 2008
DEP, DBP, DEHP	Fango	Lichrospher 100 RP-18 (250 x 4 mm y 5 µm tamaño partícula)	APCI-MS. ESI (PI) Valores m/z: 149.	15, 25, 50 ng/g	Petrovic y col., 2000
DMP, DEP, DBP, DEHP, DOP	Agua residual urbana	Gemini C ₁₈ (150mm x 4.6 mm i.d., 5 µm tamaño partícula)	APCI (o) ESI-MS. Valores m/z: 149 todos los PAEs excepto: 199, 163 (DMP)	LOQ (ng/L): 57, 12, 25, 19, 41, 26.	Zafra-Gómez y col., 2008
DBP, DMP, DEHP	Efluentes industriales	Hypersil Green ENV (5µm, 150 mm x 5mm)	APCI-MS. Iones m/z: 149	0.06-0.08 µg/L	Castillo y col., 1997
DEP, DEHP, BBP, DBP	Aguas residuales (sin tratar y efluentes)	Hypersil c ₁₈ (150 mm x 4.6 mm i.d. 5 µm diámetro partícula)	APCI-MS. Iones m/z: 279 (DBP), 313 (BBP), 391 (DEHP)	0.07 µg/L (BBP), 0.01 µg/L (DBP y DEHP).	López-Giménez y col., 2005
DBP, DEHP	Fangos y sedimentos	Supelcosil LC-8 columna de 25cm x 1.0mm i.d., 5 µm tamaño partícula.	ESI-MS. Iones m/z: 279 (+) (DBP), 391 (+) (DEHP)		Moder y col., 1998
DMP, DEP, BBP, DBP, DEHP	Agua y sedimentos	Kromasil 100 C18 (5µm, 25 mm x 0.46 mm)	APCI (PI)-MS. Iones m/z: 163 (DMP), 177 (DEP), 313 (BBP), 279 y 205 (DBP) 391 y 371 (DEHP)	0.05-1 µg/L	Gimeno y col., 2003

2.1.2. OBJETIVOS

Las familias de EDCs estudiadas en esta tesis tienen distintas propiedades físico-químicas y necesitan métodos multiresiduo para su determinación en el medioambiente. Se ha seleccionado la extracción en fase sólida (SPE) como técnica de pre-tratamiento de la muestra. Para el análisis de los EDCs seleccionados se ha optimizado un método de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), con el objetivo de desarrollar un método multiresiduo suficientemente sensible para la determinación de las familias de EDCs seleccionadas, presentes en el medio ambiente a niveles de $\mu\text{g/L}$, con la reducción de tiempo y coste que comporta.

El principal objetivo fue establecer una metodología integrada para la determinación de la concentración de los compuestos disruptores endocrinos estudiados y la actividad estrogénica de las muestras mediante LC-ESI-MS y el ensayo de levaduras recombinantes RYA respectivamente, para su aplicación en muestras del medio acuático y por tanto:

- Desarrollar un método multiresiduo basado en la extracción en fase sólida y análisis mediante LC-MS con interfase de electrospray, para la determinación de 27 compuestos disruptores endocrinos de diversas familias (estrógenos, alquilfenoles, alquilfenoles etoxilados, bisfenol A, ftalatos y benzotiazoles) en aguas superficiales y residuales
- Aplicar el ensayo de Levaduras Recombinales (RYA) para la determinación de la estrogenicidad total de la muestra y
- Correlacionar los resultados obtenidos mediante el análisis químico y el bioensayo RYA

Posteriormente se añadió el análisis confirmatorio mediante LC-MS/MS para identificar y cuantificar los estrógenos presentes en las muestras de agua a niveles más sensibles (ng/L).

2.2. RESULTADOS

METODOLOGÍA DE LC-MS y ENSAYO DE LEVADURAS RECOMBINANTES (RYA)

En el siguiente artículo “Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface water and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS”, se presenta la metodología desarrollada en esta tesis, propuesta para una correcta determinación de EDCs en el medioambiente, que combina:

- la extracción de los analitos mediante SPE seguida del análisis químico mediante LC-MS con interfase de electrospray, con un método multiresiduo que permita el análisis satisfactorio de las distintas familias de EDCs seleccionadas ‘
- la aplicación del ensayo de levaduras recombinantes RYA, desarrollado y validado previamente por García-Reyero y col., en el Dpto. de Biología Molecular del CSIC (García-Reyero y col., 2001), para la determinación de la estrogenicidad total de la muestra

Las condiciones de la metodología utilizada son descritas en el artículo científico adjunto.

Brevemente, el esquema del procedimiento experimental utilizado en el ensayo RYA fue el siguiente:

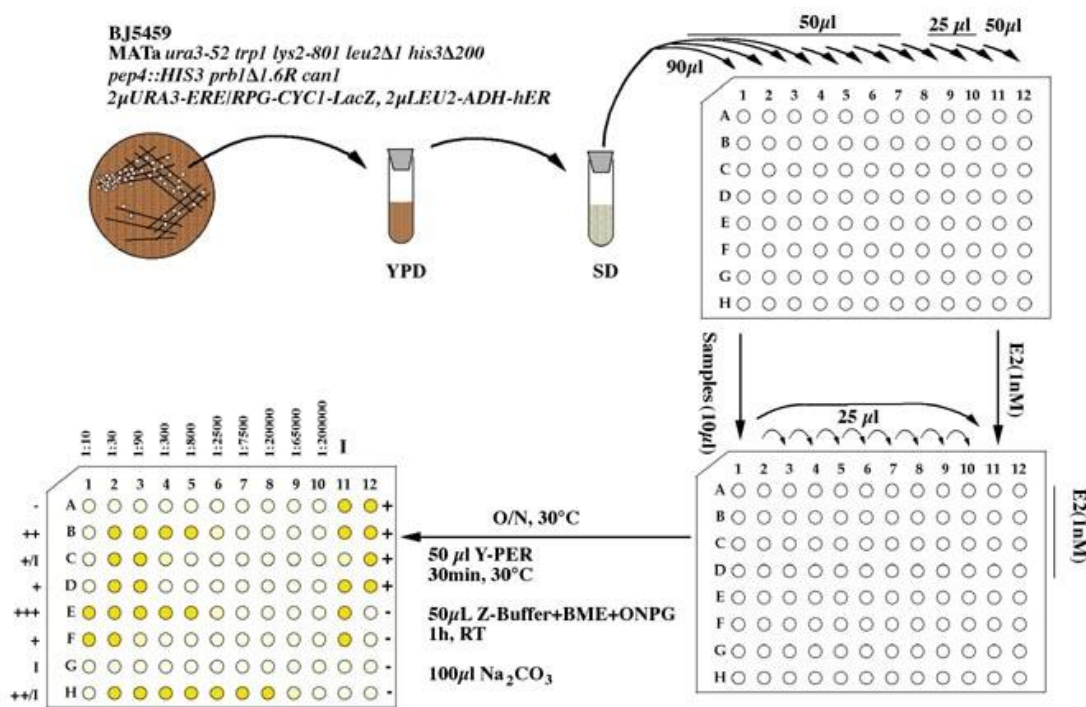


Figura 2.3. Procedimiento experimental seguido para realizar el ensayo de levaduras recombinantes (RYA). Fuente (Piña, B.)

Artículo científico número 1:

“Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface water and sediments by use of the 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 y D. Barceló

Analytical and Bioanalytical Chemistry. Vol. 378 (2004) 697-708

Raquel Céspedes · Mira Petrovic · Demetrio Raldúa
Úrsula Saura · Benjamín Piña · Silvia Lacorte
Paula Viana · Damià Barceló

Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC–ESI–MS

Received: 23 May 2003 / Revised: 12 September 2003 / Accepted: 22 September 2003 / Published online: 5 December 2003
© Springer-Verlag 2003

Abstract An integrated procedure using mass spectrometry and molecular biology for determination of estrogenicity in natural waters and sediments is reported. Solid-phase extraction (SPE) and pressurized-liquid extraction (PLE), respectively, were used for isolation of endocrine-disrupting compounds (EDC) from surface waters and sediments, followed by liquid chromatography–mass spectrometry using an electrospray interface (LC–ESI–MS). Twenty seven EDC were determined: non-ionic surfactants (nonylphenol ethoxylate), alkylphenols (e.g. nonylphenol and octylphenol), bisphenol A, phthalates, and natural and synthetic steroid sex hormones. Limits of detection varied from 0.02 to 0.22 $\mu\text{g L}^{-1}$ and from 1 to 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in water and sediments, respectively. Recoveries ranged from 65 to 125% and 73 to 97% for waters and sediments, respectively. In addition to LC–ESI–MS determination, extracts obtained by SPE and PLE were analyzed by the recombinant yeast assay (RYA) to assess total estrogenic activity. This bioassay detects natural estrogens and xenoestrogens, producing a quantitative measurement of EDC irrespective of the identity of the chemical responsible for the activity. As a novelty, a relative estrogenicity factor was determined for 19 analytes with EC_{50} values ranging from 10^{-10} to 10^{-9} mol L^{-1} for synthetic estrogens, from 10^{-7} to 10^{-5} mol L^{-1} for alkylphenol derivatives, and from 10^{-5} to 10^{-4} mol L^{-1} for phthalates and benzothiazoles. By use of this integrated chemical–ecotoxicological approach good correlation was usually established between chemical composition and estrogenic effects for surface water and sediment samples

from Portugal. Estrogenic activity observed was mainly attributed to the presence of nonylphenolic compounds (with concentrations of NP ranging from 0.1 up to 44 $\mu\text{g L}^{-1}$ in waters and up to 1172 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in sediments), and to the sporadic presence of estrogens, detected at ng L^{-1} levels.

Keywords Endocrine-disrupting compounds · Estrogenicity · Recombinant yeast assay · Liquid chromatography–mass spectrometry.

Introduction

There is growing evidence that some compounds, known as endocrine-disrupting compounds, can mimic or antagonize the actions of steroid hormones, affecting the health of humans and wildlife species by disrupting their normal endocrine function [1, 2, 3, 4]. An endocrine disrupter is an exogenous agent that causes adverse health effects in an intact organism, or its progeny and changes in endocrine function [5]. Xenoestrogens [6, 7], can modulate both the endocrine and immune systems resulting in alteration of homeostasis, reproduction [8], with similar effects to those produced by endogenous steroids such as 17β -estradiol (E2) [1, 9, 10].

Endocrine disruptors can exert physiological effects at very low concentrations. For instance, E2 and 17α -ethinylestradiol (EE) are reported to be estrogenic to fish at levels as low as 0.1 to 10 ng L^{-1} [11, 12, 13]. Environmental samples contain mixtures of low-potency disruptors, for example surfactants, which can be present in large amounts ($\mu\text{g L}^{-1}$ range) [14, 15, 16, 17, 18, 19, 20], and synthetic or natural estrogens, which can be present at ng L^{-1} levels [15, 21, 22, 23, 24].

A number of assays, both in-vitro and in-vivo, have been developed to identify and assess the activity of alleged estrogenic substances and the potency of different classes of natural and synthetic compounds. Several publications compare the advantages and drawbacks of the different bioassays used [14, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34]. Although in-vivo assays are widely used, they are

R. Céspedes · M. Petrovic · S. Lacorte · D. Barceló (✉)
Department of Environmental Chemistry, IIQAB-CSIC,
Jordi Girona 18–26, 08034 Barcelona, Spain
e-mail: dbcqam@cid.csic.es

D. Raldúa · Ú. Saura · B. Piña
Department of Molecular Biology, IBM-CSIC,
Jordi Girona 18–26, 08034 Barcelona, Spain

P. Viana
Instituto do Ambiente,
Rua da Murgueira, Zambujal, 2720 Amadora, Portugal

unsuitable for large-scale screening and their utility is further limited by their relatively poor sensitivity, higher cost, and time-consuming nature compared with in-vitro assays [28]. In-vitro bioassays, based on the mechanism of action of estrogens, are becoming increasingly important for identification and assessment of endocrine disrupters. They are efficient and cost-effective means of rapid screening of estrogenicity for large numbers of samples and compounds [28], while minimizing the use of test animals [1].

Among the different functional estrogenicity assays currently available the recombinant yeast assay (RYA) [27, 28, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43] is one of the most convenient means of evaluating the potential for endocrine disruption of a substance or, as in this work, an environmental sample [43]. The use of yeasts to study estrogenicity has many advantages, for example, the yeasts are easy to manipulate and grow, provide the opportunity to screen large numbers of chemicals quickly at low cost, and enable simultaneous evaluation of acute toxicity [44]. García Reyero et al. have used the RYA to test environmental samples [35]. It detects both natural estrogens (for example 17 β -estradiol, estriol, and estrone) and xenoestrogens (for example alkylphenols and bisphenol A).

The list of possible endocrine-disrupting compounds is long. For obvious reasons it is not possible to include all of them when designing an analytical procedure for their determination in water and sediment samples. Estrogenic compounds studied in this work were:

1. non-ionic surfactants, for example nonylphenol ethoxylate (NPEO), and octylphenol ethoxylate (ORFO) and their degradation products nonylphenol (NP) and octylphenol (OP), respectively [45, 46, 47, 48];
2. bisphenol A (BPA), monomer of polycarbonate, used in packaging, as coating in food cans, and in epoxy resins and many other products [49, 50, 51];
3. phthalates, used mainly as plasticizers [27, 52, 53];
4. natural and synthetic steroid sex hormones (the natural estrogen estradiol, and its main metabolites estriol and estrone, and the synthetic estrogens ethinyl estradiol (used in pills for contraception and for treatment of menstrual and menopausal disorders) [54] and diethylstilbestrol, the natural hormone progesterone, and the synthetic progestogens norethindrone and levonorgestrel, used in the treatment of infertility, in certain breast and endometrial cancers, etc [55]); and
5. benzothiazoles, industrial chemicals used as vulcanization accelerators in rubber manufacture [56, 57, 58].

Some of these are included in the list of priority hazardous substances in the European Water Framework Directive (WFD) 2000/60/EC [59], and in the US EPA priority pollutant list [60]. These compounds can be found in surface water and waste water as a result of point and non-point source contamination [22, 46].

In previous work our group [14, 15, 35] has combined the use of LC-MS with either the determination of vitellogenin [14, 15], or the recombinant yeast assay (RYA) [35]. This type of approach can be regarded as a toxicity

identification evaluation (TIE) procedure for EDC in the environment. In this work we have included and modified the previous TIE procedure for endocrines. First, we expanded the list of analytes to achieve better evaluation of estrogenicity in real-world samples. Second, we have also investigated estrogenicity in the extracts of sediment samples. In addition to these two objectives, we also established a relative estrogenicity factor for all substances studied that will enable us to achieve comprehensive evaluation of the estrogenicity observed and the levels found.

Main objectives were:

1. to develop and apply a multiresidue method based on LC-MS to determine 27 alleged EDC in surface water and sediment samples;
2. to determine the 50% effective concentration (EC_{50}) and the estradiol equivalents individually for each compound tested, and to evaluate the total estrogenicity of the samples via RYA;
3. to correlate which compounds and at which concentrations endocrine disruption occurs, for these different types of sample; and
4. to propose RYA as a quick screening procedure for determining the endocrine toxicity of environmental samples.

Experimental

Chemical analysis

Materials, standards, chemicals, and reagents

The standards used in this study were laboratory-synthesized nonylphenol monoethoxylate (NP₁EO) and nonylphenol diethoxylate (NP₂EO). The technical mixture of polyethoxylated surfactants alkylphenol polyethoxylates Findet 9Q/22 was purchased from Kao Corporation (Barcelona, Spain). This mixture of NPEO contains chain isomers and oligomers with an average of 10 ethoxy units. Phthalates, benzothiazoles, 4-*tert*-octylphenol (OP), technical grade 4-nonylphenol (NP), and high-purity (98%) 4-heptylphenol (used as the internal standard) were obtained from Aldrich (Milwaukee, USA). The internal standard bis(2-ethylhexyl) phthalate (ring-D₄, high purity 98%) was purchased from Cambridge Isotope Laboratories (Massachusetts, USA). Pure standards of both natural and synthetic estrogens and progestogens, including the internal standard equilin-2,4,16,16-d₄ were purchased as powders from Sigma (St Louis, MO, USA).

Stock solutions of individual standards and standard mixtures were prepared at 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ methanol. Working standard solutions were obtained by further dilution of stock solutions with methanol.

HPLC-grade solvents (water, methanol, acetonitrile, acetone, and dichloromethane) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Analytical grade sodium acetate was purchased from Panreac (Barcelona, Spain).

Sample collection

Water samples and corresponding sediments were collected during spring 2002 at seven points along different rivers in Portugal (Table 1). The textile industry prevails in PRP, PM, and Fz whereas PNB, RA, MdV and PdS contain agricultural activity. MdV and RA were located near the paper industry and a variety of industrial plants are located in PdS area.

Surface water samples were taken in Pyrex borosilicate glass containers. Each bottle was rinsed with tap water and with high

Table 1 Sampling points from Portugal (from North to South) with the corresponding codes

Sampling points	Code
Ponte Nova Barcelos	PNB
Formariz	Fz
Ponte Moreira	PM
Ria Aveiro (Foz do Rio Novo)	RA
Ponte Ribeira Pernes	PRP
Monte da Vinha	MdV
Ponte do Sacavém	PdS

purity water before sampling. Samples were stored at 4 °C immediately after sampling. This step was carried out in the Direção Geral do Ambiente (DGA) laboratories following this procedure. After drying SPE cartridges were wrapped in aluminium foil and frozen at -20 °C and sent via courier service to the laboratory of IIQAB-CSIC in Barcelona.

Sediments were collected in Portugal using a grab sampler, transferred to the laboratory stored at 4 °C, then frozen at -20 °C and finally lyophilized.

Sample preparation

Water samples. Water samples were filtered through 0.45- μm membrane filters and extracted within 48 h, to avoid degradation of target compounds.

Preconcentration: Solid-phase extraction (SPE) with LiChrolut RP-18 (500 mg, 6 mL) sorbent (Merck) was performed using an automated sampler processor ASPEC (Automated Sample Preparation with Extraction Columns) XL from Gilson (Villiers-le-Bel, France), fitted with a 817 switching device and an external 306 LC pump. SPE cartridges were conditioned by passing 7 mL acetonitrile, 5 mL methanol, and 5 mL LC-grade water through the cartridge at a flow rate of 3 mL min⁻¹. Filtered water samples (500 mL) were percolated through the C₁₈ cartridges at 5 mL min⁻¹. After preconcentration the sorbents were completely dried (30 min) using a Baker SPE 12 g apparatus (J.T. Baker, Deventer, Netherlands) connected to a vacuum system set at -15 psig.

The elution step was performed with acetonitrile (2x5 mL, with a 5-min delay between each portion). After elution, the eluates were evaporated to dryness with a gentle stream of nitrogen and reconstituted with methanol, to a final volume of 300 μL , before analysis. Internal standards, 4-HP for alkylphenolics and equilin-2,4,16,16-d₄ for estrogens, were added to the final extract at 1000 and 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectively, because estrogens are detected in the environment at lower levels than alkylphenols.

Sediment samples. The procedure used for sediment extraction is described elsewhere [61]. Extractions were carried out using a Dionex ASE 200 (Dionex, Idstein, Germany). Freeze-dried sediment (125- μm fraction, 5 g) was mixed thoroughly with Na₂SO₄, placed in 11-mL stainless steel extraction cells, and extracted with a 1:1 (v/v) mixture of acetone and methanol at 75 °C, 1500 psig; the heating time was 5 min and two cycles of static extraction, each for 5 min, were used. As a final step the cell was purged with gaseous nitrogen. The total volume of extract was ~20 mL. The extracts were concentrated to an approximate volume of 1 mL by rotary vacuum evaporation at 30 °C and re-dissolved in 100 mL of high-purity liquid chromatography (HPLC) water. Subsequent clean up of extracts was performed by SPE using LiChrolut C18 cartridges (Merck) as described above for water samples.

Liquid chromatography–mass spectrometric analysis

HPLC was performed with an HP 1100 autosampler fitted with a 100- μL loop and an HP 1090 A LC binary pump, both from

Hewlett–Packard (Palo Alto, CA, USA). Compounds were separated on a 250 mmx4 mm i.d., 5- μm particle, C₁₈ reversed-phase column (LiChrospher 100 RP-18) preceded by a guard column (4 mmx4 mm, 5- μm) of the same packing material (Merck). The injection volume was 20 μL and the flow rate was 1 mL min⁻¹. The extraction voltage used in both negative ionization (NI) and positive ionization (PI) modes was 90 V. The separation was performed under gradient elution conditions using methanol (A) and water (B) in PI mode, and acetonitrile (A) and water (B) in NI mode. The solvent program used in PI mode was: initial conditions 70% B for 3 min, linearly reduced to 35% B in 10 min, to 20% B in 5 min, continue increasing the proportion of organic solvent to 10% B in 5 min, kept isocratic for 8 min, linearly decreased to 0% B in 10 min and kept isocratic for 10 min. Gradient elution for NI mode started with 80% B, linearly reduced to 40% B in 12 min, to 35% in 8 min, to 10% in 10 min, and to 0% in 3 min, kept isocratic for 10 min. Detection was carried out using an HP 1040 M diode array UV–visible detector coupled in series with an LC–MSD HP 1100 mass-selective detector, equipped with an electrospray (ESI) interface.

Table 2 shows the diagnostic *m/z* ions and ionization mode applied for the compounds included in this study. The diagnostic ions used were: [M–H]⁻ ions for alkylphenolic compounds (NP, OP), BPA and estrogens, analyzed under NI mode, and [M+Na]⁺ for NPEO, phthalates, and progestogens, detected in PI mode. Before analysis in PI mode extracts were fortified with 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sodium acetate to avoid possible reduction in NPEO ionization because of insufficient metal ion availability [62, 63].

Quantitation

Quantitative analysis was performed in selected ion monitoring (SIM) mode using external calibration. Calibration curves were generated from 50 ng mL⁻¹ to 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and good fits (*r*²>0.990) were obtained. For quality control, standards at two concentration levels were injected after each 6–8 samples to check possible fluctuation in signal intensity. Confirmation criteria involved analysis in full-scan mode, and matching the retention time and the mass spectrum in PI and NI modes, respectively. The internal standards were used for process control, to check the extent of ion-suppression effects in ESI-MS detection. Thus, in NI mode 4-HP was used for the analysis of alkylphenolic compounds and equilin-2,4,16,16-d₄ for estrogens, whereas DEHP-d₄ was used for phthalates and NPEO in PI mode. A method blank was included in every analysis series, because almost all laboratory materials (e.g. solvents, glassware, and chemicals) can contain phthalates [64].

Recoveries and overall method reproducibility were determined in distilled water (*n*=6) and sediment (*n*=3). Distilled water was spiked with the standard mixture to a final concentration of 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, and freeze-dried river sediment was spiked at 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Samples were analyzed as described above, with a blank sample. Detection limits (*LOD*) were calculated using a signal-to-noise ratio of 3 (*S/N*=3). All results for sediment samples are expressed on dry-weight basis.

Recombinant yeast assay

Yeast strain BY4741 (MATa *ura3 Δ 0 leu2 Δ 0 his3 Δ 1 met15 Δ 0*, obtained from Euroscarf, Frankfurt, Germany) was transformed with the ER-expression plasmid pH5HE0 and the reporter plasmid pVITB2x, as described in Ref. [35].

Transformed clones were grown overnight in minimal medium (SD, 6.7 g L⁻¹ yeast nitrogen base without amino acids; 20 g L⁻¹ glucose, supplemented with 0.1 g L⁻¹ of prototrophic markers as required). The final culture was adjusted to an optical density (*OD*) of 0.5 and split into 50- μL aliquots in a 96-well polypropylene microtiter plate (Nunc, Roskilde, Denmark). Samples (10 μL) were dispensed into wells on the first row and serial dilutions were prepared. One row per plate contained 50 μL of cells, 10 μL of the corresponding sample, and 1 nmol L⁻¹ 17 β -estradiol for inhibition analysis, and one row was devoted to positive (1 nmol L⁻¹ 17 β -estradiol)

Table 2 List of compounds studied, the ionization mode used for their LC-ESI-MS analysis, and the corresponding *m/z* ions monitored

Compound	Ionization mode	<i>m/z</i> ion
Alkylphenolic compounds		
NPEO (nonylphenol ethoxylates)	PI	287 [M+Na] ⁺ , <i>n</i> _{EO} =1 331 [M+Na] ⁺ , <i>n</i> _{EO} =2 375–771 (Δ44) [M+Na] ⁺ , <i>n</i> _{EO} =3–12
OPEO (octylphenol ethoxylates)	PI	273 [M+Na] ⁺ , <i>n</i> _{EO} =1 317 [M+Na] ⁺ , <i>n</i> _{EO} =2 361–757 (Δ44) [M+Na] ⁺ , <i>n</i> _{EO} =3–12
NPE ₁ C, <i>n</i> _{EO} =0 (nonylphenol carboxylates)	NI	277 [M–H] [–] , 219 [M–CH ₂ COOH] [–]
NPE ₂ C, <i>n</i> _{EO} =1 (nonylphenol ethoxy carboxylates)	NI	321 [M–H] [–] , 219 [M–CH ₂ CH ₂ OCH ₂ COOH] [–]
OPE ₁ C, <i>n</i> _{EO} =0 (octylphenol carboxylates)	NI	263 [M–H] [–] , 205 [M–CH ₂ COOH] [–]
OPE ₂ C, <i>n</i> _{EO} =1 (octylphenol ethoxy carboxylates)	NI	307 [M–H] [–] , 205 [M–CH ₂ CH ₂ OCH ₂ COOH] [–]
NP (nonylphenol)	NI	219 [M–H] [–]
OP (octylphenol)	NI	205 [M–H] [–]
Biphenolic compounds		
BPA (bisphenol A)	NI	227 [M–H] [–]
Steroid sex hormones		
E1 – estrone	NI	269 [M–H] [–]
E2 – β-estradiol	NI	271 [M–H] [–]
E3 – estriol	NI	287 [M–H] [–]
EE – ethinyl estradiol	NI	295 [M–H] [–]
DES – diethylstilbestrol	NI	267 [M–H] [–]
PRO – progesterone	PI	337 [M+Na] ⁺ , 651 [2M+Na] ⁺
NOR – norethindrone	PI	321 [M+Na] ⁺ , 619 [2M+Na] ⁺
LEV – levonorgestrel	PI	335 [M+Na] ⁺ , 648 [2M+Na] ⁺
Benzothiazoles		
HOBT – 2-hydroxybenzothiazole	NI	150 [M–H] [–]
Phthalates		
DMP – dimethyl phthalate	PI	217 [M+Na] ⁺
DEP – diethyl phthalate	PI	245 [M+Na] ⁺
DBP – dibutyl phthalate	PI	301 [M+Na] ⁺
BBP – butyl benzyl phthalate	PI	335 [M+Na] ⁺
DEHP – di(2-ethylhexyl) phthalate	PI	413 [M+Na] ⁺ 804 [2M+Na] ⁺

and negative (methanol) controls. Plates were incubated for 4 h at 30 °C with gentle shaking. After incubation, 50 μL Y-PER (Pierce, Rockford, IL, USA) was added to each well and further incubation was performed at 30 °C for 1 h. Afterward, 50 μL buffer Z (60 mmol L^{–1} Na₂HPO₄, 40 mmol L^{–1} NaH₂PO₄, 10 mmol L^{–1} HCl, 1 mmol L^{–1} MgSO₄, pH 7.0) plus 0.5% 2-mercaptoethanol were added to the lysed cells. The β-galactosidase activity was determined by addition of 30 μL *ortho*-nitrophenyl β-D-galactopyranoside (Sigma, 4 mg mL^{–1} in water) and incubation at room temperature. The chromogenic reaction was stopped, when negative controls began turning yellow (5–30 min), by addition of 50 μL 1 mol L^{–1} Na₂CO₃. Plates were then read in a microtiter photometric reader at 504 nm.

Individual standards were analyzed by RYA to assess specific endocrine activity. Serial dilutions were performed as described above to produce a dose–response curve for each standard. *EC*₅₀ values (i.e. the concentrations at which each standard had 50% of its maximum effect) were calculated by non-linear regression, using at least seven independent determinations and assuming the following equation for the dose–response curve:

$$\frac{R}{R_{\max}} = \frac{1}{1 + \frac{K_d}{[H]}}$$

where *R* and *R*_{max} are the responses (β-galactosidase units) at a given ligand concentration ([H]) and at a saturating ligand concentration, respectively. *K*_d is the dissociation constant of the ligand–hormone complex; its apparent value coincides with *EC*₅₀.

Results and discussion

LC method performance and quality data

An ESI interface was chosen for quantitative determination of endocrine-disrupting compounds in environmental samples, because of the better sensitivity obtained com-

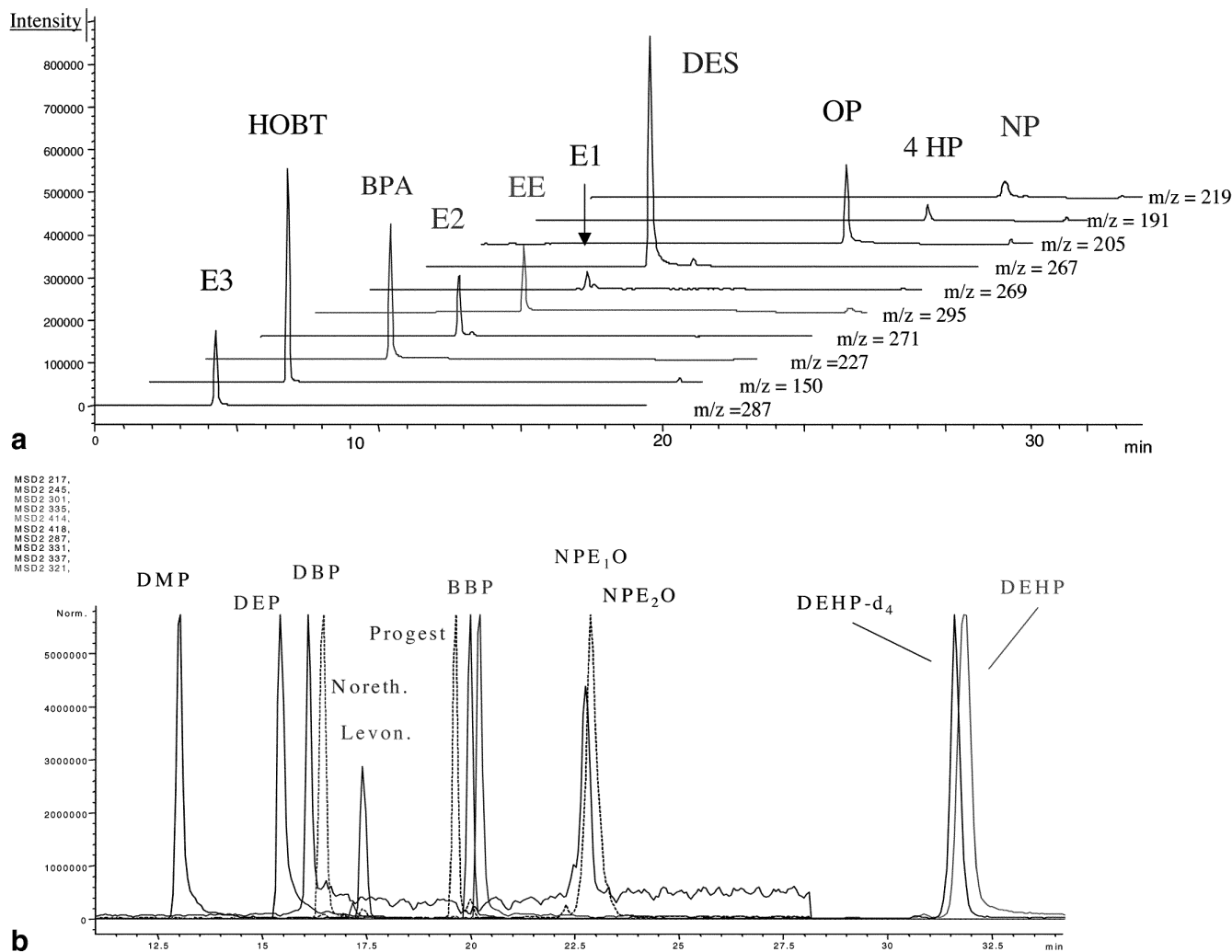


Fig. 1 Reconstructed ion chromatograms obtained by LC–ESI–MS: **A**: selected ion monitoring (SIM) in NI mode for a standard mixture of $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ OP, NP, BPA, estrogens, and HOBT; **B**: in PI mode for a standard mixture of $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ NPEO, phthalates, and progestogens

pared with the atmospheric pressure chemical ionization (APCI) interface. ESI is the interface most widely used for determination of estrogens [21, 65, 66, 67] and 40–50% higher sensitivity and selectivity was reported for APs [68]. In addition, López de Alda et al. showed that for determination of progestogens an ESI interface operating in PI mode resulted in *LOD* approximately one order of magnitude better than those achieved with APCI [66]. The ESI interface was operated in PI mode for analysis of NPEO, phthalates ($[\text{M}+\text{Na}]^+$ being the only quasi-molecular species observed), and progestogens and in the NI mode for NP, OP, BPA, HOBT, and estrogen analysis. LC–ESI–MS chromatograms in NI mode, using the ions and conditions detailed in Table 2, are shown in Figs. 1 and 2, for a standard mixture and a real sample (PdS), respectively.

Recoveries and method detection limits calculated in SIM mode for every compound analyzed in water and

sediment samples are shown in Table 3. For water samples, recoveries obtained by SPE and LC–ESI–MS analysis of six replicates were between 58 and 125% (with a relative standard deviation (*RSD*) ranging from 3.2 to 17.3%), except for DES and DEHP. The low recovery percentage obtained for DES is probably not a consequence of the extraction procedure but the result of some kind of equilibrium between two different isomeric forms of the compound, as revealed by the presence of two peaks with the same mass spectrum at different retention times and with intensities that increase and decrease approximately inversely [14]. Recoveries were lowest for phthalates, so this multiresidue methodology developed is not the most appropriate for these compounds.

For sediment samples, PLE followed by SPE clean-up of extracts and LC–MS analysis resulted in recoveries between 73 and 97%. Overall precision of the analysis was satisfactory with *RSD* of triplicate measurements between 3.6 and 14.2%. No change in oligomeric distribution was observed for NPEO extracted from a spiked sediment compared with a spiking solution. Matrix-induced ion suppression was limited to 10%, as determined previously in a detailed study of this common problem in LC–ESI–MS analysis of complex environmental samples [61].

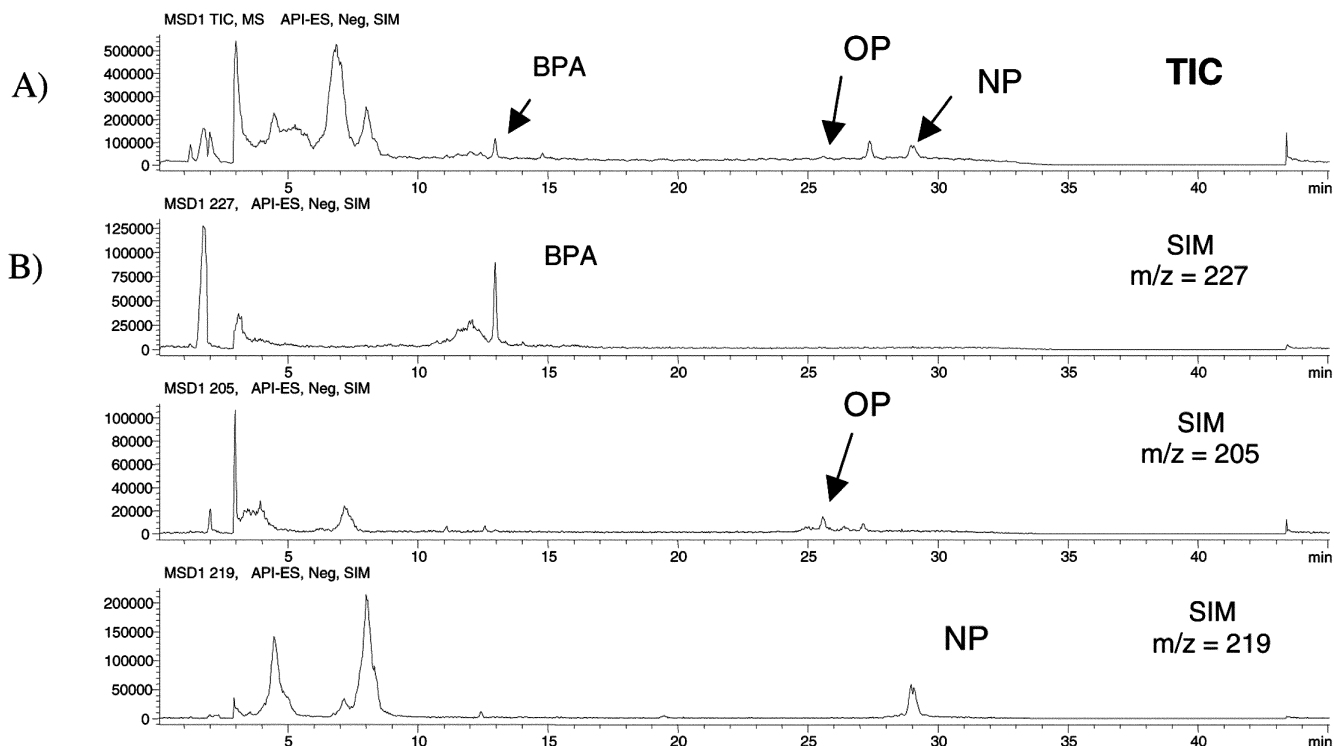


Fig. 2 LC-ESI-MS chromatograms obtained from the Ponte do Sacavém sample: **A**. total ion current (TIC); **B**. selected ion monitoring for BPA, OP, and NP

It should be emphasized that this article presents the concept and procedure for detecting estrogenicity by combining LC-MS and RYA. It is obvious that in a monitoring program MS-MS will be needed for final confirmation, because LC-MS often only gives a single ion, which is not enough for final confirmation. In addition, for some particular compounds, e.g. steroid sex hormones, MS-MS approaches are needed for final confirmation in real-world samples, because in addition to final confirmation there is a problem of sensitivity.

Performance of RYA assay and individual estrogenicity

The estrogenicity of all target compounds was determined by RYA. Dose-response curves were obtained for every compound and are depicted in Fig. 3 as plots of β -galactosidase activity, in arbitrary units, against compound concentration in $\mu\text{mol L}^{-1}$. Table 4 shows the 50% effective concentration (EC_{50}), detection limits, and estradiol equivalents (E2 eq.) for each compound tested in the recombinant yeast estrogen receptor assay.

On the basis of their chemical nature and the estrogenicity obtained the compounds tested can be classified into four groups:

1. The most estrogenic group comprises natural and synthetic estrogens (E2, E3, EE, DES, and E1), with EC_{50} values ranging between 0.1 and 10 nmol L^{-1} (corresponding to 40 and 2120 ng L^{-1}).

2. A second group comprises alkylphenol derivatives (OP, NP, and NP_1EO), with EC_{50} values between 0.3 and $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ (80 and $2995 \mu\text{g L}^{-1}$). The estrogenicity of NP_2EO and NP_1EC was negligible in our assay, although NP_1EC had substantial anti-estrogenic activity (not shown [36]). Our results indicate that NP is slightly more estrogenic than NPE_1O and NPE_2O . As far as we know, mono- and diethoxylate nonylphenols are the only alkylphenol ethoxylates with certain estrogenicity. No estrogenicity was observed for high ethoxylates.
3. For BPA and the plasticizers (DEHP, DBP, BBP, DMP, and DEP) EC_{50} values were still higher, between 5 and $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ (2.3 and 7 mg L^{-1}). DEHP, is more estrogenic than other phthalates. BBP has previously been shown to be estrogenic in the RYA [27, 33, 52].
4. The benzothiazoles BZT, HOBT, and MetBZ had the highest EC_{50} values (hence, the lowest estrogenicity), from 40 to $60 \mu\text{mol L}^{-1}$, corresponding to 5.5 and 7.8 mg L^{-1} . This concentration level is rarely found in the environment.

The table obtained for individual estrogenicity of all target analytes studied as endocrine-disrupting compounds is one of the most relevant achievements of this paper. By use of the estrogenicity factor of the different estrogenic compounds it will be easier to compare the chemical data obtained.

Combined RYA and chemical analysis for environmental samples

Simultaneous chemical and biological analysis was performed on surface river water and corresponding sedi-

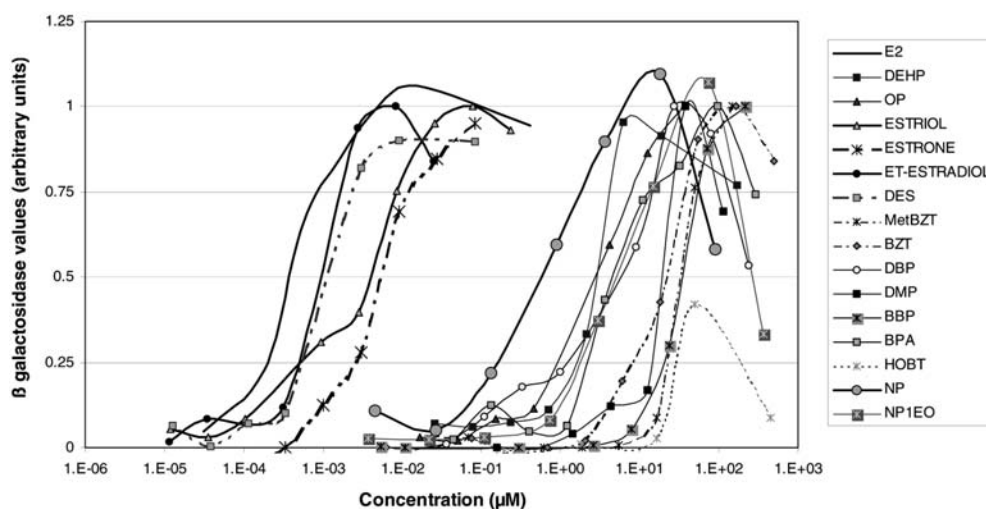
Table 3 Instrumental detection limits (*IDL*), recovery, and precision, expressed as relative standard deviation (*RSD*), and limits of detection in selected ion monitoring mode (*LOD_{SIM}*) of analysis of EDC in water samples using SPE–LC–MS and in sediment samples using PLE–LC–MS

Compound	Water samples ^a				Sediment samples ^b		
	IDL (ng)	Recovery (%)	RSD (%) n=6	LOD (µg L ⁻¹)	Recovery (%)	RSD (%) n=3	LOD (µg kg ⁻¹)
OP	0.45	71	6.7	0.09	77	6.7	1
NP	1.46	78	9.2	0.15	89	11	1
OP ₁ EC	–	–	–	–	73	6.2	1
NP ₁ EC	–	–	–	–	74	5.4	1
OP ₂ EC	–	–	–	–	79	7.1	2
NP ₂ EC	–	–	–	–	79	4.7	2
OP ₁ EO	–	–	–	–	94	9.8	5
OP ₂ EO	–	–	–	–	94	3.6	2
OP _n EO n _{EO} =3–15	–	–	–	–	94	4.1	1
NP ₁ EO	5.40	80	8.9	0.22	92	14.2	5
NP ₂ EO	0.62	91	6.5	0.06	94	6.9	2
NP _n EO n _{EO} =3–15	–	–	–	–	97	5.9	1
BPA	0.24	125	4.3	0.09	78	6.9	2
HOBT	0.04	65	3.2	0.02	–	–	–
DMP	0.17	58	11.4	0.18	–	–	–
DEP	0.09	60	7.8	0.18	–	–	–
DBP	0.06	66	7.6	0.19	–	–	–
BBP	0.06	66	7.8	0.19	–	–	–
DEHP	0.04	51	12.4	0.20	–	–	–
E1	2.34	93	3.6	0.10	81	10.5	5
E2	0.39	85	16.2	0.09	86	12.1	10
E3	0.38	92	17.8	0.09	79	9.8	2.5
EE	1.09	94	17.3	0.09	87	13.1	10
DES	0.15	61	23.5	0.25	78	12.0	2.5
PRO	0.22	94	9.4	0.20	91	8.6	2
NOR	0.18	83	12.8	0.20	94	9.0	2
LEV	0.14	89	12.6	0.09	89	11.0	2

^aWater samples: Preconcentration of 500 mL

^bSediment samples: Concentration factor 10 [61]

Fig. 3 Dose–response curves for a range of established and suspected estrogenic compounds. Values are represented as plots of β-galactosidase activity in arbitrary units against compound concentration (µmol L⁻¹)



ments. Samples were taken during the spring of 2002. Using this integrated chemical–ecotoxicological approach, generally good agreement between chemical composition and estrogenic effects was established. This bioassay detects both natural estrogens and xenoestrogens. Afterwards, using LC–MS, only some of the compounds causing the endocrine disruption were identified; identification of the other estrogenic compounds will require appli-

cation of more specific and sensitive analytical tools, for example LC–MS–MS [62, 69, 70]. The chemical profiles of the water and sediment samples, and the estrogenic response using the RYA, are compared in Figs. 4 and 5.

Table 4 50% effective concentration (EC_{50}), relative estrogenicity factor ($\mu\text{g L}^{-1}$) and detection limits ($\mu\text{g L}^{-1}$) obtained for different compounds in recombinant yeast ER assay

Compound	EC_{50} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	E2 equiv. ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^a	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^b
E2	$4 \times 10^{-2} \pm 4 \times 10^{-2}$	1.0000	0.0100
E3	$0.116 \pm 6.4 \times 10^{-2}$	0.3448	0.0274
EE	0.234 ± 0.128	0.1709	0.0538
DES	0.87 ± 0.438	0.04597	0.2207
E1	2.12 ± 1.16	0.01886	0.5339
NP	79.20 ± 19.8	5.05×10^{-4}	19.800
OP	188 ± 84	2.13×10^{-4}	63.920
NP ₁ EO	2983.2 ± 396	1.336×10^{-5}	748.63
NP ₂ EO	bdl ^c	bdl	bdl
NP ₁ EC	bdl	bdl	bdl
BPA	1644 ± 388	2.43×10^{-5}	490.32
DEHP	2306 ± 1456	1.735×10^{-5}	401.56
DBP	3960 ± 1500	1.01×10^{-5}	968.63
BBP	5160 ± 2160	7.752×10^{-6}	1124.6
DMP	4080 ± 1240	9.804×10^{-6}	1430.1
DEP	6960 ± 2360	5.747×10^{-6}	2131.9
BZT	5490 ± 1322	7.286×10^{-6}	2765.3
HOBT	6346 ± 1674	6.303×10^{-6}	2857.8
MeTBZT	7768 ± 3232	5.149×10^{-6}	3545.1

^aExpressed as the ratio between EC_{50} values for 17 β -estradiol and for the measured compound

^bDetection limit in the assay; no concentration factor from extraction is considered

^cBelow detection limit

Surface water samples

Nonylphenol mono- and diethoxylates (NP₁EO, NP₂EO), NP (with concentrations ranging from 0.1 to 44 $\mu\text{g L}^{-1}$), and DEHP were the most ubiquitous endocrine-disrupting compounds detected in water. The highest contamination of EDC in Portugal were detected mainly in industrial areas (PM and Fz, close to Porto) and an urban site (PdS, near Lisboa). Such “hot spots” are the same as were identified in a previous chemical monitoring program carried out from April 1999 until May 2000 [71], on the implementation of the 76/464/EC Directive on dangerous substances [72].

The results obtained by chemical analysis and by RYA are shown in Fig. 4. The chemical composition of different samples and the different dilution carried out for the RYA are shown in Figs. 4A and 4B, respectively. Figure 4C shows the E2 equivalents observed, calculated from the concentrations obtained by LC-MS and the E2 equivalence factors (Table 4). PM and PdS are the two sites with the highest E2equiv, whereas values are lower for site Fz (Fig. 4A). The total chemical levels detected corresponded mainly to NPE₁O and NP₂EO, for which estrogenicity was negligible in our assay.

For example, the most prominent peak in the RYA assay corresponded to PM, and corresponded to a significant increase in the amount of nonylphenol derivatives in this sample. We cannot, however, explain the relatively high estrogenicity of the MdV sample in terms of its

chemical composition. An explanation might be the presence of very low concentrations of other powerful estrogens (for example estradiol, DES, or others not studied in this work, for example phytoestrogens [34]). We should emphasize that this study was devoted to developing a method for 27 analytes, and involved much work, and we did not investigate the presence of inhibitors. To explain some of the data obtained we will consider inhibitors in the future; that, however, requires considerable analytical work that obviously cannot be performed for all samples.

Although chemical analysis seems to be more sensitive for nonylphenol and octylphenol derivatives (because the RYA detected them only when they were present at relatively high concentrations), RYA can detect estrogenic pollutants that seem to be below the detection limits of the chemical assay. In addition, the contribution of other natural and synthetic estrogens cannot be ruled out, because the levels present in receiving waters, although below our detection limits, could be high enough to contribute to the estrogenicity observed in aquatic organism (at levels as low as 1 to 10 ng L^{-1}) [11, 12, 13].

Sediment samples

Alkylphenolic compounds were the only EDC detected in sediment samples; the total concentration (NPEO+NP+NPEC) ranged from 155 to 2400 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Steroid sex hormones and BPA were below the LOD , and phthalates were not analyzed in these samples (because of the high background levels of phthalates produced by the multistep sample-preparation procedure applied). Thus, NP comprised 40 to 50% of all nonylphenolic compounds, with concentrations up to 1172 $\mu\text{g kg}^{-1}$. NP and short chain NPEO (NP₁EO and NP₂EO), are lipophilic compounds with $\log K_{ow}$ of 4.48 and around 4.2 respectively [73], so they partition preferentially into the organic fraction of sediments where these compounds are expected to undergo low photodecomposition and biodegradation under anaerobic conditions [46]. Sorbed compounds can persist in sediment for a long time [74]; thus, sediment is a modest sink for acidic degradation products (NPEC), because of their polarity and solubility in water. Thus NP₁EC and NP₂EC were detected in one highly polluted sample only (sampling site Formariz), probably reflecting close proximity to discharge of treated industrial wastewater.

Figure 5 shows there is a very good correlation between the chemical composition of the sediments and estrogenic effects. Thus estrogenic response obtained for sites Fz, then PdS, are in agreement with the high concentrations of alkylphenolic compounds in sediments at these sites. This reflects the heavy contamination of these sites. In some samples, for example MdV, the RYA assay indicates estrogenic activity that is not justified by the chemical data. This discrepancy might result from a combination of different factors. First, it has been reported that combinations of some weak estrogenic compounds can have a synergistic effect [75], giving a much stronger response than those predicted by addition of the single com-

Fig. 4 Correlation of chemical analysis and RYA for surface water samples in Portugal. **A.** Concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$) obtained by LC-ESI-MS for every compound analyzed. **B.** RYA dilutions in arbitrary units. **C.** Equivalents to β -estradiol (ng kg^{-1})

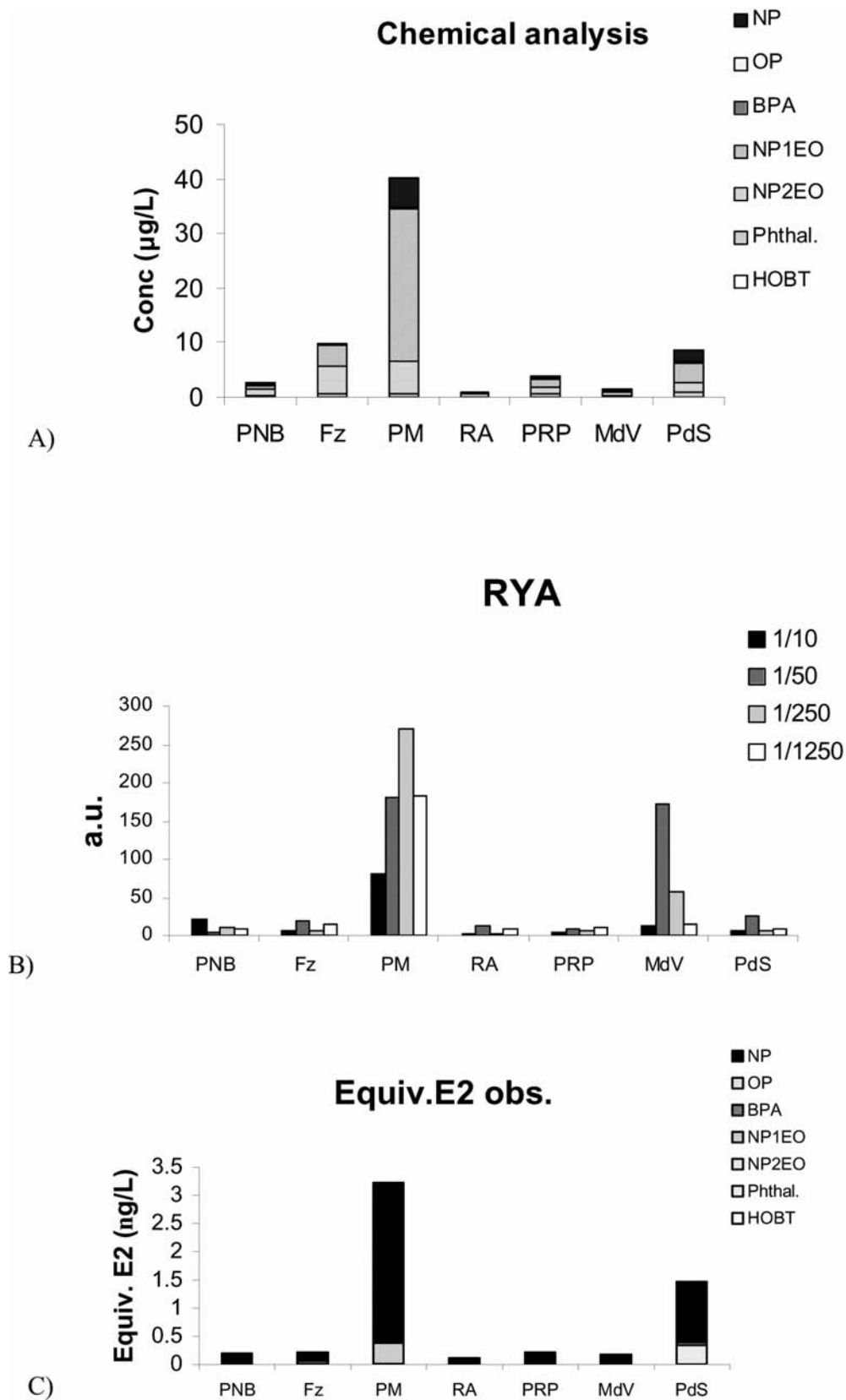
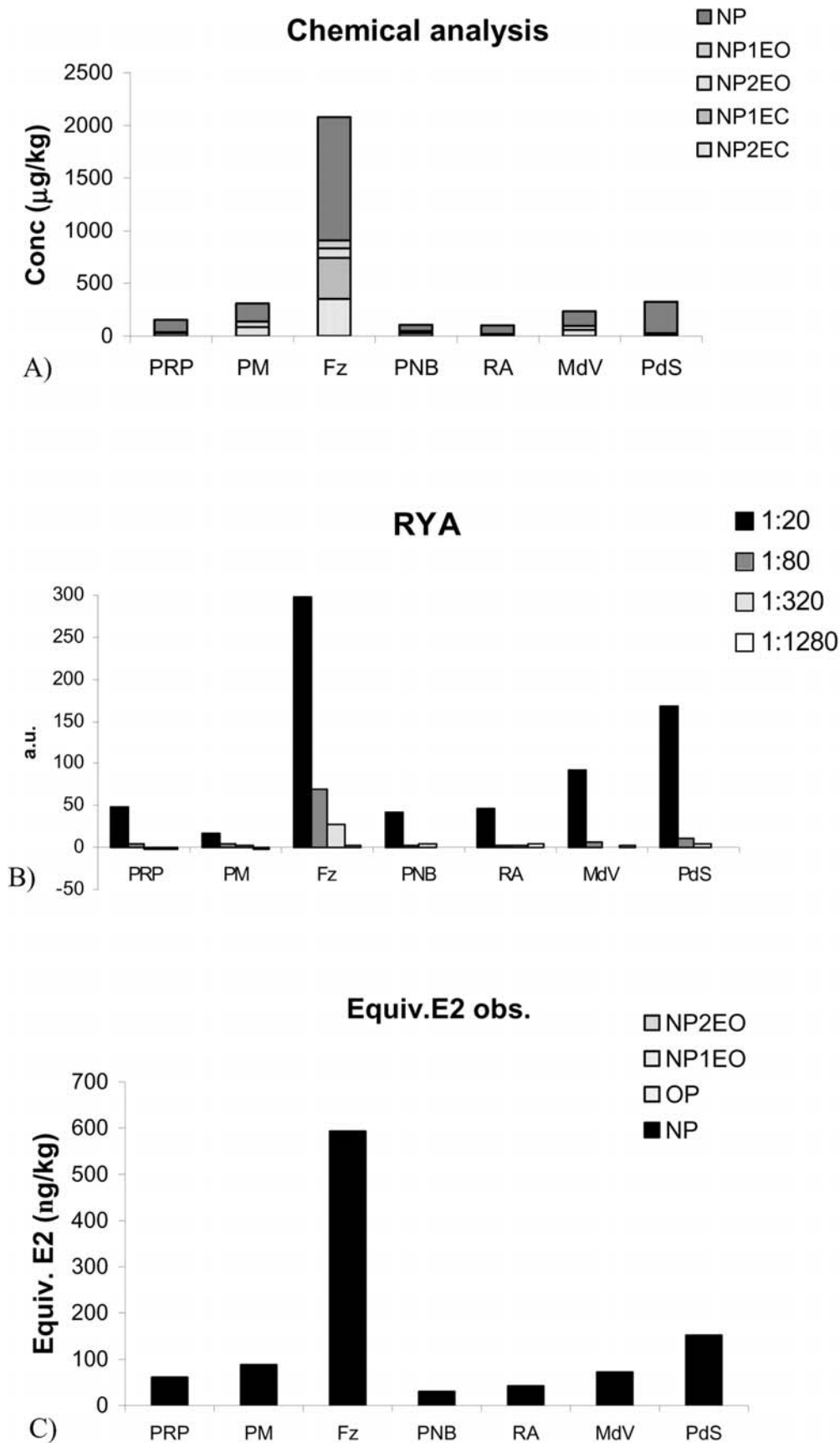


Fig. 5 Correlation of chemical analysis and RYA for sediment samples. **A.** Concentrations ($\mu\text{g kg}^{-1}$) obtained by LC-ESI-MS for the nonylphenolic compounds analyzed. **B.** RYA dilutions in arbitrary units. **C.** Equivalents to β -estradiol (ng kg^{-1})



ponents [76]. It is also possible that the samples contain uncharacterized, highly estrogenic compound(s), for example phytoestrogens [10, 34, 75, 77, 78] or PCB [79, 80], responsible for the observed estrogenicity. The final answer might well be a combination of both.

Conclusions

In this work, development and application of a multiresidue method for the simultaneous LC–MS analysis and RYA evaluation of EDC in water and sediments of seven sites in Portugal was described.

Using RYA, we obtained a wide spectrum of EC_{50} values for the measured compounds. In addition to the well-known estrogenic potential of synthetic estrogens, BPA, and alkylphenol derivatives we also found weak, but consistent, estrogenic activity as a result of much less well known and comparatively abundant compounds of the phthalate and benzothiazole families. For these compounds EC_{50} values were in the $\mu\text{mol L}^{-1}$ to mmol L^{-1} range, that is, they were 10^5 to 10^6 times less estrogenic than β -estradiol. Whether or not these low affinities are significant will depend on the effective concentration they can reach in the bodies of exposed biota, and on their capacity to synergize with other estrogenic compounds. These two properties are still basically unknown.

Estrogenic activity observed in Portuguese waters was mainly attributed to the presence of alkylphenolic compounds, the only EDC detected in sediments, and to steroid sex hormones, sporadically detected in water at very low levels (ng L^{-1}). Thus, NP_1EO , NP_2EO , NP (with concentrations ranging from 0.1 to $44 \mu\text{g L}^{-1}$ in water and up to $2240 \mu\text{g kg}^{-1}$ in sediments) and DEHP (in water) were the most ubiquitous compounds detected. The highest levels of nonylphenolic compounds were generally found in industrial areas. However, alkylphenolic compounds were also detected in areas without significant industrial activity, but with an intensive agricultural practice, where one of the possible sources of NPEO is the use of waste water sludge as a fertilizer. To conclude, the procedure described here is a rapid, simple, and low-cost screening tool for detection of estrogenic activity in water and sediment samples.

Acknowledgements This work was supported by the Portuguese Instituto do Ambiente (Ministerio das Cidades, Ordenamiento Territorio e Ambiente) and by Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain) (BMC2001–0246) to B. Piña. M. Petrovic acknowledges the “Ramon y Cajal” contract from the Spanish MCYT. We thank Roser Chaler and Dori Fanjul for technical assistance. Merck is acknowledged for the gift of the LC columns and the SPE cartridges used in the study.

References

- Gillesby BE, Zacharewski TR (1998) *Environ Toxicol Chem* 17:3–14
- Colborn T, vom Saal FS, Soto AM (1993) *Environ Health Perspect* 101:378–384
- Colborn T (1995) *Environ Health Perspect* 103:135–136
- Hileman B (1994) *Chem Eng News* 72:19–23
- European workshop on the impact of endocrine disrupters on human health and wildlife, Weybridge, UK, 2–4 December, 1996. Commission of the European Communities, EUR 17549. Brussels, 1997
- Sonnenschein C, Soto AM (1998) *J Steroid Biochem Mol Biol* 65:143–150
- Fawell JK, Wilkinson MJ (1994) *Aqua* 43:219–221
- Daston GP, Gooch JW, Breslin WJ, Shuey DL, Nikiforov AI, Fico TA, Gorsuch JW (1997) *Reprod Toxicol* 11:465–481
- Amaral Mendes JJ (2002) *Food Chem Toxicol* 40:781
- Tapiero H, Nguyen BG, Tew KD (2002) *Biomed Pharmacother* 56:36–44
- Pelissero C, Flouriot G, Foucher JL, Bennetau B, Dunoguès J, Le Gac F, Sumpter JP (1993) *J Steroid Biochem Mol Biol* 44:263
- Purdom CE, Hardiman PA, Bye VJ, Eno NC, Tyler CR, Sumpter JP (1994) *Chem Ecol* 8:275
- Routledge EJ, Sheahan D, Desbrow C, Sumpter JP, Waldock M (1998) *Environ Sci Technol* 32:1559
- Solé M, Lopez de Alda MJ, Castillo M, Porte C, Ladergaard-Pedersen K, Barceló D (2000) *Environ Sci Technol* 34:5076–5083
- Petrovic M, Solé M, López de Alda MJ, Barceló D (2002) *Environ Toxicol Chem* 21:2146–2156
- Ferguson PL, Iden CR, Brownell BJ (2001) *Environ Sci Technol* 35:2428–2435
- Ahel M, Molnar E, Ibric S, Giger W (2000) *Water Sci Technol* 42:15–22
- Snyder SA, Keith TL, Verbrugge DA, Snyder EM, Gross TS, Kannan K, Giesy JP (1999) 33:2814–2820
- Marcomini A, Pojama G, Sfriso A, Alonso JMQ (2000) 19: 2000–2007
- Isobe T, Nishiyama H, Nakashima A, Takada H (2001) *Environ Sci Technol* 35:1041–1049
- Baronti C, Curini R, D’Ascenzo G, Di Corcia A, Centili A, Samperi R (2000) *Environ Sci Technol* 34:5059–5066
- Desbrow C, Routledge EJ, Brighty GC, Sumpter JP, Waldock M (1998) *Environ Sci Technol* 32:1549–1558
- Routledge EJ, Sheahan D, Desbrow C, Brighty GC, Waldock M, Sumpter JP (1998) *Environ Sci Technol* 32:1559–1565
- Gentili A, Perret D, Marchese S, Mastropasqua R, Curini R, Di Corcia A (2002) *Chromatographia* 56:25–32
- Routledge EJ, Sumpter J (1996) *Environ Toxicol Chem* 15:241–248
- Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Olea Serrano F (1995) *Environ Health Perspect* 103:113
- Jobling S, Reynolds T, White R, Parker MG, Sumpter MG (1995) *Environ Health Perspect* 103:582–587
- Zacharewski TR (1997) *Environ Sci Technol* 31:613–623
- Gaido KW, Leonard LS, Lovell S, Gould JC, Babai D, Portier CJ, McDonnell DP (1997) *Toxicol Appl Pharmacol* 143:205–212
- Miller D, Wheals BB, Beresford N, Sumpter JP (2001) *Environ Health Perspect* 109:133
- Payne J, Rajapakse N, Wilkins M, Kortemkamp A (2000) *Environ Health Perspect* 108:983
- Murck AJ, Legler J, Van Lipzig MMH, Meerman A, Belfroid AC, Spenkeliink A, Rijs GBJ, Vethaak AD (2002) *Environ Toxicol Chem* 21:16–23
- Legler J, Dennekamp M, Dick Vethaak A, Brouwer A, Koeman JH, Van der Burg BB, Murck AJ (2002) *Sci Total Environ* 293:69–83
- Mueller SO (2002) *J Chromatogr B* 777:155–655
- García-Reyero N, Grau E, Castillo M, López de Alda M, Barceló D, Piña B (2001) *Environ Toxicol Chem* 20:1152–1158
- García-Reyero N, Requena V, Petrovic M, Fisher B, Hansen P-D, Ventura F, Diaz A, Barceló D, Piña B (2003) *Environ Toxicol Chem*, in press
- Routledge EJ, Sumpter JP (1997) *J Biol Chem* 272:3280

38. Metzger D, White JH, Chambon P (1998) *Nature* 334:31–36
39. Milligan SR, Balasubramanian AV, Kalita JC (1998) *Environ Health Perspect* 106:23
40. Fang H, Tong W, Perkins R, Soto AM, Prechtl NV, Sheehan DM (2000) *Environ Health Perspect* 108:723
41. Vinggaard AM, Korner W, Lund KH, Bolz V, Petersen JH (2000) *Chem Res Toxicol* 13:1214
42. Mathews JB, Twomey K, Zacharewski TR (2001) *Chem Res Toxicol* 14:149
43. Jungbauer A, Verena B (2002) *J Chromatogr B* 777:167–178
44. Ballatori N, Villalobos AR (2002) *Toxicol Appl Pharmacol* 183:207–220
45. White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP, Parker MG (1994) *Endocrinology* 135:175–182
46. Ying G-G, Williams B, Kookana R (2002) *Environ Int* 28:215–226
47. Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C (1991) *Environ Health Perspect* 92:167–173
48. Jobling S, Sumpter JP (1993) *Aquat Toxicol* 27:361–372
49. Krishnan AV, Stahis P, Permuth SF, Tokes L, Feldman D (1993) *Endocrinology* 132:2279–2286
50. Brotons JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, Pedraza V, Olea N (1995) *Environ Health Perspect* 103:608–612
51. Ben-Jonathan N, Steinmetz R (1998) *Trends Endocrin Metab* 9:124–128
52. Harris CA, Henttu P, Parker MG, Sumpter JP (1997) *Environ Health Perspect* 105:802–811
53. Fromme H, Kuchler T, Otto T, Pilz K, Müller J, Wenzel A (2002) *Water Res* 36:1429–1438
54. Martindale (1982) 28th edn, *The Extra Pharmacopeia*, London
55. Safe SH (1995) *Environ Health Perspect* 103:346–351
56. Reemtsma T (2000) *Rapid Commun Mass Spectrom* 14:1612–1618
57. De Wever H, Verachtert H (1997) *Water Res* 31:2673–2684
58. Evans JJ, Shoemaker CA, Klesius PH (2000) *Mar Environ Res* 50:257–261
59. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000, Commission of the European Communities, Brussels, 2000
60. <http://www.epa.gov>
61. Petrovic M, Lacorte S, Viana P, Barceló D (2002) *J Chromatogr A* 959:15–23
62. Petrovic M, Barceló D (2001) *J Mass Spectrom* 36:1173–1185
63. Petrovic M, Eljarrat E, López de Alda MJ, Barceló D (2002) *J Chromatogr A* 974:23–51
64. Jara S, Lysebo C, Greibrokk T, Lundanes E (2000) *Anal Chim Acta* 407:165–171
65. Ferguson PL, Iden CR, McElroy AE, Brownwell J (2001) *Anal Chem* 73:3890
66. López de Alda MJ, Barceló D (2000) *J Chromatogr A* 892:391–406
67. Croley TR, Hughes RJ, Koenig BG, Metcalfe CD, March RE (2000) *Rapid Commun Mass Spectrom* 14:1087
68. Petrovic M, Barceló D (2001) *J AOAC Int* 84:1074
69. López de Alda MJ, Díaz-Cruz S, Petrovic M, Barceló D (2003) *J Chromatogr A* 1000:503–526
70. D'Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A, Mancini R, Mastropasqua R, Nazzari M, Samperi R (2003) *Sci Total Environ* 302:199–209
71. Lacorte S, Viana P, Guillamón M, Tauler R, Vinhas T, Barceló D (2001) *J Environ Monit* 3:475–482
72. Directive 76/464/EC, *Dangerous Substances Discharged into the Environment*, off. J Eur Commun (1976) No. L 129, Commission of the European Communities, Brussels
73. Ahel M, Giger W (1993) *Chemosphere* 26:1471–1478
74. Petrovic M, Eljarrat E, López de Alda MJ, Barceló D (2001) *Trends Anal Chem* 20:637–648
75. Graumann K, Breithofer A, Jungbauer A (1999) *Sci Total Environ* 225:69–79
76. Silva E, Rajapakse N, Kortenkamp A (2002) *Environ Sci Technol* 36:1751–1756
77. Collins M, McLachlan JA, Arnold SF (1997) *Steroids* 62:365–372
78. Martin PM, Horwitz KB, Ryan DS, McGuire WL (1978) *Endocrinology* 103:1860–18067
79. Connor K (1997) *Toxicol Appl Pharmacol* 145:111–123
80. Moore M (1997) *Toxicol Appl Pharmacol* 142:160–168

2.3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

2.3.1. Desarrollo analítico de la metodología LC-MS

Respecto a la metodología de LC-MS desarrollada, en el artículo (Céspedes y col., 2004) se describe las condiciones del método y los parámetros de calidad obtenidos para cada compuesto. Comparando los límites de detección obtenidos (LODs entre 0.01 y 0.15 $\mu\text{g/L}$) en el método LC-MS con los de otros estudios llevados a cabo en aguas superficiales y residuales en el mismo periodo (2001 – 2004) (ver tablas 2.1, 2.2 y 2.3). Se observa que los valores son del mismo orden y en algunos casos incluso inferiores a otros estudios). En particular:

- Respecto a los APs y BPA, comparando los LODs obtenidos (0.09 $\mu\text{g/L}$ para OP y BPA y 0.15 $\mu\text{g/L}$ para NP) con los de la tabla 2.2, observamos que los valores del método desarrollado son del mismo orden que algunos estudios que determinan estos compuestos mediante LC-MS, como por ejemplo los LODs de 0,18 y 0,20 obtenidos por Li y col (Li y col., 2008) o Loos y col., que establece LODs con un rango de 1 a 100 ng/L para la determinación de los EDCs seleccionados (Loos y col., 2008).
- Por otra parte, para los ftalatos se obtuvieron LODs similares, pero menos sensibles, entre 0,18 y 0,20 $\mu\text{g/L}$, que pueden compararse con los valores obtenidos en la tabla 2.4. para análisis de PAEs.
- Por último, respecto a los estrógenos, EDCs presentes en el medioambiente y que causan actividad estrogénica a niveles tan bajos como 1-10 ng/L, se han obtenido LODs menos sensibles (entre 0.09 y 0.25 $\mu\text{g/L}$), por lo cual se llevaron a cabo análisis confirmatorios de los estrógenos mediante LC-MS/MS, técnica más sensible que permite determinar los estrógenos con mayor sensibilidad.

Evolución de la metodología desarrollada:

En la tabla 2.5. se resumen las condiciones utilizadas en la SPE en cada uno de los PVAs realizados, adaptando la metodología desarrollada en el artículo (Céspedes y col., 2004) en función de los compuestos y matrices a analizar

Tabla 2.5. Condiciones de SPE optimizadas para el análisis de los EDCs en esta tesis.

Cartuchos	1. Acondicionamiento	2. Pre-concentración	3. Lavado	4. Elución	PVA Ref.
SPE Oasis 60 mg	6 mL CH_2Cl_2 + 6 mL CH_3CN + 6 mL H_2O	V = 200 ml de agua fortificada a 1 ng/mL Flujo: 6 mL/min	1 mL agua 30 mL/min	2.5 mL $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{CN}$ (1:1) + 3.2 mL CH_2Cl_2	PVA Portugal (Céspedes, Máster, 2001)
LiChrolut RP-18 (500 mg, 6 mL)	7 mL ACN + 5 mL MeOH + 5 mL Agua HPLC	500 ml de agua superf. 100 ml agua EDAR_In 200 ml agua EDAR_out fortificada a 1 ng/mL Flujo: 6 mL/min	1 mL agua 30 mL/min	2 x 5 mL ACN	PVA Llobregat (Céspedes y col., 2004) (Céspedes y col., 2005)
LiChrolut RP-18 (500 mg, 6 mL)	7 mL MeOH + 3 mL Agua HPLC	500 ml de agua superf. 100 ml agua EDAR_In 200 ml agua EDAR_out fortificada a 1 ng/mL Flujo: 6 mL/min	1 mL agua 30 mL/min	2 x 5 mL $\text{MeOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (9:1)	PVA Ter (Céspedes y col., 2006) (Céspedes y col., 2008)

Tal y como puede verse en la tabla 2.5., las condiciones de las etapas de acondicionamiento y elución de la SPE fueron optimizándose y adaptándose para cada uno de los estudios PVA realizados, en función de los EDCs objeto de estudio, la matriz de la muestra, la metodología de análisis y otras características.

En el primer PVA llevado a cabo con muestras de Portugal, se analizaron plaguicidas y algunos EDCs (APs, APEOs y BPA) en aguas superficiales, mediante extracción SPE utilizando cartuchos Oasis HLB para su posterior análisis mediante GC-MS y LC-APCI-MS. Sin embargo, en los posteriores PVA llevados a cabo en las cuencas de los ríos Llobregat y Ter se amplió la lista de compuestos EDCs a determinar y no se incluyeron los plaguicidas, por lo cual las características físico-químicas de los EDCs a determinar variaron y en base a las recuperaciones obtenidas, se estableció el procedimiento analítico utilizando los cartuchos LiChrolut RP-18 para la SPE (Céspedes y col., 2004, Céspedes y col., 2005, Céspedes y col., 2006), para llevar a cabo los posteriores Programas de Vigilancia Ambiental en los ríos Ter y Llobregat, en los que adicionalmente se ha confirmado la presencia puntual de estrógenos mediante LC-MS/MS.

Respecto a la matriz de la muestra, en el PVA en Portugal, únicamente se analizó agua superficial de diversos ríos, mientras que en los PVA del Llobregat y el Ter se introdujo la matriz de agua residual, ya que se analizaron diversas EDARs de las cuencas de los ríos. Esta matriz más compleja requiere un mayor pre-tratamiento de la muestra, filtrando la muestra a través de filtros con mayor tamaño de poro (1.2 μm para aguas residuales de entrada y 0.7 μm para efluentes), y condiciones de la extracción en fase sólida para evitar interferencias y posterior efecto matriz en su análisis mediante LC-MS, especialmente para evitar la supresión iónica en el análisis de estrógenos mediante LC-MS/MS.

Para el PVA en el río Llobregat, se modificaron las condiciones de la SPE con el fin de simplificarla y mejorar los límites de detección de los compuestos objeto de estudio, a la vez que eviten las interferencias provenientes del agua residual. Con este fin, se utilizaron los mismos disolventes en las etapas de acondicionamiento y elución que en las fases móviles del método cromatográfico, es decir, se sustituyó el CH_2Cl_2 y el CH_3CN por el ACN y el MeOH.

En el PVA en la cuenca del Ter, se modificaron las condiciones de la SPE respecto a las utilizadas en el anterior PVA, simplificando el acondicionamiento utilizando únicamente MeOH y agua (eliminando el ACN en esta etapa). Se acondicionaron los cartuchos LiChrolut RP-18 con MeOH y agua y respecto a la elución de las distintas combinaciones de disolventes que se probaron, se eligió la combinación de MeOH: CH_2Cl_2 (9:1), tratando de minimizar el volumen de diclorometano pero que a su vez produzca un lavado más eficiente de los extractos. Se observa claramente como los cambios introducidos en las condiciones de SPE en el PVA en el Ter, produjeron un aumento en la recuperación de la mayoría de los compuestos analizados (APs, APEOs, ftalatos y HOBT), tal y como puede observarse en la tabla 2.6. Adicionalmente, en el PVA realizado en la cuenca del río Ter, en el que se estudió la distribución de los compuestos alquifenólicos entre la fase disuelta y la particulada, se lavaron y eluyeron los filtros de las muestras con metanol y se utilizó *surrogate* para garantizar la fiabilidad de los resultados. Los resultados obtenidos posteriormente demuestran la conveniencia de analizar el material particulado para obtener la concentración total de cada EDC, incluyendo no solo la fase disuelta sino la fracción particulada,

especialmente para los APs, compuestos más lipofílicos con mayor tendencia a quedar absorbidos en el material particulado.

En todos los casos se llevó a cabo la extracción *off-line* que permite analizar el extracto varias veces en diversas técnicas, ya que se ha llevado a cabo el análisis paralelo mediante el bioensayo RYA y/o el inmunoensayo ELISA, para poder validarlos y conseguir una metodología integrada que permita simultáneamente realizar un *screening* previo de la presencia y niveles de compuestos alquilfenólicos, que como hemos visto son los que contribuyen principalmente a la actividad estrogénica de las muestras analizadas y la determinación adicional de la estrogénicidad de las muestras mediante el bioensayo RYA.

En la tabla 2.6., se observa la evolución de los parámetros de calidad obtenidos en las validaciones de los métodos multiresiduo optimizados y adaptados para cada uno de los PVAs llevados a cabo:

Tabla 2.6. Recuperaciones, límites de detección (LOD) y límites de detección del método (IDL) obtenidos para las diversas condiciones de SPE y LC-MS optimizadas y aplicadas en cada estudio en esta tesis.

Matrices de la muestra	Cartuchos Método de extracción	Técnica Analítica	Modo Ioniz.	Compuestos analizados	Recuperaciones (%)	LOD ($\mu\text{g/L}$)	IDL (ng)	PVA Referencias
Agua superficial (10 ríos) Portugal	SPE Oasis 60 mg	GC-EI-MS	PI	Plaguicidas-triazinas	70-110 %	0.002-0.08	0.02-0.05	PVA Portugal (Céspedes, Máster, 2001)
			NI	OP			0.30	
			NI	NP			0.47	
			NI	BPA			0.09	
			NI	Estrógenos			0.15-0.90	
		LC-MS (APCI) (ESI)	NI	OP	71%	0.09	0.45	PVA Portugal (Céspedes, y col., 2004)
	NI		NP	78 %	0.15	1.46		
	PI		NPE ₁ O, NPE ₂ O	80-91%	0.06-0.22	0.625.40		
	NI		BPA	125%	0.09	0.24		
	PI		Ftalatos	51-66%	0.18-0.20	0.04-0.17		
	NI		Estrógenos: DES E1, E2, EE2, E3	61%	0.02	0.04		
	NI		Progéstógenos	85-94%	0.09-0.25	0.15-2.34		
	PI			83-94%	0.09-0.20	0.14-0.22		
Agua superficial y residual Cuenca del Llobregat	LiChrolut RP-18 (500 mg, 6 mL)	LC-MS (ESI)	NI	OP	71%	0.09	0.45	PVA Llobregat (Céspedes y col., 2004) (Céspedes y col., 2005)
			NI	NP	78 %	0.15	1.46	
			PI	NPE ₁ O, NPE ₂ O	80-102%	0.06-0.22	0.625.40	
			NI	BPA	125%	0.09	0.24	
			PI	Ftalatos	51-66%	0.18-0.20	0.04-0.17	
			NI	HOBT	65%	0.02	0.04	
			NI	Estrógenos	61-94%	0.09-0.25	0.15-2.34	
			NI	Progéstógenos	83-94%	0.09-0.20	0.14-0.22	
Agua superficial y residual Cuenca del Ter	LiChrolut RP-18 (500 mg, 6 mL)	LC-MS (ESI)	NI	OP	86%	0.06	0.45	PVA Ter (Céspedes y col., 2006) (Céspedes y col., 2008)
			NI	NP	91 %	0.07	1.46	
			PI	NPE ₁ O, NPE ₂ O	78-102%	0.06-0.12	0.25-0.39	
			NI	BPA	90%	0.05	0.82	
			PI	Ftalatos	83-91%	0.01-0.11	0.04-0.40	
			PI / NI	Benzotiazoles	62-81%	0.01-0.1	0.07-3.92	

En la tabla 2.6. se observa claramente como los cambios realizados en cada desarrollo del método, tanto en las condiciones de la extracción en fase sólida y posterior análisis, como las adaptaciones en la metodología LC-MS (composición de las fases móviles y gradientes de elución), adaptándose a los compuestos estudiados en cada PVA y la matriz de la muestra, han permitido mejorar progresivamente los parámetros de calidad del método optimizado inicialmente (Céspedes y col., 2004), y en particular:

Las recuperaciones obtenidas para todos los EDCs incluidos en el método multiresiduo, son satisfactorias, con valores en el rango 71 - 125%, excepto el estrógeno DES y los ftalatos, para los cuales se obtuvieron recuperaciones más bajas (61-66%), especialmente para el DEHP (55%) compuesto ubicuo en el medioambiente. En la cuantificación de los ftalatos se restaron los blancos obtenidos y se aplicó el factor de corrección de las recuperaciones obtenidas, para tener un valor final de concentración. Con las condiciones de extracción y metodología LC-MS modificadas en el PVA en el Ter las recuperaciones mejoraron obteniendo 78-102%, y en el caso de los ftalatos la mejora fue sustancial, obteniendo valores entre 83 y 91%. Respecto a los límites de detección, las condiciones aplicadas a la metodología de análisis (SPE y LC-MS) de los EDCs en el PVA en el río Ter permitieron mejorar los LODs, obteniendo valores más sensibles para las distintas familias de EDCs (ver tabla 2.6.). Así, los LODs de OP, NP y BPA (0.09, 0.15 y 0.09 µg/L) han disminuido a (0.06, 0.07 y 0.05 µg/L) respectivamente.

En conclusión, se han obtenido parámetros de calidad del método satisfactorios en la optimización del método multiresiduo (Céspedes, y col., 2004). La adaptación de la metodología analítica llevada a cabo en cada PVA, ha permitido obtener un método multiresiduo eficaz y versátil para determinar los compuestos alquilfenólicos, BPA y ftalatos objeto de estudio en cada PVA en esta tesis.

2.3.2. Desarrollo analítico de la metodología LC-MS /MS

Con el objetivo de confirmar la presencia y niveles de estrógenos en las muestras de agua de los Planes de Vigilancia Ambiental llevados a cabo, adicionalmente se puso a punto una metodología para su análisis mediante espectrometría de masas en tándem, partiendo de la metodología establecida previamente en el grupo de investigación (López de Alda y col., 2000). LC-MS/MS proporciona alta sensibilidad para los compuestos fácilmente ionizables como los estrógenos y una alta selectividad, esencial para detectar unívocamente los estrógenos a los bajos niveles a los que están presentes en el medio ambiente (ng/L) y pueden causar efectos estrogénicos.

Los compuestos objeto de estudio fueron los estrógenos determinados mediante LC-MS (los naturales E1, E2 y E3 y los sintéticos EE y DES) y adicionalmente se añadieron los estrógenos conjugados más comunes (estradiol-17-glucuronido (E2-3G), estrona-3-sulfato (E1-3S) y estradiol-17 acetato (E2-diacet) para obtener una evaluación y confirmación más completa de la presencia de estrógenos en las muestras analizadas (López de Alda y col., 2000, Rodríguez-Mozaz y col., 2004). En la tabla 2.7. se muestra la lista de estrógenos analizados mediante LC-ESI-MS/MS, con los tiempos de retención TR (min) de cada compuesto y las ventanas de TR del método, el modo de ionización, los correspondientes iones de cuantificación y diagnóstico y transiciones utilizadas para el análisis mediante LC-MS y LC-MS/MS en modo SIM y MRM respectivamente y las energías del cono (V) y colisión (eV). La adquisición de datos se

llevó a cabo en el modo SRM (*Selected Reaction Monitoring*), registrando dos transiciones entre el ión precursor y el fragmento, conforme a la normativa de la UE (Decisión de la UE 2002/657/CE).

Tabla 2.7. Lista de estrógenos analizados mediante LC-ESI-MS/MS, con los tiempos de retención (TR) y los correspondientes iones de cuantificación y diagnóstico para el análisis mediante LC-MS y LC-MS/MS.

Ventana TR (min)	TR (min)	Compuesto	Modo de Ionización	LC-MS	LC-MS/MS	Cono (V)	Colisión (eV)
				SIM Ion m/z	Transiciones MRM (m/z) Ión Precursor → Ión Producto		
0-12.4	1.9	E2-3G	NI	447 [M+H] ⁺	447 → 113	40	30
	8.65				447 → 271	40	50
	9.20	E1-3S	NI	349 [M+H] ⁺	349 → 269	40	40
					349 → 145	40	40
	9.90	E3	NI	287 [M-H] ⁻	287 → 171	50	40
					287 → 145	50	40
12.4-19	13.37	E2	NI	271 [M-H] ⁻	271 → 145	50	45
					271 → 183	50	45
	14.31	EE	NI	295 [M-H] ⁻	295 → 145	50	40
					295 → 159	50	40
	14.91	E1	NI	269 [M-H] ⁻	269 → 145	50	40
					269 → 143	50	45
	15.70	DES	NI	267 [M-H] ⁻	267 → 222	30	35
	18.60				267 → 237	30	50
19-38	21.25	E2-diacet	NI	313 [M-H] ⁻	313 → 253	30	30
					313 → 145	30	45

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.

Hay que poner en contexto que en el momento en que se desarrollaron estos métodos (2001-2004), la LC-MS/MS era una técnica más innovadora y no de análisis de rutina y por tanto se aplicó para confirmar puntualmente las muestras en las que se detectaron estrógenos mediante LC-MS pero no pudieron ser cuantificados con suficiente sensibilidad, o en aquellas muestras en las que los altos valores de estrogenicidad determinados mediante el ensayo recombinante RYA no fueron correlacionadas con los resultados obtenidos mediante LC-MS, mayoritariamente para compuestos alquilfenólicos y ftalatos.

En la Figura 2.2. se muestra un cromatograma extraído en esta tesis para el patrón interno de 500 ng/mL, con las condiciones experimentales obtenidas, en una muestra de efluente de EDAR, en el que se observa la buena separación de los compuestos analizados. En el caso del E2 se observa un segundo pico que corresponde al patrón interno utilizado, equilin-d_n.

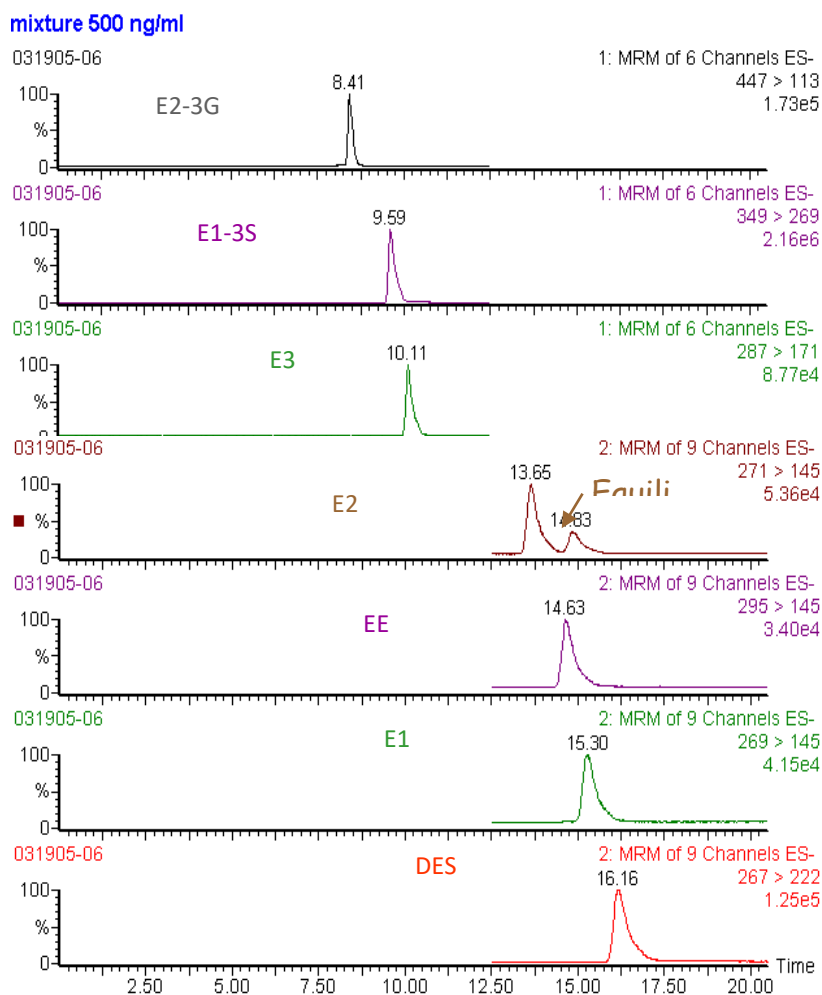


Figura 2.2. Cromatogramas extraídos correspondientes a un patrón de 500 ng/mL, con los picos cromatográficos de los estrógenos incluidos en una muestra de efluente de EDAR dopada a 500 ng/mL.

Para validar el método analítico mediante LC-MS/MS, se determinaron los parámetros anteriormente descritos con LC-MS. A continuación, se muestran los resultados del estudio de las recuperaciones

Recuperaciones: con el objetivo de seleccionar el cartucho de SPE que proporciona mejores recuperaciones de los estrógenos objeto de estudio, se testaron distintos tipos de cartuchos para determinar el porcentaje de la concentración real de analito recuperada durante el proceso analítico. Adicionalmente, para testar el posible efecto matriz de las muestras, es decir, el aumento o supresión de la señal, se calcularon las recuperaciones obtenidas para los compuestos estrogénicos a determinar mediante LC-MS/MS, con muestras fortificadas en agua destilada y en las distintas matrices que posteriormente se realizaron los análisis (agua superficial y residual) realizando la extracción en fase sólida utilizando 3 tipos de cartuchos diferentes:

- LiChrolut C₁₈ (500 mg, 3 mL) – Merck,
- Isolute ENV+ (200 mg, 6 mL) – IST y
- Oasis HLB (60 mg, 3 mL) – Waters.

Se realizaron 6 replicados (n=6) de cada tipo y se doparon los extractos con patrón interno a 100 ng/mL.

En la figura 2.4. se muestran los resultados obtenidos:

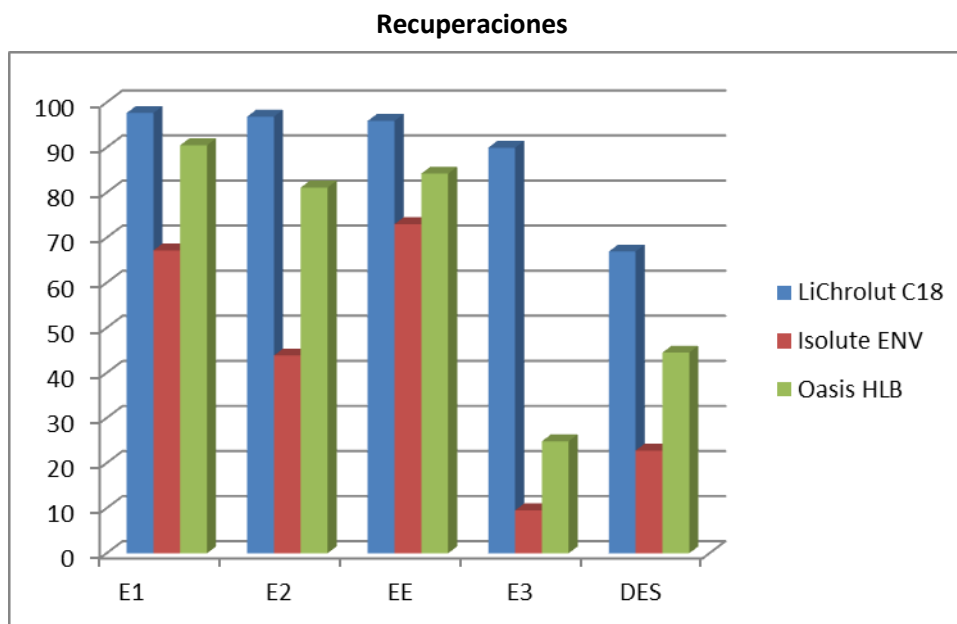


Figura 2.4. Porcentaje de Recuperaciones obtenidas para los estrógenos detectados en el medioambiente (E1, E2, EE y DES, con 3 tipos de cartuchos SPE diferentes.

Se observa claramente como las recuperaciones obtenidas con los cartuchos Isolute ENV son las peores y por tanto fueron descartados. Los mejores valores fueron obtenidos con los cartuchos LiChrolut C₁₈, sorbentes hidrofóbicos adecuados para la retención de compuestos de polaridad media, obteniendo 98%, 97%, 96%, 90% y 66.94% para E1, E2, EE, E3 y DES respectivamente, siendo de hecho los únicos que dieron buenas recuperaciones para el estriol. Con Oasis HLB, se obtuvieron recuperaciones buenas para E1, E2 y EE (81 –91%), pero sin embargo para el DES fueron inferiores al 70%. Por tanto, la extracción en fase sólida fue llevada a cabo inicialmente con cartuchos Oasis HLB en el monitoring de Portugal para el análisis de las muestras mediante GC-MS y LC-APCI-MS, debido a la versatilidad de este sorbente polimérico por su balance hidrofílico-lipofílico. Sin embargo, en base a las recuperaciones obtenidas, se estableció el procedimiento analítico realizando la SPE con cartuchos LiChrolut RP-18 (Céspedes y col., 2004, Céspedes y col., 2005, Céspedes y col., 2006), para llevar a cabo los posteriores Programas de Vigilancia Ambiental en los ríos Ter y Llobregat, en los que se ha confirmado la presencia puntual de estrógenos mediante LC-MS/MS.

Por tanto, los LODs considerablemente más sensibles obtenidos mediante LC-MS/MS, así como la alta selectividad de esta técnica, permiten la identificación inequívoca de los estrógenos a los niveles inferiores a los que presentan actividad estrogénica. Esto es especialmente importante en el caso de los compuestos más activos, E2 y EE, cuya presencia en el medioambiente puede pasar desapercibida debido a la insuficiente sensibilidad de la metodología analítica aplicada (Rodríguez-Mozaz y col., 2004).

De las muestras analizadas mediante LC-MS/MS en los PVAs, se confirmó la presencia de estrona en dos muestras de agua superficial y una de agua residual con niveles entre 5.8 y 10.2 ng/L, y de uno de sus compuestos conjugados, estrona-sulfato y de estriol en agua superficial. Los límites de detección obtenidos en LC-MS/MS para los compuestos detectados fueron 1.1 ng/L (E1), 0.1 ng/L (E1-3S) y 0.6 ng/L

(E3). Los estrógenos detectados y los niveles de concentración coinciden con los de otros estudios en la zona, como por ejemplo los valores detectados en el río Llobregat para E3 (11.6 ng/ L) (Rodríguez-Mozaz y col. 2004 y Kuster y col., 2008), E1 (7.8 ng/L) y E3 (5.7 ng/L) (Gorga y col., 2015).

2.3.3. Ensayo de LEVADURAS RECOMBINANTES (RYA). Curvas de ESTROGENICIDAD

Se determinaron los valores de estrogenicidad individuales de cada uno de los compuestos evaluados mediante RYA, obteniendo una curva dosis-respuesta para cada uno de los compuestos. A continuación, se reproduce la Figura 3 del artículo que describe la metodología integrada de análisis químico mediante LC-MS y de determinación de la estrogenicidad mediante RYA, para poder interpretarlo con mayor claridad y ver la correspondencia del color de cada curva a los distintos compuestos EDCs testados:

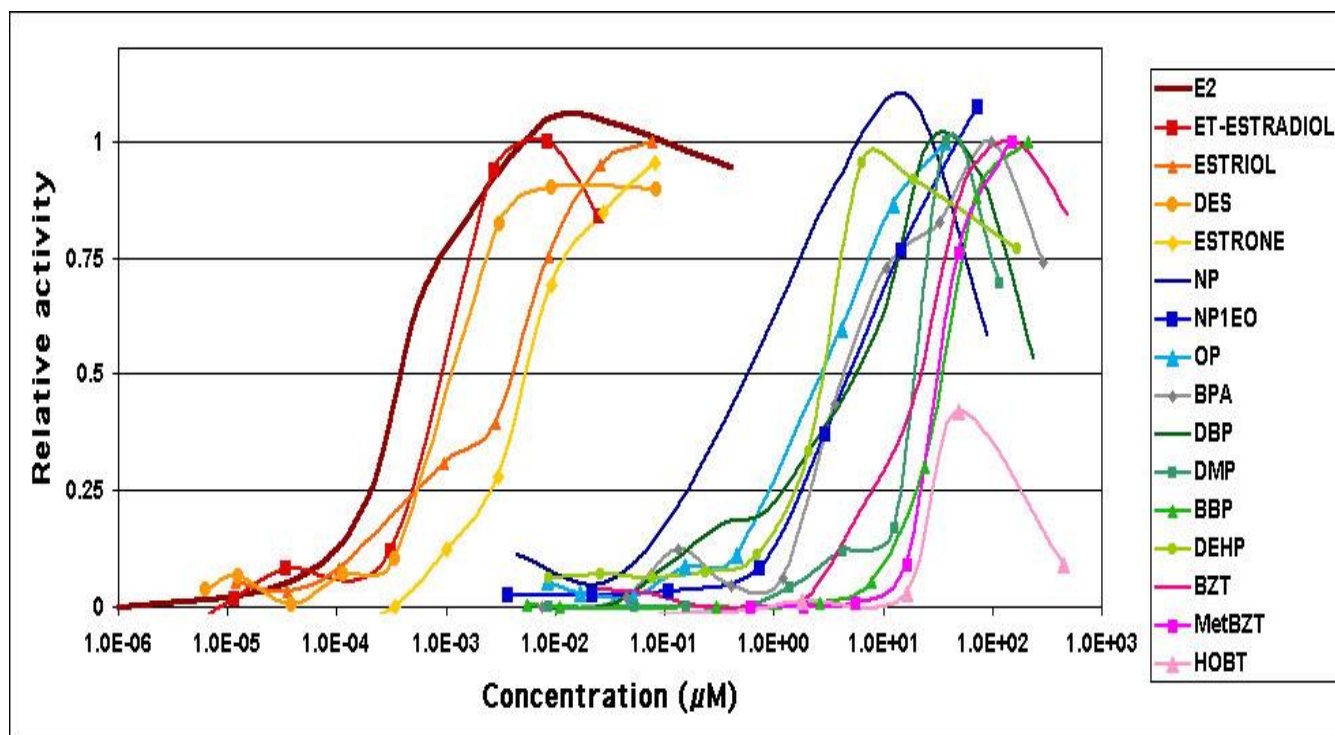


Fig. 2.5. Curvas de dosis-respuesta para un rango de compuestos estudiados establecidos y sospechados estrogénicos. Los valores están representados como gráficos de actividad β -galactosidasa en unidades arbitrarias versus la concentración de los compuestos ($\mu\text{mol/L}$). Reproducido de (Céspedes y col., 2004).

En la Figura 2.5, se observa claramente que la estrogenicidad de las diversas familias de EDCs testados decrece en el siguiente orden:

Estrógenos >> APs & APEOs > Plastificantes (BPA > ftalatos) > benzotiazoles

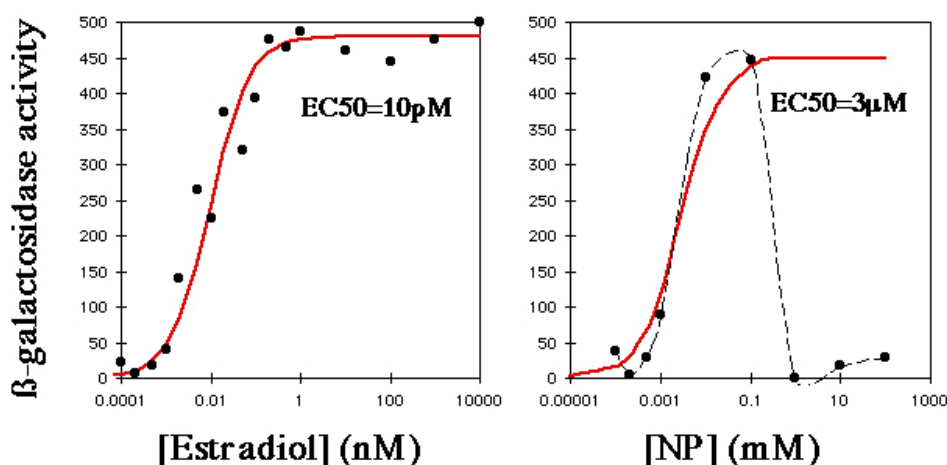
Por tanto, el RYA es un bioensayo *in-vitro* muy sensible a los estrógenos y con menor sensibilidad al resto de familias de compuestos. En particular:

- i) los estrógenos, con mayor estrogenicidad en el orden:
E2 > E3 > EE > E1 y con valores de EC₅₀ entre 0.1 y 10 μmol/L
 - ii) los APs y APEOs, con estrogenicidad decreciente en el orden:
NP > OP > NP₁EO y valores de EC₅₀ entre 0.3 y 15 μmol/L
 - iii) los plastificantes, BPA y ftalatos, con estrogenicidad decreciente en el orden:
BPA > DEHP > DBP > DMP > BBP > DEP y valores de EC₅₀ entre 5 y 30 μmol/L
- Siendo BPA el compuesto más estrogénico de los plastificantes, seguido de DEHP, el ftalato más ubicuo y el que registra una mayor estrogenicidad de los PAEs.
- iv) Por último, la familia de los benzotiazoles, con menor actividad estrogénica:
BzT > HOBT > DEP > MeTBTZ y por tanto valores superiores de EC₅₀ entre 40 y 60 μmol/L

En conclusion, respecto a los compuestos alquilfenólicos se observa como a medida que la longitud de la cadena etoxilada aumenta, la estrogenicidad disminuye, siendo el NP el compuesto más estrogénico. Tal y como puede observarse en la curva dosis-respuesta de la Figura 2.5., la actividad estrogénica del BPA está entre los APs y los APEOs de cadena corta estudiados:

Actividad estrogénica: NP > OP > BPA > NPE₁O > NPE₂O

A continuación, se muestran las curvas dosis-respuesta obtenidas para el estradiol y el nonilfenol detectados en estudios experimentales:



EC₅₀= concentración efectiva 50

Figura. 2.6. Curvas de dosis-respuesta para el estradiol y el nonilfenol, con los correspondientes valores de EC₅₀ (μmol/L) (Céspedes y col., 2004).

Para cada uno de los comuestos se observa que son curvas no-monotónicas (NMDR) En la curva dosis-respuesta del nonilfenol, se observa como se produce un efecto inhibitorio, que hace que la curva descienda y no continúe con la actividad estrogénica constante a cierta concentración.

El paradigma tradicional en toxicología es que dosis menores inducen menores reacciones. En contraste, las curvas dosis-respuesta no monotónicas (NMDR), son definidas como la relación no lineal entre dosis y efecto, donde la pendiente de la curva de respuesta cambia la dirección en algún punto del rango de dosis testadas. En estudios de EDCs, las respuestas son monotónicas y los efectos a bajas dosis

son muy comunes. Mientras que "baja dosis" es un término relativo, NMDR son definidas matemáticamente y pueden invertir la forma de U, siendo curvas no monotónicas (Vandenberg y col., 2012; Vandenberg y col., 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.

Potencia estrogénica

La evaluación de la potencia de una sustancia estrogénica se realiza normalmente por comparación con la estrogenicidad del E2. Puede estimarse mediante diferentes estudios *in vitro*, y en función del ensayo que se utilice, los resultados pueden ser bastante diferentes (Gomes y col., 2003). Por ejemplo, la potencia estrogénica del E2 es, según el ensayo ER-calux 20 veces superior a la que resulta de aplicar el ensayo con levaduras recombinantes (Legler y col., 2002). La tabla 2.8 muestra la potencia estrogénica relativa al E2 (al que se le asigna un valor de 1) obtenida para los compuestos disruptores endocrinos estudiados (Céspedes y col., 2004). Se incluyen otros datos recogidos en la bibliografía de varios autores (Korner y col., 1999; Komer y col., 2000; Gutendorf y col., 2001; Legler y col., 2002; Murk y col., 2002, Folmar y col., 2002; Segner y col., 2003; Gomes y col., 2003; Petrovic y col., 2004; García-Reyero y col., 2004; Rutishauseret y col., 2004). Todos los valores están expresados como EC₅₀ relativas al EC₅₀ del 17-β-estradiol, valor que se conoce con el nombre de factor de equivalencia al estradiol (EEF, *Estradiol Equivalency Factor*). Según estos ensayos los compuestos más potentes son el estradiol (E2), el dietilestilbestrol (DES) y el etinilestradiol (EE) seguidos de los metabolitos del E2: la estrona (E1) y el estriol (E3). Sin embargo, tal y como puede observarse, hay una gran discrepancia entre los diferentes valores estimados, debido a que los distintos ensayos utilizan receptores de estrógenos y elementos reportero distintos. Es decir, 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 la tabla 2.8. se resumen y comparan valores de potencia estrogénica relativa individual de los EDCs estudiados, determinados en diversos estudios a partir de distintos bioensayos, y comparados con los valores obtenidos con el ensayo de levaduras recombinantes (RYA) (Céspedes y col., 2004).

Tabla 2.8. Potencia estrogénica relativa individual de algunos EDCs expresada como factor equivalente al estradiol (EEF, *the molar based 17 β-estradiol equivalency factor*) y determinada a partir de diferentes bioensayos. Adaptado de (Céspedes y col., 2004 y Petrovic y col., 2004).

Compuestos		RYA (Céspedes y col., 2004)	YES	Ensayo MCF7 (E-screen)	ER-CALUX (Murck y col., 2002)
Hormonas sexuales esteroideas					
17 β-estradiol	E2	1	1	1	1
Estriol	E3	3.448×10^{-1}	3.7×10^{-1}		
Etinilestradiol	EE	1.709×10^{-1}	$1.9 \times 10^{-1} - 1.2$	1.25 – 1.9	1.2
Dietilstilbestrol	DES	4.597×10^{-2}	$4.5 \times 10^{-2} - 1.1$	2.5	
Estrona	E1	1.886×10^{-2}	$1.9 \times 10^{-2} - 1.0 \times 10^{-1}$	1.0×10^{-2}	5.6×10^{-2}
Compuestos alquilfenólicos					
Nonilfenol	NP	5.05×10^{-4}	$7.2 \times 10^{-7} - 4.1 \times 10^{-4}$	$1.3 \times 10^{-5} - 1.0 \times 10^{-4}$	2.3×10^{-5}
Octilfenol	OP	2.13×10^{-4}	$1.0 \times 10^{-5} - 4.9 \times 10^{-4}$	$1.0 \times 10^{-4} - 2.5 \times 10^{-4}$	1.4×10^{-6}
Nonilfenol monoetoxilado	NP ₁ EO	1.366×10^{-5}	$4.0 \times 10^{-6} - 1.3 \times 10^{-5}$		3.8×10^{-6}
Compuestos bisfenólicos					
Bisfenol A	BPA	2.43×10^{-5}	$1.0 \times 10^{-5} - 8.1 \times 10^{-5}$	$2.5 \times 10^{-5} - 6.0 \times 10^{-5}$	7.8×10^{-6}
Ftalatos					
Di(etilhexilftalato)	DEHP	1.735×10^{-5}	2.5×10^{-5}		
Dibutilftalato	DBP	1.01×10^{-5}	$1.0 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-5}$		1.8×10^{-8}
Benzilbutilftalato	BBP	7.752×10^{-6}	$1.0 \times 10^{-6} - 8.9 \times 10^{-6}$	8.9×10^{-4}	1.4×10^{-6}
Dimetilftalato	DMP	9.804×10^{-6}	$1.0 \times 10^{-6} - 7.0 \times 10^{-6}$		1.1×10^{-5}
Dietilftalato	DEP	5.747×10^{-6}	$5.0 \times 10^{-7} - 4.7 \times 10^{-6}$		3.2×10^{-8}

YES (Yeast Estrogen Screen); (Murck y col., 2002; Folmar y col., 2002; Segner y col., 2003)

MCF-7: Línea celular de cancer de mama humano; (Korner y col., 2000; Gutendorf y col., 2001; Murck y col., 2002; Bitsch y col., 2002)

MVLN (línea celular derivada de la MCF-7 cuya proliferación es estimulada por estrógenos e inhibida por antiestrógenos)

ER-CALUX: *Estrogen receptor mediated chemical activated luciferase gene expression assay*

ER-α: Receptor estrogénico humano (Murck y col., 2002)

2.3.4. Integración de LC-MS y Ensayo de Levaduras Recombinantes (RYA) -----

Para la correcta determinación de compuestos disruptores endocrinos en el medioambiente acuático, es necesario un enfoque multidisciplinar que permita de forma integrada la identificación y confirmación unívoca de los EDCs por una parte y la determinación de la actividad endocrina mediante técnicas biológicas por otra. Adicionalmente, el desarrollo de métodos multiresiduo llevados a cabo en esta tesis, permite obtener metodologías más eficientes a menor coste y tiempo, para la determinación de compuestos EDCs de diferentes familias con diferentes propiedades físico-químicas, que requiere alcanzar un compromiso, de forma que la determinación de cada compuesto individualmente sea lo suficientemente sensible y la detección sea específica para varias sustancias.

La metodología integrada desarrollada en esta tesis, propuesta para una correcta determinación de EDCs en el medioambiente, comporta la extracción de los analitos mediante SPE seguida del análisis químico mediante LC-MS, técnica suficientemente sensible para la determinación de APs, APEOs, BPA y ftalatos, presentes y con efectos en el medioambiente acuático a niveles de $\mu\text{g/L}$, y utilizando adicionalmente LC-MS/MS, técnica mucho más sensible pero que comporta un coste más elevado (muy superior en el momento que se desarrolló la metodología en esta tesis), para la identificación y confirmación unívoca de los estrógenos, presentes en el medioambiente y con actividad estrogénica a niveles inferiores (ng/L). Por otra parte, la determinación mediante el ensayo de levaduras recombinantes (RYA) permite determinar la actividad estrogénica de las muestras, complementando la información obtenida mediante las técnicas cromatográficas, sensibles y selectivas.

En la Figura 2.7. se muestra un esquema del procedimiento analítico integrado llevado a cabo en el PVA de los ríos Llobregat y Ter, análisis químico mediante LC-MS para la determinación de las concentraciones individuales de cada EDC y la aplicación del bioensayo RYA para determinar la actividad estrogénica total de la muestra. En este esquema se ve claramente la combinación o integración de la metodología analítica con el ensayo RYA, para poder comparar los resultados obtenidos, las concentraciones individuales de los EDCs estudiados y la estrogénicidad total de la muestra, obteniendo una integración de resultados y una información más amplia, necesaria para determinar EDCs teniendo en cuenta los efectos que pueden producir sobre la fauna y el medioambiente.

Brevemente, tal y como ha sido descrito en las publicaciones, el agua se extrae mediante SPE con las condiciones optimizadas. Los filtros pueden lavarse con metanol para ser analizados y determinar la fracción particulada. Los extractos obtenidos se han analizado paralelamente mediante LC-MS para la determinación de la concentración de cada EDC estudiado (fracción disuelta y fracción particulada en el PVA Del Ter) y de la actividad estrogénica total de la muestra mediante el ensayo de levaduras recombinantes (RYA).

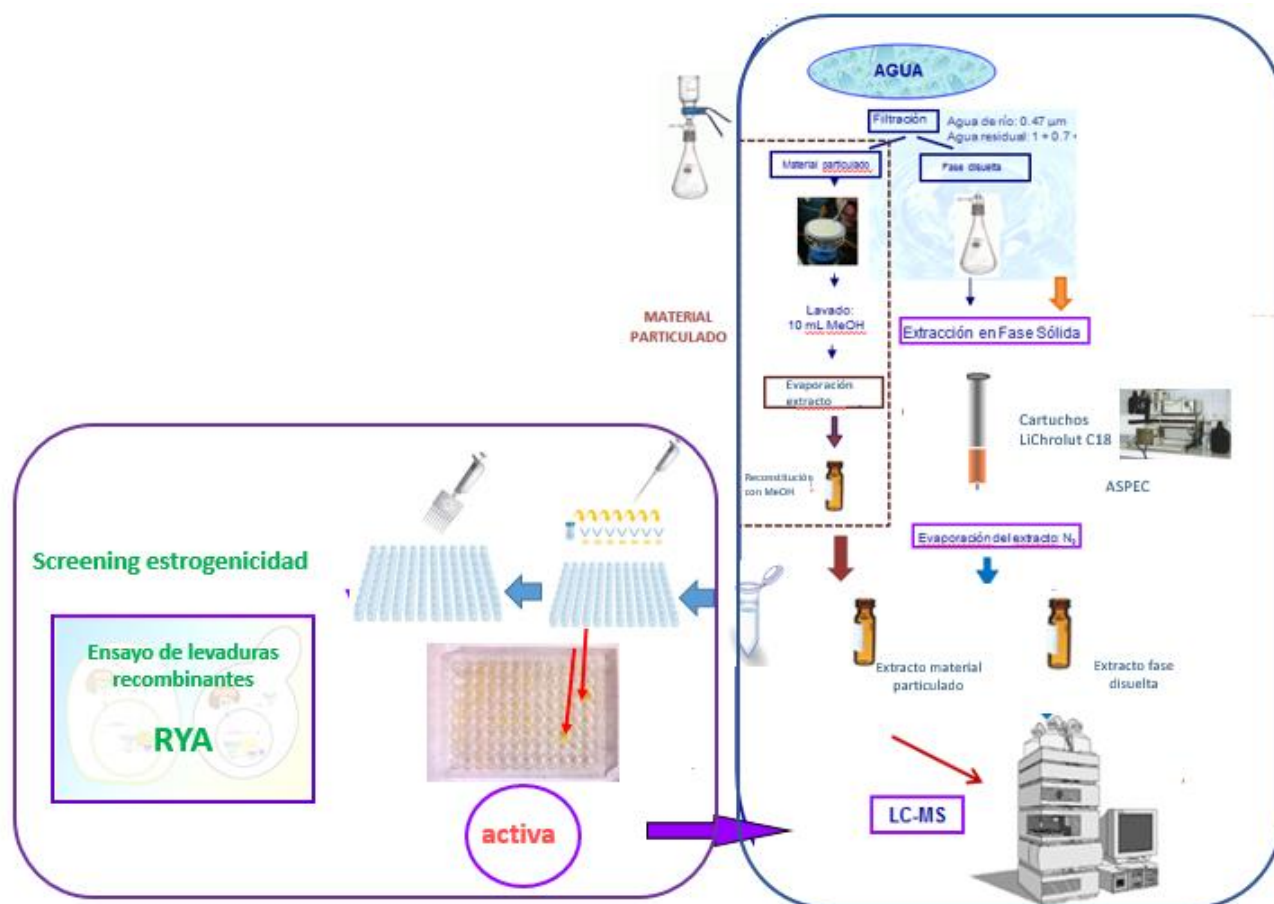


Figura 2.7. Metodología integrada de preparación de la muestra y determinación de EDCs mediante LC-MS y determinación de la actividad estrogénica total mediante el bioensayo de levaduras recombinantes RYA.

En los Programas de Vigilancia Ambiental es necesario analizar un gran número de muestras, y por tanto es deseable emplear menos tiempo de análisis y con un coste más bajo. Cuando el objetivo de los PVAs es determinar compuestos disruptores endocrinos, y por tanto es importante determinar también la estrogénicidad de la muestra por los efectos que pueden tener en la fauna y el medioambiente acuático, se propone analizar las muestras previamente mediante el ensayo RYA, para determinar la actividad estrogénica de la muestra. De esta forma, las muestras en las que se detecte estrogénicidad serán posteriormente analizadas mediante LC-MS(MS) para determinar las concentraciones individuales de los EDCs, descartando las muestras negativas (sin estrogénicidad) con el ahorro en coste y tiempo de análisis que comporta.

En los capítulos 4 y 5 se aplica LC-MS(MS) y RYA en los PVAs realizados en Portugal y las cuencas de los ríos Llobregat y Ter, para correlacionar los datos obtenidos mediante ambas metodologías de análisis químico y bioensayo

2.4. CONCLUSIONES -----

- ✓ Se ha optimizado una metodología analítica mediante extracción en fase sólida (SPE) y análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) con interfase de electrospray, obteniendo parámetros de calidad del método satisfactorios (LODs entre 0.01 y 0.12 µg/L y recuperaciones en el rango 78 - 102%) y se ha estudiado el efecto matriz en aguas superficiales y residuales. El método multiresiduo desarrollado en esta tesis, ha permitido obtener metodologías más eficientes para la determinación de 27 EDCs de diferentes familias químicas (compuestos alquilfenólicos, estrógenos, progestógenos, bisfenol A, ftalatos, benzotiazoles y alcoholes etoxilados) con diferentes propiedades físico-químicas.
- ✓ Adicionalmente, se ha desarrollado y validado un método basado en la extracción SPE y análisis mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), con LODs en el rango 0.1 - 1 ng/L y recuperaciones entre 67 y 98% y se ha estudiado el efecto matriz en aguas superficiales y residuales. Este método ha permitido la detección, confirmación unívoca y cuantificación de los estrógenos ambientales más relevantes presentes en el medio acuático, que pueden ejercer efectos estrogénicos en organismos a niveles de ng/L.
- ✓ El bioensayo con levaduras recombinantes (RYA) aplicado a los extractos, determina la estrogénicidad total de la muestra, detectando tanto los estrógenos naturales como los xenoestrógenos, haciendo por tanto medidas cuantitativas de la actividad estrogénica sin tener en cuenta la identidad de los compuestos químicos responsables de este efecto.
- ✓ Se han establecido los valores de estrogénicidad individuales (E2 equiv.) y la EC₅₀ de cada uno de los compuestos estudiados mediante el ensayo RYA y se ha obtenido que es un bioensayo *in-vitro* muy sensible a los estrógenos que decrece para el resto de familias de EDCs en el siguiente orden: Estrógenos >> APs & APEOs > BPA > ftalatos > benzotiazoles.



CAPÍTULO 3

TÉCNICAS BIOLÓGICAS DE SCREENING:

ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO ELISA

3.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las técnicas inmunoquímicas o inmunoensayos se basan en el mecanismo de reconocimiento inmunológico con el antígeno y el anticuerpo, para medir la presencia de un analito específico en una muestra. El inmunoensayo ELISA, ampliamente descrito en el apdo. 1.3.4.4., constituye el ensayo inmunoenzimático heterogéneo más utilizado debido a su elevada sensibilidad, sencillez y rapidez.

Los Programas de Vigilancia Ambiental requieren analizar un gran número de muestras. La aplicación de técnicas de cribado o *screening* previas a la cuantificación mediante técnicas biológicas, permiten reducir el tiempo y coste de análisis. Previa implementación de técnicas biológicas en general o inmunoenzimáticas en particular, éstas deben validarse mediante técnicas químicas para asegurar la calidad de los resultados.

El principal objetivo en este capítulo ha sido validar ensayos ELISA como técnica de *screening* para llevar a cabo la determinación de NP en *monitorings* o Programas de Vigilancia Ambiental, que requieren el análisis de un gran número de muestras. Para ello se llevaron a cabo 2 estudios>

- (1) Validación de un ensayo inmunoenzimático ELISA DIRECTO para la determinación de NP y OP en muestras de aguas superficiales mediante comparación con LC-MS.
- (2) Validación de un ensayo inmunoenzimático ELISA INDIRECTO para la determinación conjunta de NP, OP, alquilfenoles etoxilados y otros compuestos alquilfenólicos en muestras de aguas superficiales y residuales, mediante comparación con LC-MS (MS).

Adicionalmente, se estudió el efecto matriz y se llevaron a cabo estudios de reactividad cruzada del ensayo ELISA indirecto.

3.1.1. Determinación de compuestos alquilfenólicos mediante el Inmunoensayo ELISA

En la bibliografía se encuentran pocas referencias relativas a anticuerpos específicos contra APEOs (Goda y col., 2000; Fujimoto y col., 2000; Mart'ianov y col., 2004). Goda y colaboradores (2000) realizaron producción de anticuerpos monoclonales mediante el desarrollo de un ensayo ELISA directo reconociendo NP con un LOD de 10 $\mu\text{g/L}$ pero APs (NP y OP) y APEOs son reconocidos al mismo tiempo. El hapteno de inmunización retiene la cadena alquil (la cadena nonil) intacta y fue derivatizado manteniendo cinco grupos etoxilados (EO) en la molécula. La preparación del anticuerpo conllevó varias etapas incluyendo dos de bloqueo durante la noche y el ensayo competitivo fue realizado en 90 min. La sensibilidad obtenida para NP no es extremadamente buena, con un LOD de 10 $\mu\text{g/L}$ (ver Tabla 3.1.). Las cadenas largas (EO=10), medias (EO=5-7), y cortas (EO=1,2) de APEs y APs (ambos NP y OP) son también bien reconocidas. Esta falta de especificidad tiene la desventaja de que sobre-estima valores que se obtienen cuando se determinan los niveles estrogénicos de NP; sin embargo, puede ser útil como método de cribado o *screening*. Este ensayo y los anticuerpos monoclonales han sido comercializados por Industrias Takeda (Japón) (Takeda 2003). Las especificaciones del kit ELISA indican que APECs (NP₂EC, NP₃EC) son altamente reconocidos (cerca de 400% considerando NP como 100%). Estos resultados son consistentes, dado que el hapteno de inmunización es en esencia un NPEC. Esta compañía ha desarrollado también otro anticuerpo monoclonal específico solo para APEs con más de dos unidades etoxiladas; AP, AP₁EO, y AP₂EO no son reconocidas (Takeda 2003). El rango de trabajo es similar al obtenido en el caso mencionado (ver Tabla 3.1.). En ambos casos otros surfactantes relevantes como alquilbencenos sulfonados lineales (LAS), los cuales pueden interferir en muestras medioambientales de aguas residuales o efluentes, no son reconocidos. Así, la combinación de ambos ensayos permite la determinación de la concentración total de estos últimos tres metabolitos de APEs. El kit comercial conocido para la inmunodetección de APs (*Kit of Takeda Chemical Industries*), tiene peor sensibilidad: IC₂₀= 70 ng/mL (Goda y col., 2000). Se han desarrollado varias metodologías usando estos anticuerpos monoclonales disponibles (Fránek y col., 2001, Rose y col., 2002, Matsunaga y col., 2003), todos ellos con el propósito de desarrollar sistemas automatizados. Los principales resultados se muestran en la Tabla 3.1. Fránek y col., ha desarrollado un FIA genérico para NP y NPE₁O (Fránek y col., 2001).

Se observa un alto grado de reconocimiento de NPEO en la mayoría de los ensayos ELISA previamente citados (Yakovleva y col., 2003; Badea y col., 2003), incluso si el hapteno de inmunización mantiene el grupo hidroxilo libre. En la ELISA desarrollada por Mart'ianov y col., (2005), con anticuerpos policlonales, todos los NPEO fueron altamente reconocidos (NP₁EO, NP₂EO, NP₍₉₋₁₀₎EO y NP₁EC con valores de reactividad de 188%, 279% y 79% y 48% respectivamente) (Mart'ianov y col., 2005). El ensayo ELISA desarrollado por Zeravik y col (2004) utilizando la cadena lineal alquílica de NPnO reconoce NPEO con n=1-3 unidades y no proporciona datos respecto al reconocimiento de NPEO de cadenas medias y largas EO (Zeravik y col., 2004). Posteriormente, Pasquet y col., (2011) investigaron la aplicación del inmunoensayo ELISA a suelos y aguas para la determinación de los APs NP y OP y validaron el método mediante la comparación de los resultados obtenidos mediante ELISA y LC-MS/MS (Pasquet y col., 2011). En la tabla 3.1. se resumen algunas técnicas inmunoquímicas desarrolladas para la determinación de compuestos alquilfenólicos, en el periodo que fueron desarrollados los ensayos ELISA directo e indirecto respectivamente utilizados en esta tesis (Zeravik y col., 2004 y Mart'ianov y col., 2005)

Tabla 3.1. Técnicas inmunoquímicas desarrolladas para la detección de APEs y AP. Adaptado de Estévez y col., 2004.

Compuesto	Técnica Inmunoquímica	LODa/IC ₅₀ b (µg/L)	Intervalo de trabajo (µg/L)	Comentarios	Ref
NP	ELISA Directo	10 ^a	70–1.000	Ab Monoclonal: APEs y APs Son bien reconocidos	(Goda y col., 2000)
NP	Comercial Direct Kit ELISA	nrc	5–500	Ab Monoclonal OP, NPEs, OPEs Y NPEC son fuertemente reconocidos	(Takeda 2003)
APEs	Commercial Direct Kit ELISA	nr	50–2.000	Ab monoclonal. APEs con EO entre 2–10 son reconocidos	(Takeda 2003)
NP ₁₀ EO	FIIA	2.4a	5–250	Ab monoclonal comercial Ab monoclonal	(Fránek y col., 2001)
NP ₁₀ EO	ELISA Directo	8.9a	10–500	Ab monoclonal comercial	
NP	FIIA	52a	100–5.000	Ab monoclonal comercial	
NP	ELISA Directo	76a	250–10.000	Ab monoclonal comercial	
NP	LISA Directo	769b	nr	Placas ELISA comercial Con Ab immobilizado (<i>b</i> -Gal tracer)	(Rose y col., 2002)
NP	Biosensor CIA-GDH	4.481b	nr	Ab monoclonal comercial	
OP	ELISA Directo	346b	nr	Placas ELISA comercial con Ab immobilizado (<i>b</i> -Gal tracer)	
OP	Biosensor CIA-GDH	1.560b	nr	Ab monoclonal comercial	
NPE	ELISA Directo	104b	nr	Placas ELISA comercial con Ab immobilizado (<i>b</i> -Gal tracer)	
NPE	Biosensor CIA-GDH	378b	nr	Ab monoclonal comercial	
OPE	ELISA Directo	42b	nr	Commercial ELISA plates con Ab immobilizado, (<i>b</i> -Gal tracer)	
OPE	Biosensor CIA-GDH	605b	nr	Ab monoclonal comercial	
NPE	BMP-IA automatizado	6.6 ^a	6.6–66.000	Ab monoclonal comercial	(Matsunaga y col., 2003)
NP	ELISA Indirecto	590b	nr	Ab Policlonal	(Fránek y col., 2001)
NP	PfIA	42.000b, 7.900 ^a	nr	Ab Policlonal	(Fránek y col., 2001)

^aLOD límite de detección.

Ab Antibody ;

FIIA: flow-injection immunoassay

BMP-IA: bacterial magnetic particles based immunoassay ;

^bIC₅₀; ^cnr no reportado

ELISA: enzyme linked immunosorbent assay

PfIA: polarization fluoroimmunoassay

CIA-GDH biosensor capillary immunoassay coupled to a glucose dehydrogenase biosensor

En la tabla 3.1. se muestran estudios de ELISA y otras técnicas inmunoquímicas desarrolladas, como por ejemplo el inmunoensayo por inyección de flujo (FIIA), el inmunoensayo de polarización fluorescente (PFIA), etc. En el estudio de FIIA llevado a cabo por Fránek y col., 2001), la etapa de incubación entre el anticuerpo (Ac), el analito, y el antígeno marcado (Ag*) se lleva a cabo *off-line* por un corto tiempo y a continuación se inyecta en el sistema de flujo. El Ac se retiene en una proteína G columna empaquetada, mientras se eluye y se mide el Ag* libre. A pesar de la etapa de competición, el sistema puede ser considerado totalmente automatizado y permite el análisis de 10 muestras/h. Se ha comparado su sistema con la ELISA directa usando el mismo tipo de etiquetas (en este caso, la β-galactosidasa, β-Gal) y las sensibilidades conseguidas son similares en ambos métodos (ver Tabla 3.1.), e incluso ligeramente mayor para FIIA.

Otro método desarrollado consiste en un capilar inmunoensayo acoplado a un enzima biosensor que actúa como la unidad de detección (Rose y col., 2002). El sistema no funciona completamente automatizado, dado que la etapa de competición heterogénea y la elución de la fracción libre son llevadas a cabo *off-line*. El capilar es entonces integrado en un sistema de inyección de flujo con un biosensor GDH (glucosa deshidrogenasa). La técnica ha sido desarrollada para NP, OP, NPE, y OPE, y la sensibilidad ha sido también comparada con la ELISA directa, siendo menor en el sistema automático; sin embargo, los resultados de especificidad muestran la misma tendencia: los APEs son reconocidos mejor que los APs (ver Tabla 1.3.4.1.).

Matsunaga y col., desarrollaron un inmunoensayo heterogéneo automático basado en la inmovilización de los anticuerpos monoclonales (de industrias Takeda) en partículas magnéticas bacterianas (Marsunaga y col., 2003). Las propiedades magnéticas de estas partículas permiten la separación fácil del reactivo inmovilizado del medio en diferentes etapas secuenciales. Diversos ensayos competitivos han sido llevados a cabo usando APEs como analitos diana, obteniendo límites de detección bastante buenos (LOD=6.6 $\mu\text{g/L}$) (ver Tabla 1.3.4.1.) en comparación a ELISA directa (Goda y col., 2000). El sistema también estudió el modelo de reactividad cruzada con AP y APEs individualmente y se observó el mismo perfil que consta en las indicaciones comerciales de la ELISA directa: los APEs son mejor reconocidos que los APs.

Fránek y col., realizaron otro intento de preparación de anticuerpos específicos para APEs, en este caso, con anticuerpos policlonales (Fránek y col., 2001). Se sintetizaron varios haptenos de inmunización con un brazo espaciador en la posición alquil, dejando el grupo fenol intacto (hapteno 1B en la Fig. 3.1.), que es, justo la estrategia opuesta que la llevada a cabo por Goda y col. Los Ac obtenidos fueron solo testados contra NP y se desarrollaron una ELISA indirecta y un inmunoensayo de polarización fluorescente (PFIA homogéneo); los LODs alcanzados mediante PFIA fueron al menos 2 órdenes de magnitud mayores (ver Tabla 1.3.4.2.) que en la ELISA. Desafortunadamente hay una falta de información respecto a la especificidad de los Ac para OP, APEs, o incluso APECs.

Dependiendo de los requerimientos, puede ser suficiente un ensayo ELISA con Ac capaces de reconocer todos los compuestos alquilfenólicos (incluyendo APEs y APs). Sin embargo, continúan siendo más útiles Ac específicos solo para NP, ya que este es el compuesto más estrogénico y persistente de los compuestos alquilfenólicos y por tanto son necesarios controles más rápidos y exhaustivos para determinar los niveles exactos de NP en el medioambiente.

Finalmente, también hay que destacar que la sensibilidad de las técnicas desarrolladas es generalmente peor para NP que para APEOs. En la mayoría de casos el rango dinámico o la IC_{50} son del orden de mg/L. La hidrofobicidad del NP, la cual es bastante alta ($\log P = 4.5$), puede explicar la baja sensibilidad alcanzada por estos métodos respecto a los APs. Dado que las técnicas inmunoquímicas trabajan por definición en medio acuoso y el porcentaje de disolvente orgánico tolerado para la técnica es normalmente muy bajo (10–20%), las sustancias hidrofóbicas son a veces difíciles de medir. En estas condiciones de ensayo el NP probablemente presenta problemas de solubilidad o incluso de adsorción inespecífica en las superficies donde se lleva a cabo. La sensibilidad puede ser bastante alta para muestras de aguas residuales, donde los niveles de NP son bastante altos, pero no para muestras de agua superficial y subterránea.

3.2. RESULTADOS: DETERMINACIÓN DE NP EN MUESTRAS DE AGUA MEDIANTE ELISA -

Los trabajos que se presentan a continuación, se centran en la aplicación de ensayos inmunoenzimáticos ELISA, para la cuantificación de nonilfenol, octilfenol y otros compuestos alquilfenólicos.

El trabajo "*Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of 4-nonylphenol and octylphenol in surface water samples by LC-ESI-MS*" fue realizado en una colaboración con *the Department of Analytical Biotechnology, Veterinary Research Institute (Brno, Czech Republic)*: En este estudio se aplicó el método ELISA en formato directo desarrollado previamente por Zerávik y colaboradores con anticuerpos monoclonales (Zerávik y col., 2004), para la determinación de NP y OP en 40 muestras de aguas superficiales correspondientes a distintos ríos de Portugal, y se compararon los resultados obtenidos del análisis paralelo mediante ELISA y LC-MS.

El objetivo del estudio fue la validación del ensayo directo ELISA, para lo cual:

- (1) Se validó el ensayo ELISA comparando el rendimiento de ELISA con HPLC-MS, mediante la sensibilidad, la precisión y la exactitud usando muestras fortificadas y
- (2) Se evaluó ELISA como herramienta de *screening* cualitativa o semi-cuantitativa para llevar a cabo un *monitoring* o PVA eficaz para determinar NP y OP o el total de APs en muestras de agua, comparando los resultados obtenidos con ELISA vs LC-MS en 40 muestras de agua superficial

El artículo "*Inmunoenzyme assay of nonylphenol; study of selectivity and detection of alkylphenolic non/ionic surfactants in water samples*" fue realizado en colaboración con *the Institute of Biochemistry, Moscow State University (Russian Academy of Sciences)* y se basó en la validación de un método ELISA Indirecto desarrollado por Mart'ianov y colaboradores con anticuerpos policlonales contra NP. Este método permite obtener un límite de detección de 10 ng/mL, para la detección conjunta de NP, OP, alquilfenoles etoxilados, alquilfenoles carboxilados y sus derivados halogenados en aguas. Se aplicó en dos variantes de ensayo ELISA diferentes, con distintas condiciones y micro-placas de pocillos.

El objetivo del estudio fue la validación del ensayo indirecto ELISA, para lo cual:

- (1) Previamente se estudió la reactividad cruzada (RC) con alquilfenoles, alquilfenol etoxilados, alquilfenol carboxilados y sus derivados halogenados.
- (2) Se evaluó el efecto matriz realizando el ensayo ELISA en distintas matrices de agua (agua de grifo, de consumo, agua subterránea, etc) comparándolas con agua desionizada.
- (3) Los resultados fueron analizados en paralelo mediante LC-MS(MS) con el objetivo de comparar los resultados obtenidos por ambas técnicas para la validación del ensayo ELISA en muestras reales correspondientes a agua de grifo, aguas superficiales, afluentes y efluentes de 4 depuradoras de la cuenca del río Llobregat.

Artículo científico número 2:

***“Validation of an ELISA for the determination of 4-Nonylphenol and Octylphenol
in surface 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



Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of 4-nonylphenol and octylphenol in surface water samples by LC-ESI-MS

R. Céspedes^a, K. Skryjová^b, M Raková^b, J. Zeravik^b, M. Fránek^b, S. Lacorte^a, D. Barceló^{a,*}

^a *Department of Environmental Chemistry, IQAB-CSIC, Barcelona, Spain*

^b *Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic*

Received 1 December 2005; received in revised form 22 May 2006; accepted 3 July 2006

Available online 14 August 2006

Abstract

4-Nonylphenol (NP) and octylphenol (OP) were measured by direct ELISA in both laboratory-fortified and surface water samples collected monthly from 10 rivers. In this procedure, samples were concentrated by solid phase extraction (SPE) using Lichrolut RP-18 sorbent with good recoveries obtained for both LC-MS and ELISA, giving a low level of detection (LOD) at the range of low $\mu\text{g L}^{-1}$ and good reproducibility. Analysis of 40 surface water samples demonstrated that the ELISA may be a useful screening tool for the determination of the alkylphenols in surface water matrices. The concentration of NP and OP in surface waters ranged from 0.11 to 6.58 $\mu\text{g L}^{-1}$. A good correlation of results obtained by ELISA and LC-MS within the concentration range of 0.08–6.86 $\mu\text{g L}^{-1}$ was found in the river samples [$R^2 = 0.924$, $n = 39$]. The influence of various factors on assay determination was also discussed.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: ELISA; Liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS); Nonylphenol; Octylphenol

1. Introduction

Alkylphenol ethoxylates (APEOs) belong to a group of non-ionic surfactants used in agricultural and industrial products; they have been widely used in the last 40 years as detergents, emulsifiers, antifoamers and pesticide adjuvants [1]. Concern over their possible environmental and health impact led to the ban of APEOs from cleaning products in many European countries [2]. Alkylphenols (APs) 4-nonylphenol (NP) and 4-*tert*-octylphenol (OP) are the most common degradation products of APEOs. Among others, NP is widely used as a plastic additive and antioxidant, as well as in the tanning industry and in pesticide formulations [3–6]. OP is used as a detergent, emulsifier, solubiliser and wetting agent [7]. The alkyl chain can vary in size, degree of branching and the attachment position to the phenol [8]. As a result of their widespread use, these compounds have been detected in water samples [9–12] and fish tissue [13–16], sediments and sewage sludge [17–19].

Although APEOs are not classified as highly toxic substances, some of their metabolites (APs and short chain APEOs) are more persistent, bio accumulative, lipophilic and less water soluble than their parent compounds [1,19], being highly toxic to aquatic organisms, mammals and birds [20–21]. In addition, *in vitro* [5] and *in vivo* studies [3,6,22–25] have confirmed their estrogenic potential [26–28]. Compounds involved in these mechanisms (called endocrine disrupters) may interfere with the normal endocrine function of both wildlife and humans [29–32]. The biodegradation of NPEOs under aerobic conditions yields mainly short ethoxy chain oligomers (NPE₁O and NPE₂O), whereas under anaerobic conditions fully de-ethoxylated nonylphenol (NP) is also formed. Increasing toxicities were found with decreased ethoxylate chain length [28,33–35]. Due to their endocrine disrupting properties, NP and OP are included in the priority list of the New Framework Directive (Directive 2000/60/EEC) [36]. So far, NP and OP are analysed by gas or liquid chromatography coupled to mass spectrometry. However, low cost, rapid and automated methods are needed for screening purposes [37]. Immunochemical techniques [4,38–42] are among some of the emerging techniques used to discriminate between contami-

* Corresponding author. Tel.: +34 93 400 61 70; fax: +34 93 204 59 04.
E-mail address: dbcqam@cid.csic.es (D. Barceló).

nated and non-contaminated samples. Advantages of ELISA include cheap instrumentation, small sample volumes for analysis and rapid analytical capabilities. However, filtration and thorough clean up steps are required if complex matrices such as waste waters are to be analysed to avoid matrix effects.

Although assays for surfactants started in the eighties [43], most of them have only been reported in the recent years [40–42,44–50]. Concerning the analysis of NP and OP, Goda et al. [40], developed a monoclonal ELISA for the determination of alkylphenol polyethoxylates (APnEOs) and their biodegradation products, whereas Mart'ianov et al. [42] were able to detect NP and NP-related compounds such as OP, alkylphenol ethoxylates, alkylphenol carboxylates and their halogenated derivatives using an ELISA based on polyclonal antibodies. The ELISA result was compared with standard HPLC and LC–MS/MS techniques for river samples [40] and waste waters [40,42].

Fránek et al. developed ELISAs based on both polyclonal and monoclonal antibodies for detection of NP and OP [46,50]. A strong tendency to recognize alkylphenols as a total analyte amount was indicated by the cross-reactivity pattern for ELISA based on polyclonal antibodies [50]. More detailed cross-reactivity testing indicated the assay allowed for reliable recognition of 4-NP and *tert*-OP in a mixture of various APs. No cross-reactivity was observed for linear alkylbenzene sulfonates and phenolic compounds. Specificity of monoclonal antibody-based ELISA enabled sensitive detection of linear long-chain forms of 4-*n*-alkylphenols. Thus, this assay offered the potential for the detection of the linear chain forms of APs that are the minor fraction of NP/OP isomer spectra in real environmental samples [50]. The polyclonal antibodies produced by Fránek's group were incorporated into the Biacore biosensor immunoassay and used for the analysis of shellfish samples [51]. Recently, a very sensitive chemiluminiscent ELISA and simple dipstick test for 4-*n*-NP, based on the above mentioned monoclonal antibody were developed [51]. From a practical point of view, the above polyclonal ELISA being able to detect the total amount of APs (preferably NP and OP), was considered to be a more relevant method of environmental screening than the assay which recognised only linear AP species using monoclonal antibodies. The objective of the present study was to investigate the use of ELISA as a screening technique for the effective monitoring of NP and OP in water samples. For such a purpose, the ELISA performance was (1) compared to conventional HPLC-MS in terms of sensitivity, precision and accuracy using fortified samples and (2) evaluated as a qualitative or semi-quantitative screening tool for determining NP and OP or total APs in 40 samples of surface water.

2. Experimental

2.1. Chemicals and biochemicals

Dimethylsulfoxide (DMSO) was purchased from Sigma (St. Louis, USA). 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) was pro-

vided by Serva (Heidelberg, Germany). All other chemicals were of analytical grade. The preparation of enzyme conjugate (9-pOHPh-non-HRP) and rabbit antibody (9-pOHPh-non-OVC) are described in a previous paper [46].

4-Nonylphenol (90% technical mix of isomers) was purchased from Sigma (St. Louis, USA). 4-Heptylphenol (4-HP), used as internal standard in the LC–MS analysis, and 4-*tert*-octylphenol, were both obtained from Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Stock solutions of individual standards were prepared at 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ in methanol. Working standard solutions were obtained by further dilution of stock solutions with methanol. HPLC-grade solvents (water, methanol, acetonitrile, acetone and dichloromethane) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Analytical grade sodium acetate was purchased from Panreac (Barcelona, Spain).

2.2. Buffers and solutions

Carbonate buffer (50 mmol L^{-1}), pH 9.6 for coating; 10 mmol L^{-1} phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2 (containing 145 mmol L^{-1} NaCl) for dilution of the peroxidase tracer; 10 mmol L^{-1} phosphate-buffered saline with 0.1% Tween-80 (PBST), pH 7.2 (containing 145 mmol L^{-1} NaCl) for washing the microtitre plate; substrate buffer for HRP was 0.1 mol L^{-1} sodium acetate, pH adjusted to 5.5 by addition of 1 mol L^{-1} of citric acid; substrate solution for HRP was prepared by addition of 1 mL of substrate buffer, 200 μL of 1% (w/v) solution of TMB in DMSO and 20 μL of 6% (v/v) H_2O_2 to 20 mL Milli Q-water; stopping reagent 2 mol L^{-1} H_2SO_4 .

2.3. Sample collection

Ten surface water samples were collected monthly between April and August 2001 (excepting July) from different rivers. Surface water samples were collected in Pyrex borosilicate glass containers. Each bottle was rinsed with tap water and with high purity water, prior to sampling. Samples were stored at 4 °C immediately after sampling.

2.4. Sample preparation

Water samples were filtered through 0.45 μm membrane filters and extracted within 48 h to avoid degradation of target compounds.

Solid phase extraction (SPE) with Lichrolut RP-18 (500 mg, 6 mL) sorbent (Merck, Darmstadt, Germany) was performed using an automated sampler processor automated sample preparation with extraction columns (ASPEC XL) from Gilson (Villiers-le-Bel, France), fitted with a 817 switching device and an external 306 LC pump, as described in a previous paper [52]. SPE cartridges were conditioned by passing 7 mL of methanol, and 3 mL of LC-grade water through the cartridge at a flow rate of 3 mL min^{-1} . Five hundred millilitres of filtered water sample were percolated through the C18 cartridge at a flow rate of 5 mL min^{-1} . After preconcentration, the extraction materials were completely dried (30 min) using a Baker SPE 12 g apparatus (J.T. Baker, Deventer,

Netherlands) connected to a vacuum system (set at -15 psi). Analytes were eluted with ($2\text{ mL} \times 5\text{ mL}$) of $\text{MeOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (9:1) and a five minute delay between the two elutions. After elution, the extracts were evaporated to dryness with a gentle stream of nitrogen and reconstituted with $300\ \mu\text{L}$ methanol.

The methanolic extract was spiked with an internal standard (4-heptylphenol) at $1000\ \mu\text{g L}^{-1}$ prior to measurement with LC–MS. For the ELISA determinations, $50\ \mu\text{L}$ of the methanolic extracts were evaporated under a stream of nitrogen and dissolved in 1 mL PBS and sonicated for 30 min in an ultrasonic bath. The samples were stored at $-18\ ^\circ\text{C}$ in glass vials with Teflon lined screw caps.

2.5. ELISA procedure

An automated Strip Washer EL \times 50TM from Bio-Tech Instruments (Vermont, USA) was used for washing microtiter plates. All ELISA experiments were performed in sterile 96-well microplates Maxisorp (Nunc, Roskilde, Denmark) and the absorbance was measured with an EIA iEMS Reader and Software Genesis 3.04 (Labsystems MF, Helsinki, Finland). Milli Q equipment for water purification was obtained from Millipore Corp (Bedford, USA).

Microtiter plates were coated with $200\ \mu\text{L}$ /well of antibody, diluted with coating buffer and incubated at $4\ ^\circ\text{C}$ overnight. Unbound components were removed by washing three times with $300\ \mu\text{L}$ of PBST. Nonylphenol standard or sample diluted with PBS ($100\ \mu\text{L}$) and tracer in PBS ($100\ \mu\text{L}$) were added to the wells in triplicate. The plates were shaken on a microtiter plate shaker for 1 min followed by 1 h incubation at $4\ ^\circ\text{C}$. After plates were washed three times, $200\ \mu\text{L}$ of the enzyme substrate and chromogen ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{TMB}$) were added. After plates were shaken for 15 min , the enzymatic reaction was stopped by adding $100\ \mu\text{L}$ of $2\text{ mol L}^{-1}\ \text{H}_2\text{SO}_4$. The absorbance was measured at 450 nm with an ELISA reader and the AP concentration in water samples calculated from the calibration curve generated during the same run.

2.6. Liquid chromatography–mass spectrometric analysis

LC–MS conditions are described in [52]. Briefly, the HPLC system consisted of an HP 1100 auto sampler having a $100\ \mu\text{L}$ loop and an HP 1090 A LC binary pump both from Hewlett Packard (Palo Alto, CA, USA). The HPLC separation was achieved on a $5\ \mu\text{m}$, $250\text{ mm} \times 4\text{ mm}$ i.d. Cis reversed phase column (LiChrospher 100 RP-18) from Merck (Darmstadt, Germany).

The injection volume was set at $20\ \mu\text{L}$ and the flow rate was 1 mL min^{-1} . The separation was performed in negative ionisation mode (NI) under gradient elution conditions using acetonitrile (A) and water (B). The gradient elution began from 30% A, to 60% A for 15 min , to 70% A for 5 min , to 90% A for 10 min and back to the initial conditions for 3 min . The extraction voltage used was 90 V . Detection was carried out using an LC-MSD HP 1100 mass selective detector, equipped with an electrospray (ESI) interface.

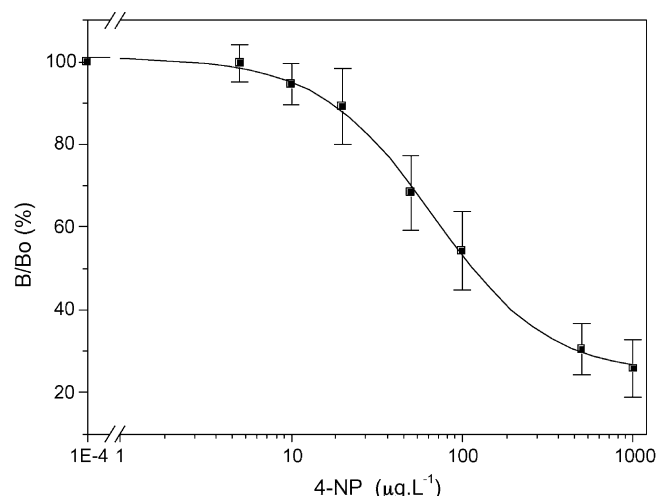


Fig. 1. Dose–response curve for 4-NP calibrator. The bars indicate the standard deviation for six replicate immunoassays. ELISA was based on the antibody 9-pOHPH-non-OV-C and 9-pOHPH-non-HRP reagent combination. The coating was carried out at the antibody dilution 1:1000, the tracer dilution was 1:2000.

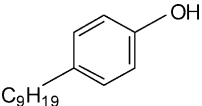
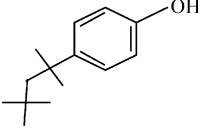
3. Results and discussion

3.1. Validation of ELISA using fortified samples

The calibration curve for NP obtained by ELISA is shown in Fig. 1. The standard dose response is expressed here as B/B_0 , where B = absorbance at a given concentration of analyte and B_0 = absorbance at zero concentration of the analyte. The curves were constructed in the concentration range of 5 – $1000\ \mu\text{g L}^{-1}$. As shown in Fig. 1, the stability of the established ELISA procedure was good—the relative standard deviation for each calibration point on 6 curves was within 4–9%. The IC_{50} values, defined as the analyte concentration causing binding inhibition at half-maximum in the dose–response curve were established in the range of 54.1 – $65.0\ \mu\text{g L}^{-1}$ for six curves.

The LOD of the ELISA procedure covering the preconcentration step was 6 ng L^{-1} in water samples. With the purpose of comparison between both methods, Table 1 shows structures, detection limits for NP and OP (LOD and IDL, calculated using a signal-to-noise ratio of 3 ($S/N=3$) in selected ion monitoring mode for LC–MS), and the dynamic range of the methods. Both methods detected concentrations within the ng L^{-1} to $\mu\text{g L}^{-1}$ levels, ELISA being 10 times more sensitive than LC–MS, demonstrating its high sensitivity for the target compounds under study. IDLs obtained by LC–MS showed that lower concentrations could be achieved if higher water samples were to be preconcentrated. Both methods present a wide dynamic range, being one order of magnitude broader in the SPE-LC-MS than for the ELISA. This increases the applicability of the method for real water samples, where concentration ranges can increase various orders of magnitude. The robustness of the method is also shown by the good repeatability (0.4–4.3% for LC–MS) obtained by both methods. Throughout the concentration range tested, recoveries obtained permitted the quantitative determination of NP and OP in surface waters.

Table 1
Structures of analytes, detection limits (calculated in selected ion monitoring for LC–MS) and dynamic range for NP and OP determined in water samples by ELISA and LC–MS in negative mode of ionisation

Compound	Structure	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)		IDL (ng)		Dynamic range ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
		ELISA	LC–MS	LC–MS	ELISA	LC–MS	
NP (nonylphenol)		0.006	0.07	0.6	5–1000	5–10000	
OP (octylphenol)		0.006	0.06	0.4	5–1000	5–10000	

LOD: detection limit; IDL: instrumental detection limit.

In order to compare the analytical performance of the ELISA and LC–MS methods, ground water samples were spiked with NP and OP, respectively at 0.5, 2, 5, 20 and 50 $\mu\text{g L}^{-1}$; the accuracy of both techniques were determined analysing the same extracts by both methodologies. This range was selected because it reflected the average concentration levels found in surface waters. The accuracy of ELISA was assessed in fortified samples carried through the sample preparation procedure after reconstitution and dilution of the sample with PBS buffer. Because antibody response to NP and OP was different, standard curves using the same antibody were calibrated with technical NP or OP standard to obtain true recovery values for the respective analyte. The recovery of NP added to water sample was quantified by LC-ESI-MS using an external standard calibration using the base peak m/z 219 $[\text{M} - \text{H}]^-$ for NP and m/z 205 $[\text{M} - \text{H}]^-$ for OP, respectively. The results of the recovery experiments of NP and OP are summarized in Table 2. Extracts were first analysed by LC–MS, then evaporated, reconstituted with PBS and then analysed by ELISA, so lower recoveries obtained by ELISA are explained by analyte loss during evaporation. Values of 87–73% for the recovered NP and 117–51% for OP were obtained in the lower range of spiked concentrations (0.5 and 5.0 $\mu\text{g L}^{-1}$). The recoveries found at the higher spiking levels (20 and 50 $\mu\text{g L}^{-1}$)

Table 2
Recoveries (%) obtained by ELISA and LC-ESI-MS in ground water samples

C spiked $\mu\text{g L}^{-1}$	ELISA				LC–MS	
	%NP ^a	%NP + OP ^a	%OP ^a	%OP ^b	%NP	%OP
0.5	87	50	50	117	69	67
1	–	–	–	–	105	71
2	75	39	32	71	116	79
5	73	34	24	51	103	80
10	–	–	–	–	99	73
20	47	35	19	40	109	72
50	40	30	15	33	104	68

^a Values derived from NP calibration.

^b Values derived from OP calibration.

were only 47 and 40% and 33–40% for NP and OP, respectively (values derived from the respective NP and OP calibration). As expected, the recoveries obtained by the addition of NP alone were higher than the values obtained for the equimolar mixture of NP and OP (30–50%). It should be noted that recovery of the NP + OP mixture in spiked waters was measured using NP calibration and therefore these recovery values were lower due to the weaker OP response compared with NP (cross-reactivity value for OP was 38% versus 66% for NP [50]). Therefore, we observed approximately double values for OP calculated with OP calibration versus OP calculated with NP calibration. Subsequent experiments showed that decreased recovery was observed for highly spiked concentrations and was caused during the sample preparation step. To measure analyte within the working (calibration) range of our ELISA, samples of different analyte concentration were diluted with PBS buffer at different dilution rates. The samples with low analyte concentration (0.5 and 2.0 $\mu\text{g L}^{-1}$) were dissolved in 1 ml of buffer (starting dilution) prior to ELISA detection, whereas the samples of higher concentrations (5–50 $\mu\text{g L}^{-1}$) were diluted using progressive serial dilution (50–500 times) with the buffer. Surprisingly, when sample dilution was carried out using only a single step for the high analyte concentration, the recovery values ranged from 70–90% (unpublished results). It is supposed that the lipophilic character of NP and OP resulted in analyte losses (e.g. adsorption on working materials) within serial dilution steps with regard to the results in Table 2. This indicates that samples suspected to have a high concentration of these compounds should be measured using a single dilution step when more accurate results are required. With respect to the ELISA sensitivity, samples suspected to have high concentrations of these compounds (50 $\mu\text{g L}^{-1}$ or higher) could be analysed directly from the sample, avoiding the preconcentration step. As shown in Table 2, the recoveries determined using the LC-ESI-MS reference method were within the range 69–116% and 67–80% for NP and OP, respectively. These values permit the quantitative determination of NP and OP in surface water samples.

Table 3
Concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$) obtained by ELISA and LC-ESI-MS in surface water samples

April	LC-MS			ELISA
	NP	OP	Total	
1	0.15	<LOD ^a	0.15	0.32
2	0.36	<LOD	0.36	0.47
3	0.45	0.10	0.55	0.61
4	0.50	<LOD	0.50	0.49
5	0.25	0.13	0.38	0.39
6	0.28	<LOD	0.28	0.25
7	0.24	0.10	0.34	0.56
8	0.25	<LOD	0.25	0.30
9	0.89	0.11	1.00	0.81
10	0.49	<LOD	0.49	0.43
May	LC-MS			ELISA
	NP	OP	Total	
1	0.23	<LOD	0.23	0.12
2	0.15	<LOD	0.15	0.30
3	0.27	0.65	0.92	0.30
4	0.23	<LOD	0.23	0.44
5	<LOD	<LOD	<LOD	0.60
6	0.15	0.16	0.30	0.30
7	0.16	<LOD	0.16	0.60
8	0.21	<LOD	0.21	0.54
9	0.27	0.63	0.90	2.48
10	0.28	0.30	0.58	0.60
June	LC-MS			ELISA
	NP	OP	Total	
1	0.32	<LOD	0.32	0.24
2	0.28	<LOD	0.28	0.49
3	5.58	<LOD	5.58	2.71
4	0.16	<LOD	0.16	0.30
5	0.15	<LOD	0.15	0.29
6	0.29	0.17	0.46	0.38
7	0.24	<LOD	0.24	0.20
8	0.29	0.09	0.38	0.30
9	2.07	0.13	2.20	2.80
10	0.23	0.09	0.28	0.16
August	LC-MS			ELISA
	NP	OP	total	
1	<LOD	<LOD	<LOD	0.15
2	0.20	<LOD	0.20	0.31
3	6.41	0.17	6.58	6.86
4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
5	0.11	<LOD	0.11	0.13
6	<LOD	<LOD	<LOD	0.15
7	<LOD	<LOD	<LOD	0.08
8	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
9	1.73	<LOD	1.73	1.50
10	<LOD	0.12	0.12	<LOD

^a <LOD: below detection limit.

3.2. Comparison of ELISA and LC-MS for surface water samples

NP and OP were determined in 40 surface water samples by ELISA and LC-MS for intercomparison purposes (Table 3).

The values of LC-MS represented the individual concentrations of NP and OP respectively, while the values of ELISA represented the total amount of AP in the sample. Fig. 2 shows the chromatograms corresponding to NP and OP detected from site 9 (May) in selected ion monitoring (SIM) mode, which corresponds to concentrations of 0.27 and 0.63 $\mu\text{g L}^{-1}$ for NP and OP, respectively. ELISA values were calculated from a standard curve calibrated with NP (Fig. 1). In general, there was a good agreement between the levels detected with both techniques, being between 0.08 and 6.86 $\mu\text{g L}^{-1}$, which is in accordance with levels found in earlier studies [9,11,12]. The higher levels were found in samples collected from sites 3 and 9 and only in two samples (August, Sample 4 and Sample 8), no traces were detected with either of the techniques. These results demonstrate the reliability of the ELISA technique for screening applications.

Table 3 reports the individual concentrations of NP and OP, the sum of them obtained by LC-MS and the total concentration obtained with ELISA. The ELISA detected 38 positive samples as shown in Table 3. Out of these samples, four of them (10% of the total samples analysed) were false positives, when compared with the LC-MS values. ELISA detected concentrations ranging from 0.08 up to 0.60 $\mu\text{g L}^{-1}$, whereas confirmation by LC-MS showed that neither NP nor OP was present. It should be noted that false positives do not constitute an important problem in immunoassays, since positive results should afterwards be checked using another analytical method (LC-MS in this work) to confirm or reject the positive results obtained.

There was a good correlation between ELISA and LC-MS methods for NP and OP in water within the concentration range of 0.11–6.86 $\mu\text{g L}^{-1}$, reflected with a correlation coefficient (R^2) of 0.924, $n = 39$ and a slope of 0.8936 (Fig. 3). The sample from site 3 (June) with a concentration of 5.58 $\mu\text{g L}^{-1}$ of NP was excluded from correlation evaluation because its concentration was significantly biased according to the mean (mean = 0.68 $\mu\text{g L}^{-1}$, $n = 40$). In some cases, there was an over-estimation with ELISA, especially in samples with very low concentrations of NP and OP.

Only one false negative was assigned to the ELISA detection. LC-MS found 0.12 $\mu\text{g L}^{-1}$ of OP from site 10 (August), but ELISA did not detect this compound. The lower sensitivity of ELISA towards OP compared with NP, proves that this ELISA can detect NP or NP and OP simultaneously, but is less reliable in detecting only OP at trace levels. False negative results represent a more critical factor in screening analysis since these samples are not further analyzed. However, the ELISA used in this work was directed to determine NP, and although OP can be detected when it appears in conjunction with NP, the test should not be focused towards the determination of solely OP in waters. In this sense, OP appears at lower concentrations and less frequently in the waters analysed (only 14 positive values ranging from 0.09 to 0.65 $\mu\text{g L}^{-1}$, compared to 33 positive values for NP at 0.11–6.41 $\mu\text{g L}^{-1}$).

The results obtained demonstrate that ELISA constitutes a good method which can be used as a screening tool for rapidly determining concentrations of NP in water samples. The major advantage of the ELISA method is the possibility to analyse many samples rapidly. Approximately 40 samples can be anal-

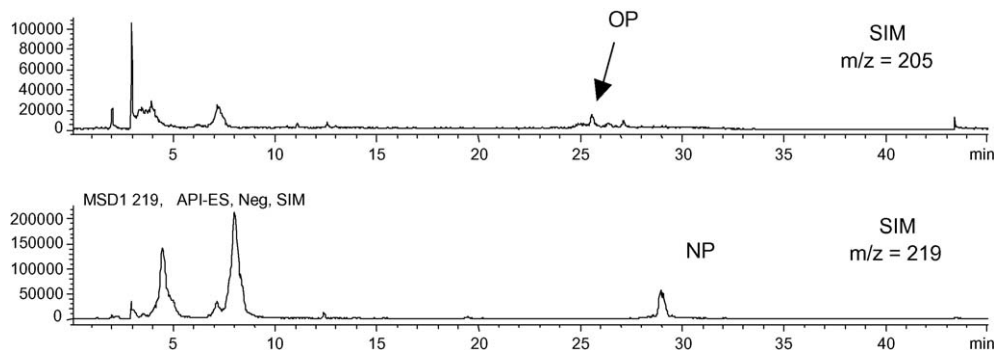


Fig. 2. Ion chromatogram by LC-ESI-MS in selected ion monitoring (SIM) corresponding to site 9 water extract for NP and OP.

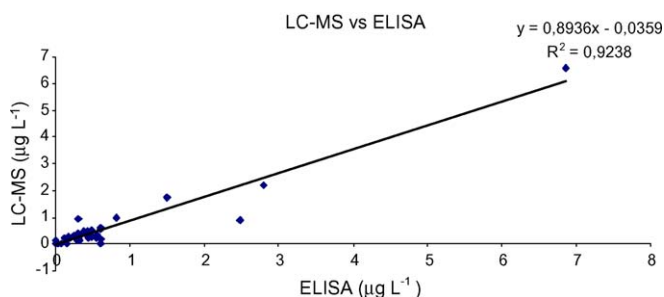


Fig. 3. Correlation between LC-MS and ELISA values ($n = 39$) for NP and OP in surface waters.

used in less than 4 h by ELISA, which considerably exceeds the time effectiveness of the LC-MS method. Considering the fact that four plates can be easily handled simultaneously, the number of samples handled per unit of time can be even more significant. However, chromatographic techniques, preferably with MS, are needed for the final identification and confirmation of all the target analytes.

4. Conclusions

A polyclonal antibody-based ELISA method directed to determine NP and OP in water was validated using fortified and surface water samples. Both ELISA and LC-MS provided good sensitivity and precision, although a preconcentration step was needed to determine such compounds at environmentally relevant concentrations. A good correlation between the ELISA and LC-MS in 39 surface river waters within the concentration range of 0.08 – $6.86 \mu\text{g L}^{-1}$ demonstrated that, ELISA is a convenient tool for screening NP concentrations in water samples. The validated ELISA test permits the determination of NP with high reliability, although it is not able to detect OP with the same assay sensitivity within a single assay performance. Only 1 false negative and 4 false positive findings in 40 analysed samples were detected based on comparison with confirmatory LC-MS. False negative results can be obtained when OP is the only analyte present in water. On the other hand, the four false positives demonstrate the need to perform confirmatory analysis before providing the results. If ELISA is to be applied to more complex matrices, such as waste waters, the sample preparation method will need to be improved to reach standard conditions for both LC-MS and immunological detection.

Acknowledgements

This work has been funded by the EU Project SWIFT WFD (Contract SSPI-CT-2003–502492) and by the Spanish Ministry of Science and Education (CTM2005–24255E). This work reflects only the author's views and the European Community is not liable for any use that may be made of the information contained therein. We thank Roser Chaler, Dori Fanjul and D. Fotjová for excellent technical assistance. Merck is acknowledged for the gift of the LC columns and the SPE cartridges used in this work. The authors are very grateful to Paula Viana, from the Direcção Geral do Ambiente do Portugal, for providing us with water samples from Portugal.

References

- [1] G.G. Ying, B. Williams, R. Kookana, R. Environ. Int. 28 (2002) 215.
- [2] C.G. Naylor, J.P. Mieur, W.J. Adams, J.A. Weeks, F.J. Castaldi, L.D. Ogle, R.R. Romano, J. Am. Oil Chem. Soc. 69 (1992) 695.
- [3] S. Jobling, D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen, J.P. Sumpter, Environ. Toxicol. Chem. 15 (1996) 194.
- [4] M.C. Estévez-Alberola, M.P. Marco, Anal. Bioanal. Chem. 378 (2004) 563.
- [5] A.M. Soto, H. Justicia, J.W. Wray, C. Sonnenstein, Environ. Health Perspect. 92 (1991) 167.
- [6] E.J. Routledge, J.P. Sumpter, J. Biol. Chem. 272 (1997) 3280.
- [7] C.A. Staples, P.B. Dorn, G.M. Klecka, S.T. O'block, L.R. Harris, Chemosphere 36 (1998) 2149.
- [8] S.N. Pedersen, L.B. Christiansen, K.L. Pedersen, B. Korsgaard, P. Bjerregaard, Environ. Sci. Technol. 233 (1999) 89.
- [9] M. Castillo, E. Martínez, A. Ginebreda, L. Tirapu, D. Barceló, Analyst 125 (2000) 1733.
- [10] P.L. Ferguson, C.R. Iden, B.J. Brownawell, Anal. Chem. 72 (2000) 4322.
- [11] M. Petrovic, A. Rodríguez-Alba, F. Borull, R.M. Marce, E. González-Mazo, D. Barceló, Environ. Toxicol. Chem. 21 (2002) 37.
- [12] R. Céspedes, S. Lacorte, D. Raldúa, A. Ginebreda, D. Barceló, B. Piña, Chemosphere 61 (2005) 1710.
- [13] M. Solé, M.J. Lopez de Alda, M. Castelló, C. Porte, K. Ladegaard-Pedersen, D. Barceló, Environ. Sci. Technol. 34 (2000) 5076.
- [14] T. Tsuda, K. Suga, E. Kaneda, M. Ohsuga, Chemosphere 41 (2000) 757.
- [15] S.A. Snyder, T.L. Keith, C.G. Naylor, C.A. Staples, J.P. Giesy, Environ. Toxicol. Chem. 20 (2001) 1870.
- [16] M. Petrovic, M. Solé, M.J. López de Alda, D. Barceló, Environ. Toxicol. Chem. 21 (2002) 2146.
- [17] A. Marcomini, F. Filippuzzi, W. Giger, Chemosphere 17 (1988) 853.
- [18] M. Petróvic, D. Barceló, Anal. Chem. 72 (2000) 4560.
- [19] (a) M. Ahel, W. Giger, Chemosphere 26 (1993) 1471; (b) M. Ahel, E. Molnar, S. Ibric, W. Giger, Water Sci. Technol. 42 (2000) 15.

- [20] T. Tsuda, A. Takino, K. Muraki, H. Harada, M. Kojima, *Water Res.* 35 (2001) 1786.
- [21] T. Isobe, H. Nishiyama, H. Takada, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 1041.
- [22] R. White, S. Jobling, S.A. Hoare, J.P. Sumpter, M.G. Parker, *Endocrinology* 135 (1994) 175.
- [23] E.J. Routledge, J.P. Sumpter, *Environ. Toxicol. Chem.* 15 (1996) 241.
- [24] A.C. Nimrod, W.H. Benson, *Crit. Rev. Toxicol.* 26 (1996) 335.
- [25] C. Desbrow, E.J. Routledge, G. Brighty, J.P. Sumpter, M. Waldock, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 1549.
- [26] S. Jobling, J.P. Sumpter, *Aquat. Toxicol.* 27 (1993) 361.
- [27] A.M. Soto, C. Sonnenschein, K.L. Chung, M.F. Fernández, N. Olea, F.O. Serrano, *Environ. Health Perspect.* 103 (1995) 113.
- [28] S. Jobling, M. Nolan, C.R. Tyler, G. Brighty, J.P. Sumpter, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 2498.
- [29] T. Colborn, F.S. Vom Saal, A.M. Soto, *Environ. Health Perspect.* 101 (1993) 378.
- [30] A.M. Soto, H. Justicia, J.W. Wray, C. Sonnenstein, *Environ. Health Perspect.* 92 (1991) 167.
- [31] E.J. Routledge, D. Shbahan, C. Desbrow, G.C. Brighty, M. Waldock, J.P. Sumpter, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 1559.
- [32] C. Sonnenschein, A.M. Soto, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 65 (1998) 143.
- [33] M. Ahel, W. Giger, M. Koch, *Water Res.* 28 (1994) 1131.
- [34] M.R. Servos, *Water Qual. Res. J. Can.* 34 (1999) 123.
- [35] M. Takino, S. Daishima, K. Yamaguchi, *J. Chromatogr. A* 904 (2000) 65.
- [36] Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000. Commission of the European Communities, Brussels, 2000.
- [37] E. Trullols, I. Ruisánchez, F.X. Rius, J. Huguet, *Trends Anal. Chem.* 24 (6) (2005) 516.
- [38] M. Castillo, A. Oubiña, D. Barcelo, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 2180.
- [39] M. Farré, A. Oubiña, M.P. Marco, A. Ginebreda, L. Tirapu, D. Barceló, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 3898.
- [40] Y. Goda, A. Kobayashi, S. Fujimoto, Y. Toyoda, K.-I. Myagawa, M. Ike, M. Fujita, *Water Res.* 38 (2004) 4323.
- [41] Y. Goda, M. Hirobe, A. Kobayashi, S. Fujimoto, M. Ike, M. Fujita, *Anal. Acta Chim.* 528 (2005) 47.
- [42] A.A. Mart'ianov, B.B. Dzantiev, A.V. Zherdev, S. A Eremin, R. Céspedes, M. Petrovic, D. Barceló, *Talanta* 65 (2005) 367.
- [43] S.I. Wie, B.D. Hammock, *Anal. Biochem.* 125 (1982) 168.
- [44] S. Fujimoto, Y. Goda, *Nippon Rinsho* 58 (2000) 2491.
- [45] Y. Goda, A. Kobayashi, K. Fukuda, S. Fujimoto, M. Ike, M. Fujita, *Water Sci. Technol.* 42 (2000) 81.
- [46] M. Franek, J. Zeravik, S.A. Eremin, J. Yakovleva, M. Badea, A. Danet, C. Nistor, N. Ocio, J. Emneus, *Fresenius J. Anal. Chem.* 371 (2001) 456.
- [47] A. Rose, C. Nistor, J. Erne, D. Pfeiffer, U. Wollemborg, *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 1033.
- [48] M. Badea, C. Nistor, Y. Goda, S. Fujimoto, S. Dosho, A. Danet, D. Barcelo, F. Ventura, J. Emneus, *Analyst* 128 (2003) 849.
- [49] J. Yakovleva, J. Zeravik, I.V. Mchura, A.A. Formanovsky, M. Fránek, S.A. Eremin, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 83 (2003) 597.
- [50] J. Zeravik, K. Skryjová, Z. Nevoranková, M. Franek, *Anal. Chem.* 76 (2004) 1021.
- [51] J.V. Samsonova, M.Y. Rubtsova, M. Fránek, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 1017.
- [52] R. Céspedes, M. Petrovic, D. Raldúa, U. Saura, B. Piña, S. Lacorte, P. Viana, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 697.

Artículo científico número 3:

“Immunoenzyme assay of Nonylphenol:

The study of selectivity and the detection of non-ionic surfactants in water samples”.

Andrey A. Mart'ianov, Boris B. Dzantiev, Anatoly V. Zherdev, Sergei A. Eremin, Raquel Céspedes, Mira Petrovic, Damià Barceló.

Talanta. Vol. 65 (2005) 367-374.

Immunoenzyme assay of nonylphenol: study of selectivity and detection of alkylphenolic non-ionic surfactants in water samples

Andrey A. Mart'ianov^a, Boris B. Dzantiev^{a,*}, Anatoly V. Zherdev^a, Sergei A. Eremin^b,
Raquel Cespedes^c, Mira Petrovic^c, Damia Barcelo^c

^a Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninsky prospect 33, 119071 Moscow, Russia

^b M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, 119992 Moscow, Russia

^c IIQAB-CSIC, Department of Environmental Chemistry, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

Received 25 March 2004; received in revised form 21 June 2004; accepted 5 July 2004

Available online 8 August 2004

Abstract

Immunoenzyme assay (ELISA) is proposed and characterized for determination of alkylphenol ethoxylates, a primary class of manufactured non-ionic surfactants. The assay is based on the obtained polyclonal antibodies against nonylphenol (NP), the main stable intermediate of the decomposition of nonylphenol ethoxylates. A mixture of non-modified branched isomers of NP was applied as hapten coupled to protein carriers by Mannich reaction with the use of formaldehyde. The proposed ELISA format is based on immobilized NP–(soybean trypsin inhibitor) conjugate as a competitor of antigen molecules contained in the tested sample for binding with specific antibodies indirectly labeled via an anti-species immunoperoxidase conjugate. The developed ELISA allows to reveal NP with the limit of detection about 10 ng ml^{-1} and NP-related compounds such as octylphenol, alkylphenoxyethoxylates, alkylphenolcarboxylates and their halogenated derivatives. The ELISA was applied for assaying polluted water samples, namely influents and effluents from different wastewater treatment plants (WWTP) and tap water. ELISA and chromatographic data demonstrate good correlation ($r = 0.94$), while ELISA gives higher values. Due to endocrine disrupting and other toxic activities of some metabolites of alkylphenolic non-ionic surfactants, the developed assay may be effectively used in ecological monitoring and sanitary control.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Immunoenzyme assay; Non-ionic surfactants; Nonylphenol; Endocrine disruptors; Water pollution monitoring

1. Introduction

Wide use of non-ionic surfactants such as alkylphenoxyethoxylates (APEOs) in industrial and domestic sectors results in accumulation of their decomposition products in the environment. The main components of APEOs technical preparations are isomers of nonyl- and octylphenoxyethoxylates. Persistent intermediates of APEOs decomposition, alkylphenols (APs), short ethoxy chain alkylphenol ethoxylates (APE_nOs, $n = 1-2$) and their halogenated derivatives are characterized by substantial endocrine disrupting activity

[1–7]. They constitute a menace to aquatic organisms above all, but other animals and humans receive these compounds along food chains and also undergo endocrine disrupting exposure [8]. The given reasons stipulate actuality of APEOs monitoring in various matrices.

Standard technique for APs assay is chromatography [9,10], either gas chromatography combined with mass spectrometry or liquid chromatography combined with various detection techniques. However, the shortcoming of such analyses is the necessity to use expensive sophisticated equipment, which in turn requires highly skilled analysts to operate it. The net result is that the measurements are performed at specialized laboratories, and the information is obtained at a considerable cost, days after the samples are taken [11].

* Corresponding author. Tel.: +7 95 9542804; fax: +7 95 9542804.

E-mail address: bdzan@online.ru (B.B. Dzantiev).

Immunoenzyme assays have demonstrated their effectiveness for detection of various substances in ecology, medicine and biotechnology [12,13]. A large number of microplate immunoenzyme assays (ELISA) were proposed for monitoring pesticides, dioxins and other environmental pollutants; the results of these investigations are summarized in [14,15]. Development of ELISA techniques for surfactants started in 1982 [16], but most of the systems were described recently [17–22] and were based on a limited set of antibodies.

The main problem confining further development of surfactant immunodetection is lack of antibodies with acceptable spectra of specificity. The necessary antibodies should allow to detect different mixtures of surfactants and their toxic metabolites with comparable effectiveness and at the same time not to bind pollutants from other chemical groups. Since technical non-ionic surfactants consist of a mixture of APEOs, nonylphenol (NP) as their common structural part and stable decomposition intermediate seems to be the most suitable hapten for immunoassays.

Traditional approach to couple a hapten without own reactive groups to a protein carrier is to obtain its amino or carboxylic derivative. In the NP case, a carboxylic derivative of a linear isomer is usually used [18,20]. However, this hapten does not correspond to the real technical non-ionic surfactants, and the induced antibodies typically do not interact with them [18]. We have proposed earlier to apply Mannich reaction for the formation of $-\text{CH}_2-$ bridges between the benzene ring of non-modified NP and a NH -group of a protein carrier [23]. This technique allows to use a real mixture of NP isomers as the hapten in immunogenic hapten–protein conjugate. By means of immunization using this conjugate, specific anti-NP rabbit antibodies were obtained, and their effectiveness in the NP ELISA was shown [23]. In the present investigation, the ELISA was characterized in terms of cross-reactions with alkylphenols, alkylphenoxyoxylates, alkylphenolcarboxylates and their halogenated derivatives. Finally, the ELISA was compared with chromatography in the analysis of real wastewaters.

2. Experimental

2.1. Materials

Nonylphenol (technical mixture of isomers) was from Aldrich, Milwaukee, USA. Dimethylsulfoxide (DMSO), Freund's complete and incomplete adjuvants, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), 2-hydroxybenzoic acid (salicylic acid), *p*-hydroxyphenylacetic acid, 3(*p*-hydroxyphenyl)propionic acid and 5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione were from ICN Biomedicals, Aurora, USA. 4-Aminophenol, 4-chlorophenol, 2-amino-4-chlorophenol, 2,4-dinitrophenol, 4-chloro-3-methylphenol and Triton X-305 were from Merck, Darmstadt, Germany. Gelatin (60 bloom), 2,4-dimethylphenol, 5-aminosalicylic acid, dodecylbenzene-

sulfonic acid and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) were from Sigma, St. Louis, USA. 4-*n*-Nonylphenol, 4-tert-octylphenol, 4-hydroxybenzoic acid and nonylaldehyde (pelargonaldehyde) were from Fluka, Buchs, Switzerland. Nonylphenol-(1-2)-ethoxylate and octylphenol-(3)-ethoxylate were from ChemService, West Chester, USA. L- β -Phenyl- α -alanine was from Reanal, Budapest, Hungary, Triton X-100 from Serva, Heidelberg, Germany and Tween-80 from Koch-Light Laboratories, Colnbrook-Bucks, UK. Bovine serum albumin (BSA) from Sigma and soybean trypsin inhibitor (STI) from ICN Biomedicals were used as the carriers for hapten–protein conjugates. Peroxidase-labeled goat anti-rabbit immunoglobulins were from Medgamal (Moscow, Russia). Nonylphenolmonoethoxylate (NPE_1O), nonylphenoldiethoxylate (NPE_2O), nonylphenol carboxylate (NPE_1C), nonylphenol ethoxy carboxylate (NPE_2C), brominated nonylphenol (Br-NP), chlorinated nonylphenol (Cl-NP), brominated nonylphenol carboxylate (Br- NPE_1C) and chlorinated nonylphenol carboxylate (Cl- NPE_1C) were synthesized according to the method described elsewhere [24,25]. 7-*p*-Hydroxyphenyl heptanoic acid was obtained as described in [26]. Components of buffer solutions and other chemicals were of analytical grade.

Enzyme-linked immunosorbent assays were carried out in optically transparent polystyrene microtiter plates from Nalge Nunc International (Rochester, USA) or Medpolymer (Moscow, Russia).

2.2. Synthesis of nonylphenol–protein conjugates

Nonylphenol was conjugated with BSA and STI by Mannich reaction (modification of the protocol for D-3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol described in [27]). NP was dissolved in DMSO to concentration 33 mg ml^{-1} (0.15 M) and added in $116 \mu\text{l}$ aliquot to 2.0 ml of a BSA solution (10 mg ml^{-1}) in 0.1 M sodium carbonate buffer, pH 10, reaching hapten/carrier molar ratio 50:1. (In the case of STI, the ratio was 30:1.) Then, 0.2 ml of 35% formaldehyde water solution was added dropwise. The reaction mixture was incubated for 30 min at room temperature with stirring and then kept for 5 days at 37°C with periodic shaking. The resulting products were separated from low molecular weight compounds by exhaustive dialysis against 0.05 M potassium phosphate buffer solution, pH 7.4, with 0.1 M NaCl, (PBS) during 2 days.

2.3. Antisera obtaining

Chinchilla rabbits weighting 3–4 kg were immunized by the NP–BSA conjugate. For the first immunization, the immunogen was dissolved in PBS and emulsified with an equal volume of Freund's complete adjuvant to a final concentration of 1.0 mg ml^{-1} . 1.0 ml of this mixture was injected subcutaneously to seven sites on the back of the animal's body. Then rabbits received booster injections by one-half dose of the immunogen subcutaneously (43rd day, in PBS with Freund's incomplete adjuvant, v/v (1:1) and intravenously (46th

day, in PBS). After one week (53rd day), they were bled. Reimmunization cycles were repeated twice (subcutaneous immunizations: 60th and 95th days; intravenous immunizations: 81st and 116th days; bleeding: 88th and 123rd days).

Blood samples were settled for 30 min at 37 °C and then for 2 h at 4 °C. Upper layers were separated by centrifugation for 15 min at 3000 g, carefully collected, dispensed into 0.5–1.0 ml aliquots and stored at –20 °C.

2.4. Nonylphenol ELISA

Two variants of ELISA protocol were used.

Variant 1: NP–STI conjugate was immobilized in Med-polymer microplates from 1 µg ml⁻¹ solution (100 µl per well) in PBS by overnight incubation at 4 °C. Then, the microplate was washed four times by PBS containing 0.05% Tween-80 (PBST). Thirty-minute incubation at 37 °C with 150 µl of 0.1% gelatin solution in PBS leads to blocking potential sites of non-specific sorption. After repeated washing, 50 µl of rabbit anti-NP-antiserum (1:10,000 dilution in 25 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4, with 0.05 M NaCl and 0.05% gelatin) and 50 µl of NP (concentrations from 0.5 ng ml⁻¹ to 200 µg ml⁻¹, in methanol/water or ethanol/water mixture, v/v, 1:4) were added into wells and incubated for 1 h at 37 °C. After washing, the peroxidase-labeled goat anti-rabbit antibodies were added into the wells (dilution of the commercial product was 1:6000) and incubated for 1 h at 37 °C. One more washing cycle was carried out (four times by PBST and then one by distilled water) and peroxidase activity of the formed immobilized complexes was measured as described below.

Variant 2: NP–STI conjugate was immobilized in Nunc microplate wells from 0.05 µg ml⁻¹ solution in PBS by overnight incubation at 4 °C. Next steps of the assay were coincident to those described above but the dilution of rabbit anti-NP–BSA antiserum was 1:20,000 and all incubations were carried out at room temperature.

Measurements of the label's activity: Two substrate solutions were used. The first one contained ABTS (0.7 mM) and H₂O₂ (2.8 mM) in sodium–acetate buffer (30 mM), pH 4.5. Hundred microliters of the solution was added into microplate wells and incubated for 30 min at room temperature.

The alternate substrate solution contained TMB (0.4 mM) and H₂O₂ (1.2 mM) in 40 mM Na–citrate buffer, pH 5.5. Hundred microliters of the solution was added into the wells and incubated for 30 min at room temperature in darkness. Then 50 µl of 1 M H₂SO₄ (stop-solution) was added.

Optical density of the oxidation products was measured at 405 nm (ABTS) or 450 nm (TMB) by means of vertical photometers Multiscan EX (Labsystems, Helsinki, Finland) or Spectra Max Plus (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, USA).

Sampling: To analyze the influence of sample matrices on the ELISA parameters, the competitive curves for NP were obtained in tap, ground and drinking water and compared to that one in deionized water. The reaction mixture during the

competition step of the ELISA contained 50 µl of the specific antiserum, 40 µl of water matrix and 10 µl of NP solution in methanol (thus assuring the same content of organics in the final volume).

Calculations: The obtained dependences of the detected signal (*y*) from the competing antigen concentration (*x*) were fitted according to four-parameter logistic equation:

$$y = \frac{A - D}{1 + (x/C)^B} + D$$

C value accords to antigen concentration inhibiting 50% of antibody–conjugate binding (IC₅₀). Cross-reactivity (CR) was calculated according to the formula:

$$CR = \frac{100\% \times IC_{50}(NP)}{IC_{50}(\text{cross-reactant})}$$

2.5. Chemical analysis (LC–MS/(MS))

NPEOs and their halogenated derivatives were analyzed using LC–MS as described by Petrovic et al. [28], whereas NP, NPECs and their halogenated derivatives were analyzed using recently developed LC–MS/(MS) method [29].

Briefly, target compounds were isolated from water samples using solid phase extraction (SPE) on C18-silica (Accubond, J&W Scientific, Folsom, USA). Different volumes of sample (500 ml of tap water, 200 ml of WWTP effluents and 100 ml of WWTP influents) were loaded onto preconditioned cartridges. Afterwards, cartridges were air-dried under vacuum, and were eluted with 2 ml × 4 ml of methanol. The eluates were taken gently to dryness under a nitrogen steam and reconstituted in 1 ml of methanol.

LC–MS/(MS) analyses were performed on a Waters 2690 series Alliance HPLC (Waters, Milford, USA) with a quaternary pump equipped with a 120-vial capacity sample management system. The analytes were separated on a narrow-bore 3-µm, 55 mm × 2 mm i.d. C₁₈ reversed phase column Purospher® STAR RP-18 endcapped (Merck, Darmstadt, Germany). The sample injection volume was set at 10 µl. A binary mobile phase gradient with methanol (*A*) and water (*B*) was used for analyte separation at a flow rate of 200 µl min⁻¹. The elution gradient was linearly increased from 30 to 85% *A* in 10 min, then increased to 95% *A* in 10 min and kept isocratic for 5 min.

A bench-top triple quadrupole mass spectrometer Quattro LC from Micromass (Manchester, UK) equipped with a pneumatically-assisted electrospray probe and a Z-spray interface was used for this study. Capillary voltage was set at –2.8 kV, extractor lens 7 V and RF lens 0.6 V. The source and desolvation temperatures were 150 and 350 °C, respectively. The nitrogen (99.999% purity) flows were optimized at 50 l h⁻¹ for the cone gas and 540 l h⁻¹ for desolvation gas. For MS–MS experiments, the argon collision gas was maintained at a pressure of 5.8 × 10⁻³ mbar.

Compounds detected under negative ionization conditions (NP, NPECs and corresponding halogenated analogs)

were analyzed using a quantitative LC–MS/(MS) in multiple reactions monitoring mode. Compounds detected under positive ionization conditions (NPEOs and corresponding halogenated analogs) were analyzed using a single stage MS in selected ion monitoring mode.

3. Results and discussion

3.1. Nonylphenol detection by the ELISA system

The obtained antibodies against NP were applied for competitive immunoenzyme assay with indirect labeling of antibodies. The assay conditions were optimized to reach maximal sensitivity of NP detection (technical mixture of NP isomers was used as antigen standard). The varied parameters included concentration of reactants (NP–STI conjugate and antisera), duration of incubation steps, the nature and content of organic solvent.

The chosen NP–STI concentration was $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ for Medpolymer microplates and $0.05 \mu\text{g ml}^{-1}$ for Nunc ones; the antiserum dilution being 1:10,000 and 1:20,000, accordingly (see detailed description of the chosen protocols in the Table 1). The obtained calibration curves for two types of microplates are given in Figs. 1 and 2. At these conditions the maximal sensitivity was reached, and the assay accuracy was acceptable (the registered optical density in the absence of competitor ≥ 0.5).

To prevent cross-reactions of the antibodies, Tween-80 was applied as detergent instead of Tritons. Competitive step of the assay was carried out in diluted (25 mM) phosphate buffer without detergent to avoid masking of target antigen in micellar structures. Gelatin was used to block non-specific adsorption before and during the competitive step.

It was shown that preparation and storage of NP standards using plastic vials leads to false growth of detected content of NP. The followed titration of these preparations may cause seeming increase of the detection limit in an order or more.

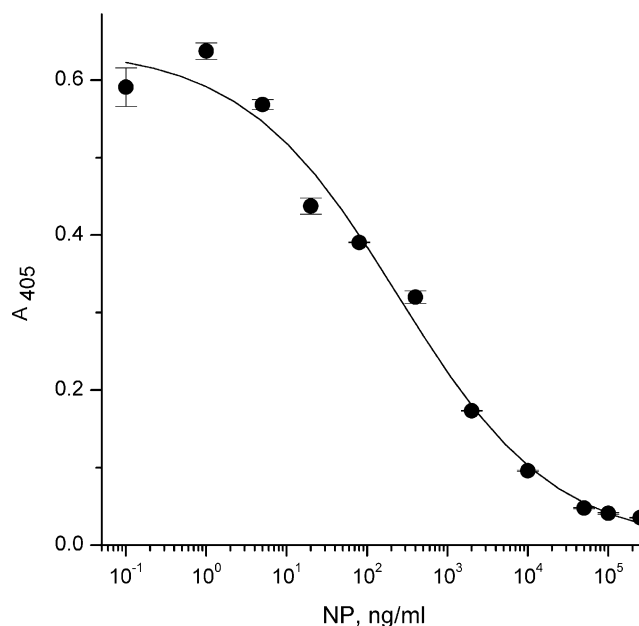


Fig. 1. Calibration ELISA curve for nonylphenol. Medpolymer microplate was used in combination with ABTS as chromogen.

The probable reason of this effect is a slow washing-out of some compounds similar to the studied surfactants from the vials surface. This assignment was confirmed by LC–MS in the course of storage of NP solutions in plastic vials additional peaks on the LC–MS curves appeared (data not shown). Similarly, seeming increase of sensitivity was observed in the case of direct titration of NP in microplate wells with its transfer from well to well by the same tips.

Based on these data, we have proposed to prepare standard solutions of NP for calibration curve in ethanol or methanol and to transfer them into microplate wells without subsidiary dilutions and tending to minimal duration of their contact with plastic tips.

Final content of organic solvent in the microplate wells was 10%, which makes it possible to work with extracts from

Table 1
Conditions and analytical characteristics for two variants of the developed ELISA

	Variant 1	Variant 2
Assay conditions		
Plate	Medpolymer	Nalge Nunc International
Concentration of NP–STI for coating ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	1.0	0.05
Antiserum dilution	1/10,000	1/20,000
Duration of immunochemical step of assay (min)	60	45
Anti-species conjugate dilution	1/6000	1/12,000
Duration of the second step of assay (min)	60	45
Chromogen used	ABTS	TMB
Duration of enzymatic step of assay (min)	30	30
Parameters of calibration curves		
A_{min}	0.001	0.028
A_{max}	0.641	0.919
Power	0.450	0.586
IC_{50} (ng ml^{-1})	246	291
Lower limit of determination, IC_{20} (ng ml^{-1})	11.2	27.3
Upper level of determination, IC_{80} (ng ml^{-1})	5400	3100

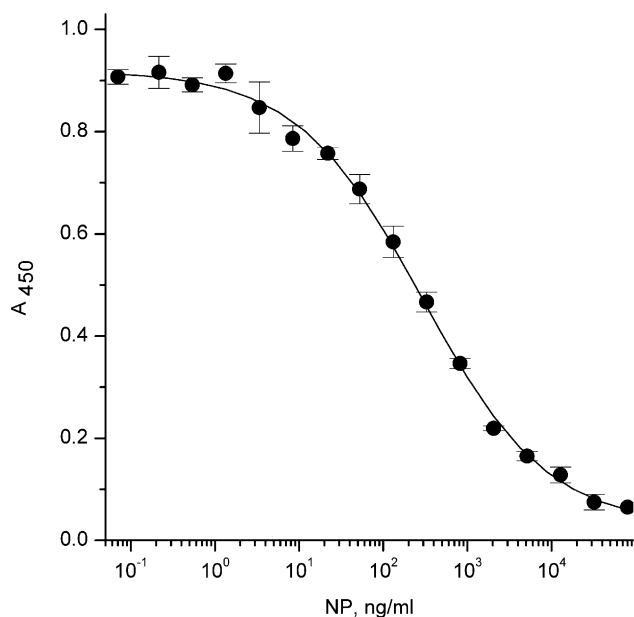


Fig. 2. Calibration ELISA curve for nonylphenol. Nunc microplate was used in combination with TMB as chromogen.

environmental samples. The chosen solvent content is in accordance with known tolerance of other immunoanalytical systems to 10–30% of the organics [30,31]. The earlier described ELISA system for the detection of linear NP [18] also presupposed the use of methanol at a final concentration of 10%.

Under the chosen conditions, about 10 ng ml^{-1} of NP could be quantitative determined (the case of Medpolymer microplates, see Fig. 1). The only known commercial AP ELISA kit of Takeda Chemical Industries for immunodetection of APs is characterized by an essentially worse sensitivity, $\text{IC}_{20} = 70 \text{ ng ml}^{-1}$ [32]. The sensitivity reached in our ELISA system allows to control NP in water samples that can exert acute toxic action [3].

3.2. Specificity of the ELISA system to different groups of pollutants

The proposed system was verified for its cross-reactivity with other classes of pollutants that potentially could be present in water samples. The assay is tolerant (CR < 0.05%) to such tested simple phenolic compounds as phenol, 4-chlorophenol, 2-amino-4-chlorophenol, 2,4-dinitrophenol, 4-chloro-3-methylphenol, 2,4-dimethylphenol, *p*-hydroxyphenylacetic acid, 2-hydroxybenzoic acid (salicylic acid), 5-aminosalicylic acid, 3(*p*-hydroxyphenyl)propionic acid, L- β -phenyl- α -alanine, 5-amino-2-3-dihydro-1,4-phthalazine-dione, 4-hydroxybenzoic acid and nonylaldehyde (pelargonaldehyde). Weak binding values ($0.05\% \leq \text{CR} \leq 1\%$) were found for 4-aminophenol, dodecylbenzenesulfonic acid and hydroxyphenylheptanoic acid (HHA). The low levels of cross-reactions assure the absence of non-specific interactions in the course of the analysis of environmental samples.

Although HHA is a linear structural analog of NP, technical preparations of non-ionic surfactants contain predominantly branched isoforms of APs as a structural part [33]. Therefore, the recognition of linear NP is not required to characterize the degree of pollution.

3.3. Influence of APEOs and APs structure on the effectiveness of their detection

The recognition of native non-ionic surfactants by the proposed ELISA was initially studied for two OPEOs of common laboratory practice, Triton X-100 and Triton X-305 (Table 2). CR values for these compounds are similar if given in molar form (28.1 and 36.2%, correspondingly) though their essential difference in weight form (9.9 and 5.2%). In fact, cross-reactivity expressed in molar units reflects affinity of the antibodies to different compounds in terms of their molecular structure. The discovered phenomenon is stipulated by

Table 2
Cross-reactivities of APEOs in the developed ELISA

Compound	Structure ^a	CR values (%)	
		Mass	Mol
NP		100	100
4- <i>n</i> -NP (linear)		7.60	7.60
NPE ₁ O		156	188
NPE ₂ O		199	279
NPE _(9–10) O		27.3	79.0
NPE ₁ C		37.8	48.0
OP		51.9	48.5
OPE ₃ O		26.9	41.4
Triton X-100 (OPE _(9–10) O)		9.9	28.1
Triton X-305 (OPE ₃₀ O)		5.2	36.2

^a Isomers for alkyl chains given here are chosen from several variants as examples.

the presence of same antigenic determinant in both Triton molecules and its similarity with the initial determinant of NP. The structure of the determinant may be described as benzene ring with branched uncharged C₈–C₉ chain. This element is the common structural part of APEOs and products of their decomposition.

For a more detailed description, representatives of primary classes of non-ionic surfactants (NPEOs and OPEOs) and their metabolites were analyzed. All tested compounds were characterized by high CR values (see Table 2), with the exception of the linear 4-*n*-nonylphenol.

Cross-reactivities for APs differing only in the length of (–C₂H₄O–)_{*n*} chain were also compared for rows of (i) NPE₁O, NPE₂O and NPE_(9–10)O, and (ii) OP, OPE₃O, Triton X-100 (OPE_(9–10)O) and Triton X-305 (OPE₃₀O). The obtained data (see Table 2) confirm the above postulated statement about correlation of cross-reactivity levels with molar concentration of a unique antigenic determinant being common for non-ionic surfactants and their toxic metabolites. Thus, CR levels for OP derivatives vary in range 28–48% (in molar form) and increase for branched NP derivatives.

In this way, the ELISA system may be applied for the determination of both native surfactants and their stable metabolites belonging to two main groups, nonylphenol and octylphenol derivatives. The use of the obtained antibodies allows to accomplish group-specific immunodetection of alkylphenolic non-ionic surfactants.

3.4. ELISA detection of halogenated derivatives of non-ionic surfactants

The developed system has been characterized for its availability to detect APEOs and APs halogenated derivatives. The formation of ring-halogenated alkylphenolic compounds during the chlorination process at drinking water treatment plants was reported in [25,28,29,34].

The proposed system is characterized by effective revealing of chlorinated and brominated derivatives of NP, such as Cl–NP, Cl–NPE₁C, Br–NP and Br–NPE₁C. Cross-reactivities for these compounds vary in the range 33–150% (in weight form), at that the brominated derivatives demonstrate higher affinity to the antibodies (Table 3). A possible reason of the found high CRs may be a rearrangement of charge distribution in benzene ring of the haptens that is caused by introduction of halogen atoms and following structural changes in branched alkyl chain. Thus, monitoring of alkylphenolic non-ionic surfactants by the developed ELISA technique may be realized also for the treated water containing halogenated derivatives of APEOs and APs.

3.5. Analysis of alkylphenolic non-ionic surfactants in polluted water samples with the use of the developed ELISA and chromatographic technique

The ELISA technique has been applied to determine levels of non-ionic surfactants and their derivatives in real water

Table 3
Cross-reactivities of halogenated APs in the developed ELISA

Compound	Structure	CR values (%)	
		Mass	Mol
Br-NP		74.4	101.2
Cl-NP		49.4	57.3
Br-NPE ₁ C		150	243
Cl-NPE ₁ C		33.3	47.4

samples. WWTP influent and effluent, ground and tap water samples were studied. The determined values (Table 4) are in accordance with technological stages of wastewater purification (decrease of pollutant content in the row influent–effluent tap) and confirm effectiveness of the developed technique for ecological monitoring. NP can be detected effectively in environmental water matrixes, and the recovery for added NP is almost full under the stipulation that the content of own APs and APEOs in the matrixes used is negligible (near the detection limit of the assay) (Figs. 3 and 4). Reproducibility of repeated measurements ($n = 7–8$) is $(14.2 \pm 3.3)\%$ that accords to characteristics of traditional ELISA techniques and is sufficient for needs of ecological monitoring.

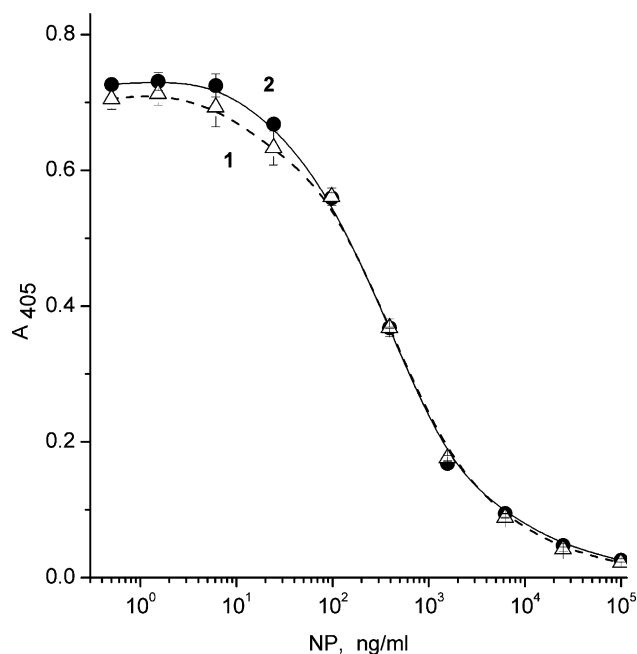


Fig. 3. Competitive curve for NP detection in spiked WWTP effluent A (1) in comparison with the data for deionized water (2).

Table 4
Determination of non-ionic surfactants in real water samples by the developed ELISA technique and by LC–MS

Samples	ELISA data	LC–MS data						
	Total APEOs + APs ^a (ng ml ⁻¹) (Mean ± S.E.M., n = 7–8)	Concentrations (ng ml ⁻¹)						
		NPE ₁ O	NPE ₂ O	NPE _(3–14) O	NP	NPE ₁ C	NPE ₂ C	Sum
WWTP influent A	49.57 ± 10.97	4.0	<0.01	2.1	0.11	<0.01	<0.01	6.2
WWTP influent B	231.5 ± 18.6	7.4	5.1	71.2	0.22	0.35	0.21	84.5
WWTP influent C	359.8 ± 61.0	2.5	5.3	189	2.58	0.05	0.11	199.5
WWTP effluent A	7.14 ± 3.11 ^b	<0.025	2.9	1.2	0.055	0.45	0.12	4.70
WWTP effluent D	37.13 ± 3.52	<0.025	0.5	1.4	0.38	0.82	0.18	3.29
Tap water A	2.85 ± 1.48 ^b	<0.025	<0.01	0.1	<0.01	<0.01	<0.01	0.10

^a The concentrations were calculated based on the calibration curve for NP.

^b The mean values are given considering measurements above and below the limit of detection.

The above results of immunoenzyme determination were compared with levels of individual pollutants measured by chromatographic technique. The used LC–MS method yielded detection limits of 2 pg ml⁻¹ for NP and NPECs and 10 pg ml⁻¹ for NPEOs (25 pg ml⁻¹ for NPE₁O). Recoveries from water ranged from 72 to 98%, with standard deviations below 7%.

The characterized compounds (Table 4) were NP, NPEOs and carboxylated NPEOs with different chain length. Levels of dicarboxylated compounds (with carboxylation of both ethoxy- and alkyl-chains) were not determined although they were known as substantial products of the NPEO biotransformation [35]. OP, OPEO, OPEC and halogenated derivatives were regarded as minor compounds that can contribute not more than 10% of the total pollution. Nevertheless, the common content of the determined types of non-ionic surfactants and their metabolites may be considered as a parameter reflecting the level of pollution.

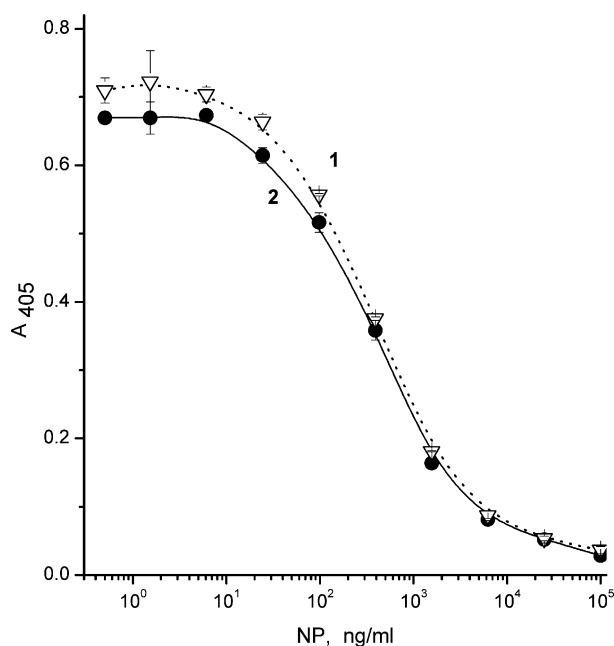


Fig. 4. Competitive curve for NP detection in spiked tap A water (1) in comparison with the data for deionized water (2).

The results of ELISA measurements correlate well with total values of chromatographically determined pollutants content data. The coefficient of correlation (r) was 0.88 for linear presentation of the data and 0.94 for logarithmic one. The values of the measured concentrations were higher in the ELISA that agreed with the absence of some compounds in the calculated content of surfactants based on chromatographic data. On the whole, the obtained results show that the proposed ELISA technique can be used for a group-specific monitoring of alkylphenolic non-ionic surfactants and their metabolites in water samples.

4. Conclusion

The preparation of immunogen by coupling of non-modified nonylphenol to protein carriers has been found to be an effective approach in the elaboration of immunodetection technique for non-ionic surfactants. The obtained set of reactants (antibodies + nonylphenol–protein conjugates) may be used for further development of different immunotechniques for surfactants detection. The developed ELISA allows to recognize specifically real surfactant compounds (in manufactured forms) and decomposition products such as alkylphenols, alkylphenoxyoxylates and their carboxylates. The new ELISA protocol was applied to the trace determination of non-ionic surfactants in wastewater samples. Although the ELISA and LC–MS/(MS) results did not completely correspond with each other, the order of magnitude could be estimated that allows to propose this ELISA as screening method for nonylphenols in WWTPs. In this respect, it can be used to decide whether a wastewater sample contains nonylphenols below or above a certain threshold limit value indicating the correct operation of the WWTP.

Acknowledgements

The investigations were supported by the INCO-Copernicus Program (contract # ICA2-CT-2001-10007 “Development of new express immunotechniques for pesticides and surfactants monitoring in water”), Russian Government

Program “Researches and Elaborations in the Priority Fields of Science and Technology” (contract # 43.073.1.1.2505 “Biocatalytic technologies for chemical synthesis, analytical systems and medicine”) and Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (PPQ2001-4954-CE). We thank Dr F. Ventura and A. Diaz, from AGBAR (Aigues de Barcelona, Spain) and Dr. A.A. Formanovsky, from Institute of Bioorganic Chemistry (Moscow, Russia) for the syntheses of nonylphenolic compounds used in this study. M. Petrovic acknowledges the “Ramon y Cajal” contract from the Spanish Ministry of Science and Technology. We thank Merck for supplying the SPE cartridges and LC columns.

References

- [1] A.M. Soto, H. Justicia, J.W. Wray, C. Sonnenstein, *Environ. Health Perspect.* 92 (1991) 167.
- [2] R. White, S. Jobling, S.A. Hoare, J.P. Sumpter, M.G. Parker, *Endocrinology* 135 (1994) 175.
- [3] C. Cox, *J. Pestic. Reform* 16 (1996) 15.
- [4] P.C. Lee, *Endocrine* 9 (1998) 105.
- [5] S.C. Laws, S.A. Carey, J.M. Ferrell, G.J. Bodman, R.L. Cooper, *Toxicol. Sci.* 54 (2000) 154.
- [6] V. Kyselova, J. Peknicova, D. Buckiova, M. Boubelik, *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1 (2003) 30.
- [7] A.-V. Requena, M. Petrovic, N. Garcia-Reyero, P.D. Hansen, A. Diaz, F. Ventura, D. Barcelo, B. Pina, *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (2004) 705.
- [8] M. Ahel, J. McEvoy, W. Giger, *Environ. Pollut.* 79 (1993) 243.
- [9] P. Knepper, D. Barcelo, P. de Voogt (Eds.) *Analysis and fate of surfactants in the aquatic environment*, Elsevier, Amsterdam, 2003, 51–392.
- [10] M.J. Lopez de Alda, S. Diaz-Cruz, M. Petrovic, D. Barcelo, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 503.
- [11] J. Tekel, J. Kovacicova, *J. Chromatogr. A* 643 (1993) 291.
- [12] J.W. Findlay, W.C. Smith, J.W. Lee, G.D. Nordblom, I. Das, B.S. de Silva, M.N. Khan, R.R. Bowsher, *J. Pharmacol. Biomed. Analysis* 21 (2000) 1249.
- [13] J.M. Van Emon, *J. AOAC Int.* 84 (2001) 25.
- [14] N.A. Lee, I.R. Kennedy, *J. AOAC Int.* 84 (2001) 1393.
- [15] S.A. Eremin, D.S. Smith, *Comb. Chem. High Throughput Screening* 6 (2003) 257.
- [16] S.I. Wie, B.D. Hammock, *Anal. Biochem.* 125 (1982) 168.
- [17] S. Fujimoto, Y. Goda, *Nippon Rinsho* 58 (2000) 2491.
- [18] M. Franek, J. Zeravik, S.A. Eremin, J. Yakovleva, M. Badea, A. Danet, C. Nistor, N. Ocio, J. Emneus, *Fresenius J. Anal. Chem.* 371 (2001) 456.
- [19] A. Rose, C. Nistor, J. Emneus, D. Pfeiffer, U. Wollenberger, *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 1033.
- [20] J. Yakovleva, J. Zeravik, I.V. Michura, A.A. Formanovsky, M. Franek, S.A. Eremin, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 83 (2003) 597.
- [21] M. Badea, C. Nistor, Y. Goda, S. Fujimoto, S. Doshio, A. Danet, D. Barcelo, F. Ventura, J. Emneus, *Analyst* 128 (2003) 849.
- [22] J. Zeravik, K. Skryjova, Z. Nevorankova, M. Franek, *Anal. Chem.* 76 (2004) 1021.
- [23] A.A. Mart'ianov, A.V. Zherdev, S.A. Eremin, B.B. Dzantiev, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* (2004), in press.
- [24] A. Diaz, F. Ventura, M.T. Galceran, *Anal. Chem.* 74 (2002) 3869.
- [25] M. Petrovic, A. Diaz, F. Ventura, D. Barcelo, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 4442.
- [26] I.V. Michura, A.A. Formanovsky, A.O. Nikitin, J.N. Yakovleva, S.A. Eremin, *Mendeleev Commun.* 5 (2000) 193.
- [27] K. Hirose, T. Akizawa, M. Yoshioka, *Anal. Chim. Acta* 365 (1998) 129.
- [28] M. Petrovic, A. Diaz, F. Ventura, D. Barcelo, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5886.
- [29] M. Petrovic, A. Diaz, F. Ventura, D. Barcelo, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14 (2003) 516.
- [30] P. Skladal, *Biosens. Bioelectron.* 14 (1999) 257.
- [31] B. Lu, E.I. Iwuoha, M.R. Smith, R. O'Kennedy, *Biosens. Bioelectron.* 12 (1997) 619.
- [32] Y. Goda, A. Kobayashi, K. Fukuda, S. Fujimoto, M. Ike, M. Fujita, *Water Sci. Technol.* 42 (2000) 81.
- [33] A. Marcomini, F. Filippuzzi, W. Giger, *Chemosphere* 17 (1988) 853.
- [34] F. Ventura, J. Caixach, A. Figueras, I. Espadaler, D. Fraisse, J. Rivera, *Water Res.* 23 (1989) 1191.
- [35] A. Di Corcia, R. Cavallo, C. Crescenzi, M. Nazzari, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 3914.

3.3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.-----

VALIDACIÓN DE INMUNO ENSAYOS ELISA MEDIANTE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Se han validado dos inmunoensayos ELISA para la determinación de compuestos alquilfenólicos en aguas y mediante el cálculo de los parámetros de calidad (límites de detección (LOD), concentración causante de inhibición del 50% de señal (IC_{50}), rango de trabajo, recuperaciones, estudios de reactividad cruzada, estudio del efecto de la matriz, etc).

El ensayo directo ELISA basado en anticuerpos monoclonales, ha permitido la detección conjunta de APs (NP + OP) y sus productos de degradación en muestras de aguas superficiales con un LOD de 6 ng/L y IC_{50} de 54-65 ng/mL, mientras que el ensayo indirecto ELISA basado en anticuerpos policlonales, ha permitido la detección conjunta de (APs + APEOs + APECs), ya que el uso de los Ac policlonales permite reconocer toda una familia de compuestos, con una sensibilidad de 10 ng/L y con IC_{50} de 246-291 ng/mL.

Comparando ambos estudios (ver tabla 3.2.) para la determinación del NP, cabe destacar que la sensibilidad del ensayo ELISA directo (LOD de 0.006 ng/mL) es mayor que la del ensayo ELISA indirecto (LOD de 0.010 ng/mL), además que este último es más inespecífico porque detecta el total de varios compuestos alquilfenólicos (APs + APEOs + APECs). Sin embargo, el análisis químico de la validación del ensayo ELISA indirecto (Martíanov y col., 2005) es más sensible, ya que se llevó a cabo con LC-MS/MS obteniendo LODs de 0.002 ng/mL para la determinación de NP, permitiendo determinar concentraciones de NP más bajas que el ensayo directo, que se validó mediante LC-MS con LODs de 0.07 ng/mL para NP.

Para llevar a cabo Programas de Vigilancia Ambiental, es más útil Ac específicos solo para NP, ya que este es el compuesto más estrogénico y persistente de los compuestos alquilfenólicos y por tanto son necesarios controles más rápidos y exhaustivos para determinar los niveles exactos de NP en el medioambiente. Por tanto, el ensayo ELISA Directo permite realizar una determinación del NP con mayor fiabilidad y de forma más sensible que el ELISA indirecto, ya que tiene un LOD inferior. Sin embargo, se ha demostrado que cuando OP es el único analito presente en la muestra, puede obtenerse un falso negativo, y por tanto este ensayo es particularmente útil para determinar NP únicamente o NP y OP en una muestra, tal y como se ha demostrado con el análisis de las 39 aguas superficiales del PVA en Portugal.

Por otra parte, el ensayo ELISA indirecto es más apropiado cuando se pretende determinar varios compuestos alquilfenólicos simultáneamente (en particular APs + APEOs + APECs), con subproductos de descomposición, ya que se han realizado estudios de reactividad cruzada y testado con diferentes tipos de matrices de agua, incluyendo aguas residuales, matriz más compleja.

✓ A continuación, se resumen las condiciones utilizadas en los dos ensayos ELISA validados y aplicados a muestras reales para la determinación del NP en la tabla 3.2.:

Tabla 3.2. Comparación de las principales condiciones y características analíticas de los dos inmunoensayos ELISA aplicados a muestras de agua y validados en esta tesis:

	Ensayo Directo ELISA (Céspedes y col., 2006)		Ensayo Indirecto ELISA (Martíanov y col., 2005)	
Ensayo ELISA	<p>Directo</p>		<p>Indirecto</p>	
Anticuerpos	Monoclonales (Mc)		Policlonales (Pc)	
Microplaca utilizada	Maxisorp (Nunc)		V.1: Med-polymer	V.2: Nunc
Cromógeno utilizado			V.1: ABTS	V.2: TMB
Trazadores	HRP (<i>Horsh rabbit peroxidase</i>)		HRP (<i>Horsh rabbit peroxidase</i>)	
Compuestos que determina ELISA	Total APs (NP + OP)		Total APEOs+APs (NP ₁ EO + NP ₂ EO + NP ₃₋₁₄ EO+ NP ₁ EC+ NP ₂ EC + NP)	
SPE	SPE-LiChrolut RP-18		SPE-C10 sílica	
Técnica analítica de validación	LC-MS (Céspedes y col., 2004)		LC-MS (Petrovic y col., 2001) LC-MS/MS (Petrovic y col., 2003)	
LOD – LC-MS (ng/mL)	LC-MS: 0.07 (NP) 0.06 (OP)		LC-MS: 0.010 (NP ₂ EO y NP ₃₋₁₄ EO) 0.025 (NP ₁ EO) LC-MS/MS: 0.002 (NP y NPECs)	
LOD – ELISA (ng/mL)	0.006 (NP+OP)		0.010 (APEOs+APECs+APs)	
IC ₅₀ (ng/mL)	54.1 – 65.0		V.1: 246	V.2: 291
Rango de trabajo	ELISA: 5-1000 LC-MS: 5-10000			
Recuperaciones (%)	ELISA: 51-117 LC-MS: 69-116 (NP) y 67-80 (OP)			
Coefficiente de correlación (R ²)	R ² = 0.924 (n=39)		R ² = 0.94	
Reactividad cruzada Compuestos testados	Ác. 9-OHPH nonanoico > 4n-OP >> p-etil fenol > p-metil fenol > 4 NP Técnico > 4- tert-OP > ác.3-p-OHPH propiónico > ác. P- hidroxibenzoico > p-OHPH (Zerávik y col., 2004)		NP ₂ EC > NP ₁ EO > NP ₂ EO > NP ₉₋₁₀ EO > > NP ₁ EC > p-tert-OP > 4n-NP	
Matrices analizadas	Agua superficial		Agua superficial, residual y agua de grifo	
Conc (µg/L o ng/mL) Muestras agua ELISA vs LC-MS	ELISA: Total APs Agua superf: 0.08-6.86	LC-MS: Suma APs Agua superf: 0.11-6.68	ELISA: Total APEOs + APs Agua grifo: 2.85 Inf.EDAR: 49.57-359.8 Efl. EDAR: 7.14-37.13	LC-MS: Suma APEOs+APs Agua grifo: 0.10 Inf. EDAR: 6.2-199.5 Efl. EDAR: 3.29-4.70

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

El ensayo ELISA inmunoenzimático aplicado fue desarrollado previamente por Zerávik y colaboradores (Zerávik y col., 2004) con antiserum policlonal y anticuerpos monoclonales. En este estudio realizaron la optimización de los distintos parámetros y el estudio de la reactividad cruzada con distintos compuestos. Este ensayo inmunoenzimático permite obtener un límite de detección de 10 ng/mL (incluyendo la etapa de preconcentración), y una IC_{50} de 11,5 ng/mL para el 4-NP.

Con el objetivo de validar el ensayo directo ELISA desarrollado por Zeravik y col, se calcularon diversos parámetros de calidad utilizando muestras fortificadas, tal y como se describe en el artículo científico (Céspedes y col., 2006), cuyos resultados pueden verse en la tabla 3.2.

Comparación de ELISA directa con LC-MS: En la figura 3.3., se muestra la comparación de los resultados obtenidos mediante ELISA (concentración total de NP y OP, es decir, NP+OP) y LC-MS (detección individual de NP y OP).

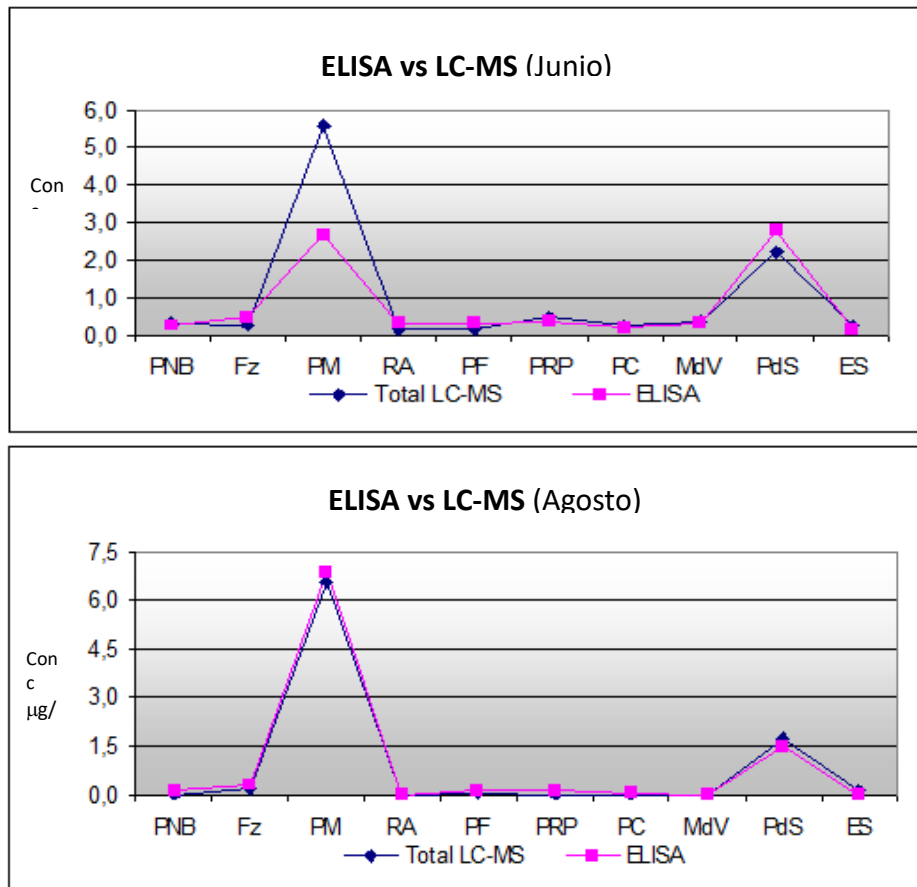


Fig 3.1. Variación de concentraciones ($\mu\text{g/L}$) obtenidas mediante ELISA (concentración total NP+OP) vs suma de las concentraciones individuales de NP y OP obtenidas por LC-MS, correspondiente a abril, mayo, junio y agosto de 2001 en 10 ríos en Portugal.

Las concentraciones más elevadas de NP durante los 4 meses analizados se detectaron en junio y agosto, en los puntos de muestreo 3 y 9, correspondientes a Ponte Moreira (PM) y Ponte do Sacavem (PdS) respectivamente, con actividad industrial y agrícola tal y como veremos en el capítulo 4 sobre el PVA llevados a cabo en Portugal. Las concentraciones detectadas fueron 5.58 y 6.41 $\mu\text{g/L}$ (LC-MS) vs 2.71 y

6.86 $\mu\text{g/L}$ (ELISA) en PM y 2.07 y 1.73 $\mu\text{g/L}$ (LC-MS) vs 2.80 y 1.50 $\mu\text{g/L}$ (ELISA) en PdS. Se observa como los niveles son bastante similares, obteniendo por tanto una buena correlación entre ambas técnicas [$R^2=0.924$ para $n=39$]. ELISA es una técnica que habitualmente tiende a sobreestimar los niveles de compuestos presentes en las muestras (Estévez y col., 2004), En algunos casos hay una sobreestimación de la concentración mediante ELISA, especialmente para altas concentraciones, mientras que en Ponte Moreira en junio se obtuvieron niveles inferiores con el ensayo ELISA que con LC/MS.

En total se obtuvieron 4 falsos positivos, es decir, la probabilidad que el ensayo ELISA clasificara las 4 muestras como positivas cuando realmente eran negativas según LC-MS. Sin embargo, esto no constituye un problema importante en los inmunoensayos, ya que éstos son propuestos como técnicas de *screening* o cribado previo para reducir el tiempo y coste de los análisis posteriores mediante técnicas analíticas más caras y sensibles. Por tanto, los resultados positivos son posteriormente analizados y/o contrastados mediante una técnica analítica, LC-MS en este caso, para confirmar o rechazar los resultados positivos obtenidos.

Sin embargo, la probabilidad de que el ensayo clasifique las muestras como negativas cuando realmente son positivas, son más críticos. Solamente se produjo un falso negativo, en el cual el ensayo ELISA no detectó los 0.12 $\mu\text{g/L}$ de OP detectado mediante LC-MS. Este ensayo ELISA ha sido desarrollado para la determinación de NP, por lo cual, aunque también pueda detectar OP, si no hay NP en la muestra analizada, este ensayo puede no detectar el OP (especialmente si se trata de una concentración baja como en este punto). En la figura 3.2 que muestra el porcentaje de las concentraciones de NP y OP obtenidas mediante LC-MS y ELISA respectivamente, se observa que la proporción de OP detectado mediante LC-MS es muy pequeña en comparación a la de NP, lo cual minimiza la probabilidad de darse falsos negativos con este ensayo directo ELISA.

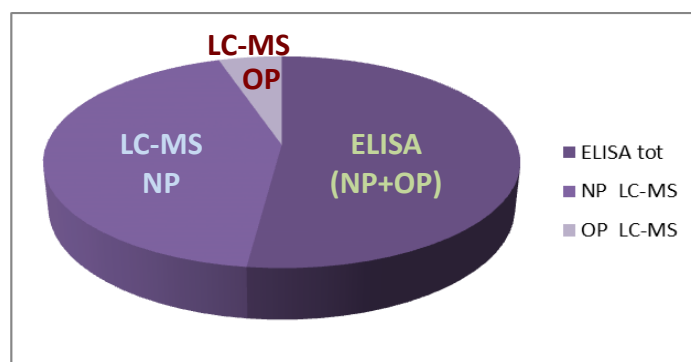


Fig 3.2. Variación de concentraciones ($\mu\text{g/L}$) obtenidas mediante ELISA (concentración total NP+OP) vs suma de las concentraciones individuales de NP y OP obtenidas por LC-MS, correspondiente a Abril, Mayo, Junio y Agosto de 2001 en 10 ríos en Portugal.

Pasquet y col., (2011) han investigado la aplicación del inmunoensayo ELISA a suelos, y diversas matrices de aguas (residuales, subterráneas y superficiales) para la determinación de los APs nonilfenol y octilfenol y validaron el método mediante la comparación de los resultados obtenidos mediante ELISA y LC-MS/MS (Pasquet y col., 2011). Las concentraciones obtenidas mediante ELISA y LC-MS/MS, fueron

generalmente del mismo orden de magnitud. Sin embargo, ELISA tendió a sobreestimar los valores obtenidos en suelos y a subestimar los valores en aguas, con concentraciones muy similares en aguas subterráneas y de canal, pero con mayor diferencia en aguas del lago o del efluente de EDAR analizados (Pasquet y col., 2011).

En la figura 3.3., correspondiente a los niveles detectados en los ríos de Portugal durante el mes de abril 2001, se observa claramente la mayor proporción de NP en las muestras y la buena correlación entre los datos obtenidos mediante el ensayo ELISA y LC-MS, observando una ligera sobre-estimación en ELISA para los puntos 1 y 7 correspondientes a Ponte Nova Barcelós y a Praia Coruche.

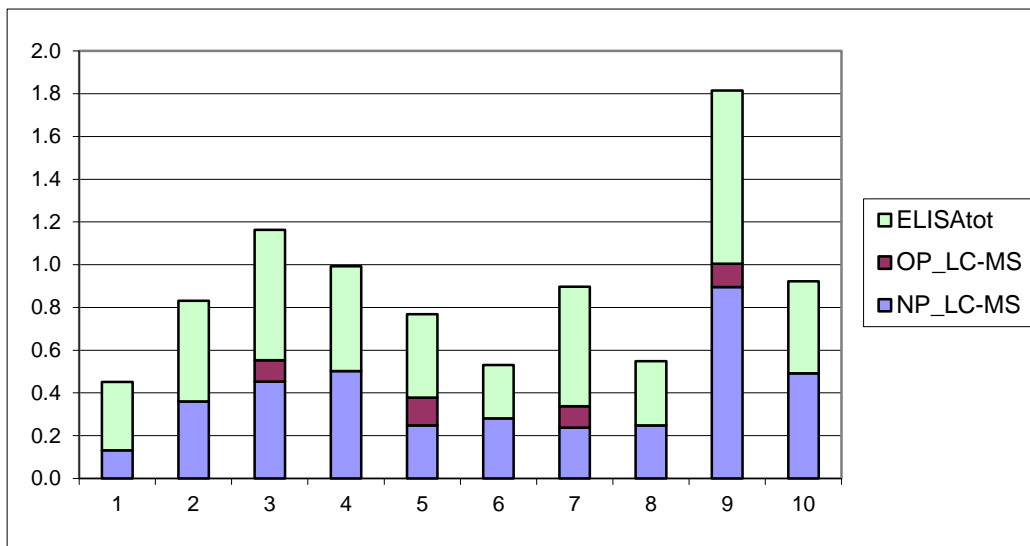


Figura 3.3. Concentraciones totales ($\mu\text{g/L}$) obtenidas, suma de NP y OP mediante LC-MS y ELISA, en cada muestra de agua en los 10 puntos seleccionados en Portugal, correspondiente a abril de 2001.

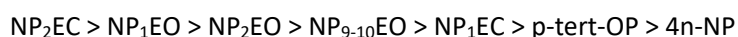
En conclusión, en la validación del ensayo directo ELISA mediante comparación con los resultados de LC-MS, se ha obtenido una buena correlación en la mayoría de las muestras analizadas por ambas técnicas, y se ha demostrado la utilidad de este ensayo ELISA como técnica de *screening* o cribado, con una etapa previa de pre-concentración de la muestra, obteniendo así resultados de forma más rápida y económica, para confirmar posteriormente los resultados positivos mediante LC-MS.

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

Con el objetivo de validar el inmunoensayo indirecto ELISA (Mart'ianov y col., 2005), para la determinación de NP y OP en muestras de aguas superficiales y residuales mediante comparación con LC-MS(MS), se determinaron los siguientes parámetros (cuyos valores obtenidos pueden verse en la tabla 3.2.):

Se obtuvo un LOD de 10 ng/mL. Si observamos los LODs de los diversos ensayos inmunoquímicos llevados a cabo en el mismo periodo para la determinación del NP (ver la tabla 3.1), vemos que en general se han obtenido un LOD más sensible para la determinación del NP, siendo el mismo valor que el obtenido por Goda y col., LOD de 10 ng/mL. (Goda y col., 2000). Como ejemplo, el kit comercial de ELISA Takeda obtuvo peor sensibilidad, con una IC₂₀ de 70 ng/mL (Goda y col., 2000). Determinando el perfil de precisión al rango de concentración bajo y seleccionando la concentración a la que se obtiene el 50% de CV, se obtuvo una IC₅₀ de 246 y 291 ng/mL

A continuación, se muestran curvas competitivas de reactividad cruzada (RC) de los compuestos alquilfenólicos estudiados (figura 3.4) con los correspondientes valores de IC obtenidos. La tendencia general observada es la disminución de RC a medida que aumenta la longitud de la cadena alquílica (ver tabla 2 del artículo Mart'ianov y col., 2005). Por tanto, los valores de RC obtenidos fueron:



Por tanto, los bajos valores obtenidos en la evaluación de la reactividad cruzada, aseguran la ausencia de interacciones no específicas en el curso del análisis de muestras medioambientales. Estos valores han sido expresados en unidades molares, las cuales reflejan afinidad de los anticuerpos a diferentes compuestos en términos de su estructura molecular. Dado que las mezclas técnicas de surfactantes no-iónicos contienen predominantemente isoformas de APs ramificados, no se requiere el reconocimiento de NP lineal para caracterizar el grado de contaminación.

Adicionalmente, en una colaboración con *the National Academy of Sciences of Belarus, Experimental Production Company of the Institute of Bio-organic Chemistry, Minsk, Belarus*, se aplicó un método ELISA Indirecto establecido mediante la optimización y modificación de algunos parámetros o condiciones del ensayo ELISA previamente desarrollado por Mart'ianov utilizando también anticuerpos policlonales (Mart'ianov et al., 2005). El objetivo de este estudio fue la validación del ensayo ELISA para la determinación del 4-NP mediante su aplicación a distintas matrices de agua (aguas de consumo, de lluvia, superficiales y residuales de la cuenca del río Llobregat) y la comparación de resultados obtenidos con LC-MS vs el ensayo inmunoenzimático. A continuación, se muestran las curvas ELISA obtenidas (Figura 3.4.) y los valores de concentración de diversas muestras reales analizadas mediante LC-MS y ELISA.

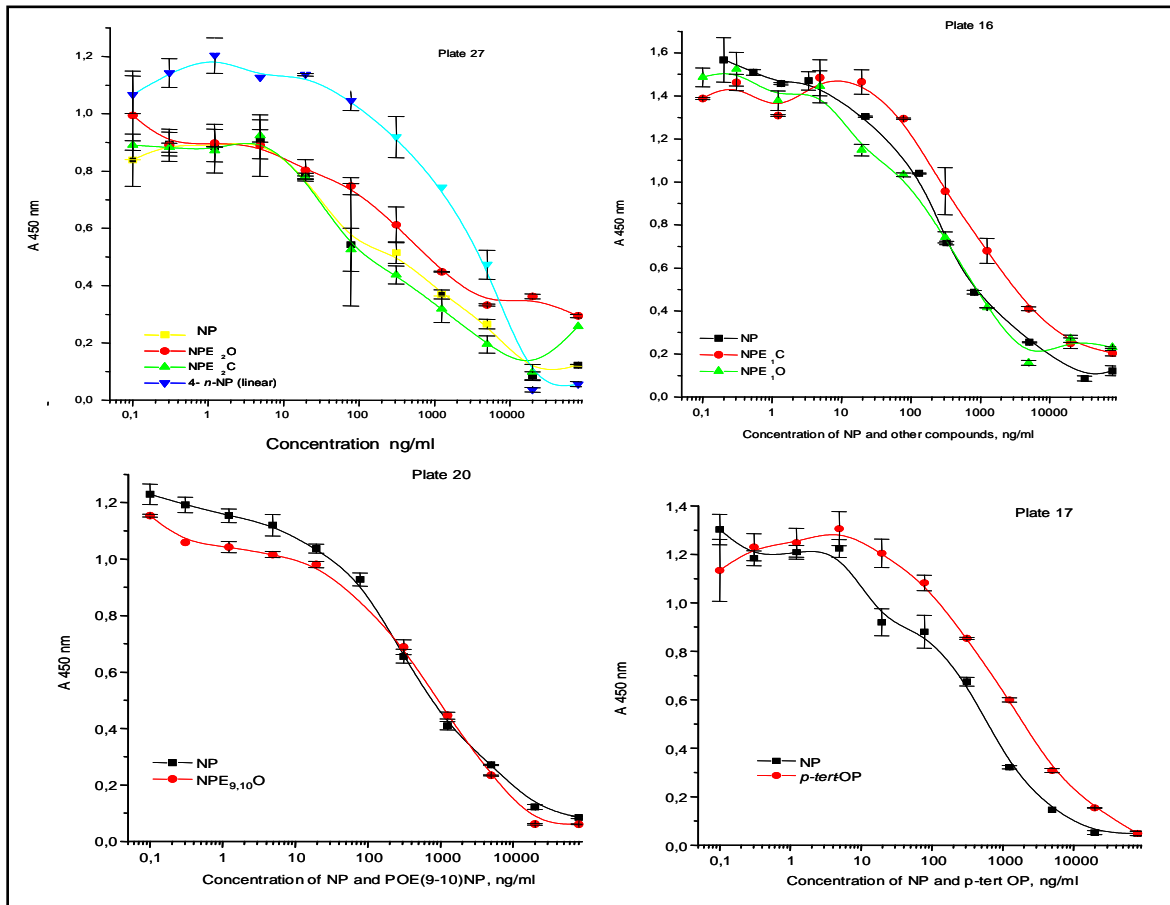


Figura 3.4. Curvas competitivas de reactividad cruzada de NP con otros compuestos alquilfenólicos; (a) NP con NPE₂O, NPE₂C y 4n-NP, (b) NP con NPE₁O y . NPE₁C, (c) NP con NPE₉₋₁₀O y (d) NP con p'tert-OP

Tabla 3.3. Valores de IC₂₀, IC₅₀ y IC₈₀ obtenidos en los estudios de reactividad cruzada de NP respecto a APs y APEOs

Compuesto	IC ₂₀	IC ₅₀	IC ₈₀
NP	25.2	350.4	4878.6
NPE ₂ C	18.9	110.8	649.6
NPE ₂ O	28.1	260.5	2415.0
4n-NP (lineal)	525.5	3032.0	17494.3
NP	40.9	259.7	1648.9
NPE ₁ O	23.1	165.9	1194.0
NPE ₁ C	140.7	686.8	3352.8
NP	41.1	403.4	3960.8
NPE ₉₋₁₀ O	73.5	738.3	7410.5
NP	22.4	253.6	2873.8
p-tert-OP	164.1	1031.8	6485.6

Análisis de muestras reales: para validar el ensayo ELISA, se analizaron diversas matrices de agua en paralelo mediante LC-MS y ELISA y se compararon los resultados obtenidos con ambas técnicas. Se analizaron una muestra de agua de mar, una de lluvia, 3 muestras de aguas superficiales y 8 muestras de aguas residuales correspondientes a los influentes y efluentes de 4 EDARs de la cuenca del Llobregat.

En la figura 3.5 se muestran ejemplos de las curvas de respuesta obtenidas mediante ELISA en el análisis de las muestras de (a) aguas superficiales correspondientes a la Riera de Rubí y (b) afluente y efluente respectivamente de las depuradoras de Manresa y Tarrasa, con los valores de concentración, IC_{20} , IC_{50} y IC_{80} obtenidos para cada muestra. En las tablas adjuntas se incluyen las concentraciones (ng/mL) detectadas mediante análisis por LC-MS (compuestos alquilfenólicos individuales) y ELISA (determinación conjunta) respectivamente.

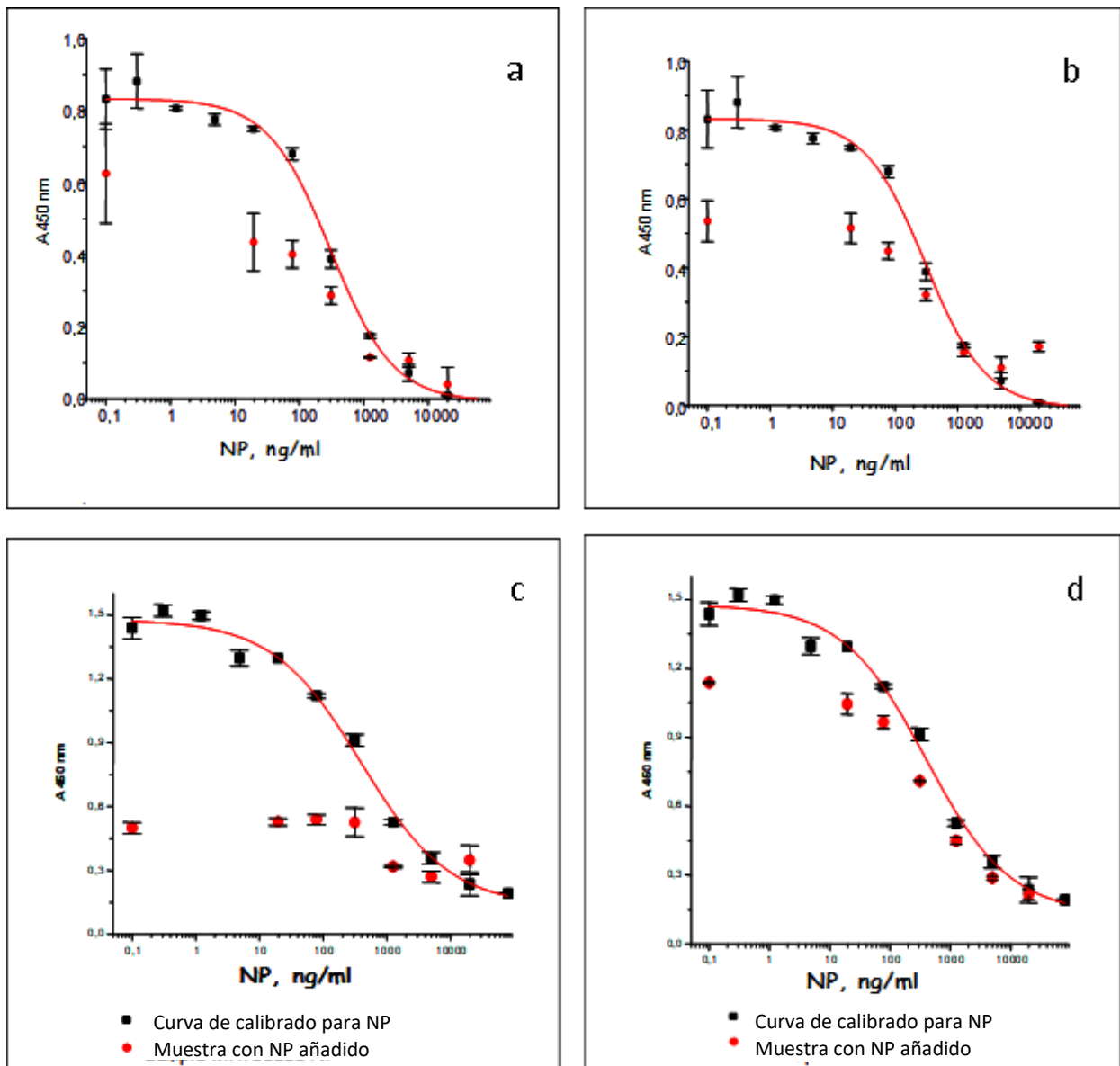


Figura 3.5. Curvas ELISA obtenidas con las muestras de la entrada y salida de la EDAR de Manresa (a y b) y de la EDAR de Tarrasa (c y d), con sus correspondientes curvas de calibración.

Tabla 3.4. Concentraciones (ng/mL) detectadas mediante LC-MS y ELISA en las muestras de agua:

Punto muestreo	LC-MS (ng/mL)						ELISA (ng/mL)	
	OP	NP	NPE ₁ O	NPE ₂ O	NPE ₆ O	Suma	Conc.	IC ₂₀
Riera Rubí	21.89	37.34	6.87	3.17	1.48	70.75	150	65.4
Manresa Inf.	0.18	17.06	19.33	5.56	48.96	93.09	100	65.4
Manresa Ef.	nd	2.99	9.53	8.97	46.19	67.68	180	65.4
Tarrasa Inf.	0.08	29.77	nd	bdl	9.77	39.62	2000	43.2
Tarrasa Ef.	nd	0.80	10.59	9.69	15.28	36.36	70	43.2

La planta depuradora de Manresa trata las aguas de las redes de cloacas de Manresa, Sant Joan de Vilatorrada y Callús y vierte sus aguas depuradas en el río Cardener, afluente del Llobregat. En el periodo en el que se tomaron las muestras, las EDARs recibían y trataba un caudal diario de 53.5 m³/s

Tal y como puede observarse en la tabla 3.4., comparando los niveles detectados mediante ELISA con la suma de los compuestos determinados por LC-MS, en la entrada de la EDAR de Manresa son similares mientras que en la EDAR de Tarrasa el valor obtenido con ELISA es mucho mayor en la entrada, y disminuyen bruscamente en el efluente, reflejando el comportamiento del NP en la EDAR, con concentración superior en la entrada (Conc= 29.77 ng/mL) y bastante inferior en el efluente (Conc= 0.80 ng/mL), debido probablemente a la degradación del NP en el proceso de depuración pero principalmente a su adsorción en el fango. El resto de compuestos nonilfenólicos determinados mediante LC-MS en cambio, especialmente NPE₁O y NPE₂O, tienen mayor concentración en el efluente, de forma que la suma total de todos los compuestos determinados mediante LC-MS es similar.

La conclusión de la validación del ensayo indirecto ELISA mediante LC-MS es que se ha obtenido una buena correlación en la mayoría de las muestras analizadas por ambas técnicas, y se ha demostrado que la aplicación de este ensayo es válida tanto en muestras de aguas superficiales como en aguas residuales, matriz más compleja, pudiendo ser utilizado para decidir si una muestra de agua residual contiene nonilfenol por debajo o encima de un cierto límite umbral. Por tanto, se confirma también la utilidad de este ensayo indirecto ELISA como técnica previa de *screening* o cribado, tras realizar una etapa previa de pre-concentración de la muestra mediante SPE, con el consiguiente ahorro en tiempo y coste en llevar a cabo el análisis, para confirmar posteriormente los resultados positivos mediante una técnica analítica más sensible, como LC-MS(MS).

A continuación, se incluye un esquema del procedimiento analítico realizado (a) Filtración y extracción de la muestra, (b) validación del inmunoensayo ELISA vs LC-MS(MS) y se incluye el procedimiento propuesto (c) en base a los estudios realizados y los resultados obtenidos en esta tesis doctoral:

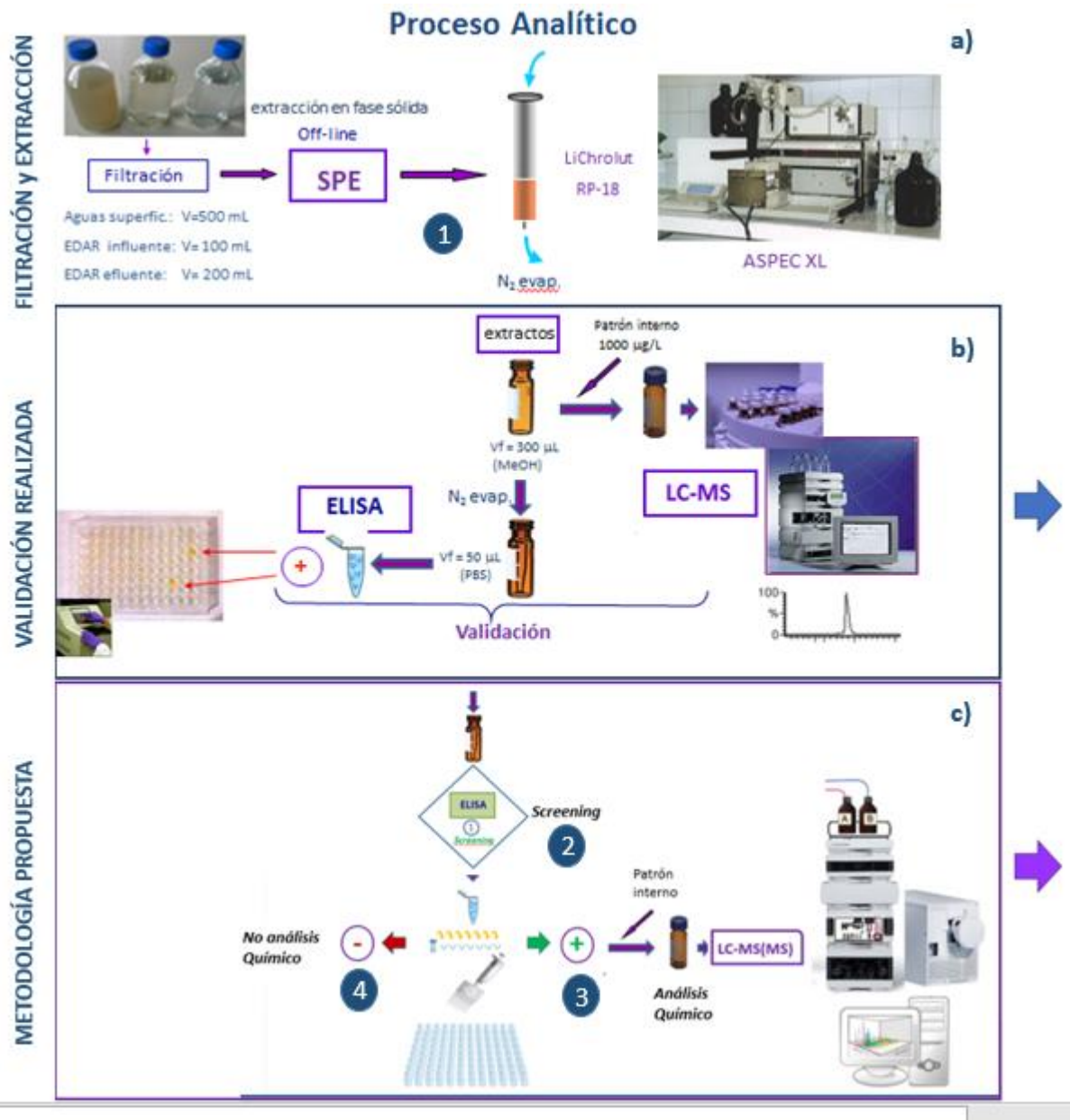


Figura 3.6. Procedimiento analítico realizado (b) y propuesto (c) para realizar un *screening* de las muestras mediante ELISA y análisis posterior de las muestras positivas mediante LC-MS(MS).

En conclusión, el procedimiento analítico propuesto es el siguiente:

- (1) Filtrar y extraer la muestra mediante SPE para preconcentrarla y eliminar los analitos interferentes
- (2) Analizar las muestras de agua mediante el ensayo inmunoenzimático ELISA, para realizar un *screening* previo para determinar cuáles contienen APS y/o APEOs (en este caso NP).
- (3) Identificar las muestras positivas (es decir, aquellas en las que el inmunoensayo detecte la presencia de APs y/o APs+APEOs), y realizar un análisis confirmatorio mediante LC-MS(MS) únicamente de estas muestras para determinar las concentraciones individuales de cada uno de los compuestos y confirmar los niveles detectados. De esta forma, si se ha producido un falso positivo, confirmaremos por LC-MS (MS) que los compuestos no están realmente en la muestra.
- (4) Descartar las muestras negativas (es decir, en aquellas en las que los ensayos ELISA no detectan los APs y/o APs+APEOs), evitando analizarlas mediante técnicas analíticas más sensibles como LC-MS/MS, con el consiguiente ahorro en tiempo y coste que conlleva. Aunque los falsos negativos son

más críticos, porque al no haber detectado por ELISA la presencia de NP en la muestra, no es analizada posteriormente mediante LC-MS(MS), y por tanto comporta un error en la determinación, tal y como hemos visto en la validación, la probabilidad de darse un falso negativo es muy baja.

3.4. CONCLUSIONES .-----

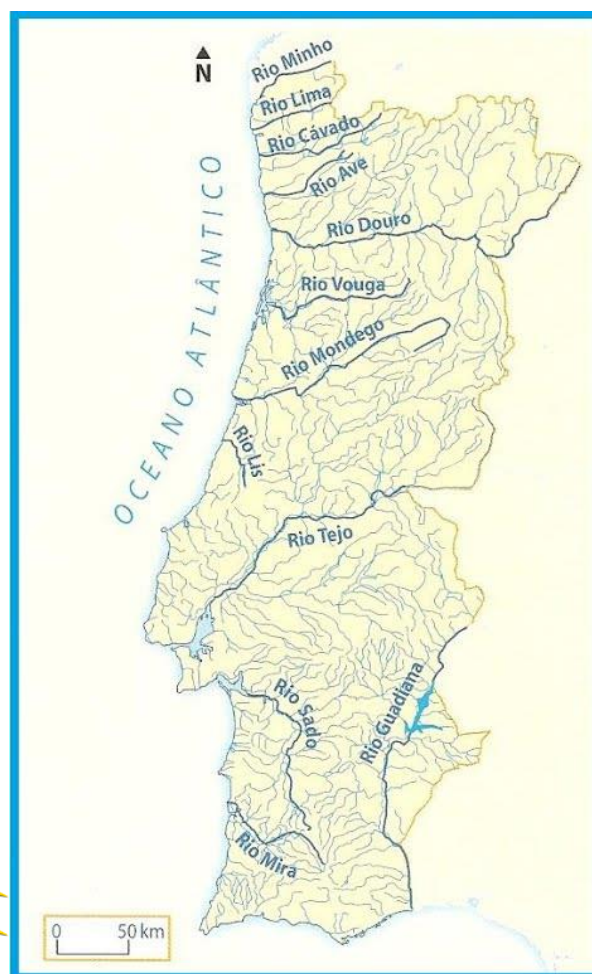
En conclusión, las validaciones de los dos inmunoensayos ELISA llevadas a cabo ha sido satisfactoria, y por tanto los ensayos ELISA validados proporcionan un procedimiento simple, rápido, sensible y fiable para determinar la presencia de nonilfenol en muestras de agua:

- (1) El ensayo directo ELISA, con Ac monoclonales, ha permitido la detección conjunta de los APs (NP y OP) con un LOD de 6 ng/L
- (2) El ensayo indirecto ELISA con Ac policlonales ha permitido la detección conjunta de APEOs + APECs + APs, con un LOD de 10 ng/L
- (3) Se han obtenido resultados satisfactorios de los parámetros de calidad (LOD, IC₂₀, IC₅₀, rango de trabajo y recuperaciones, con sensibilidad de los ensayos de IC₅₀, = 54-65 y 246-291 ng/mL respectivamente para los ensayos directo e indirecto.
- (4) Se han realizado estudios de reactividad cruzada que han demostrado que los ensayos ELISA pueden determinar el nonilfenol, y adicionalmente otros productos de degradación.
- (5) Se ha demostrado la aplicabilidad de los ensayos ELISA en diversas matrices de agua, mediante el estudio del efecto matriz en aguas superficiales, residuales y de grifo.
- (6) La comparación de los resultados obtenidos del análisis en paralelo de diversas matrices de agua mediante LC-MS (determinación de la concentración individual de cada uno de los compuestos a determinar) y los ensayos ELISA (determinación conjunta de APs (NP+OP) y/o de APs+APEOs, según se trate del ensayo ELISA directo o indirecto validados respectivamente) ha sido satisfactoria.

Por tanto, se han estudiado las principales limitaciones del inmunoensayo ELISA, la reactividad cruzada y el efecto matriz de las muestras, obteniendo resultados satisfactorios para ambas. En conclusión, los ensayos ELISA validados proporcionan un procedimiento simple, rápido, sensible y fiable para determinar la presencia de nonilfenol en un gran número de muestras de agua, muy útil para su aplicación en Programas de Vigilancia Ambiental.

CAPÍTULO 4

PROGRAMA DE VIGILANCIA AMBIENTAL EN PORTUGAL



4. PROGRAMA DE VIGILANCIA AMBIENTAL EN PORTUGAL

4.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS -----

Los ríos transfronterizos representan el 60% del territorio de la Unión Europea, siendo muy relevante en la Península Ibérica, donde España y Portugal comparten 5 ríos, el Miño, el Limia, el Duero, el Tajo y el Guadiana (en portugués Minho, Lima, Douro, Tejo y Guadiana), cuyas cuencas cubren un área de 268 500 km², de la cual el 21% pertenece a Portugal y representan el 65% del territorio portugués. Alrededor del 95% de esta área está ocupada por las cuencas de los ríos Duero, Tajo y Guadiana (Maia, 2006a). Las cuencas compartidas de los ríos Portugueses-Españoles tienen varias características y hay una gran desigualdad interanual de precipitaciones, que causan frecuentes episodios de flujos extremos, con largas sequías y extraordinarias riadas e inundaciones.

Para evaluar la actividad estrogénica en el medio acuático de las aguas superficiales y sedimentos en los ríos seleccionados en Portugal, se llevaron a cabo 2 Programas de Vigilancia Ambiental (PVA):

- (1) Programa de Vigilancia Ambiental para la determinación de plaguicidas para dar cumplimiento a la Directiva 76/464/CE. Toma de muestras mensual de abril 1999 a mayo 2000. Determinación de plaguicidas (compuestos orgánicos semivolátiles) en 644 muestras de agua tomadas en 46 puntos de muestreo mediante SPE seguida de GC-EI-MS y/o LC-APCI-MS para detectar compuestos más polares. Con la gran cantidad de datos generados en el marco de esta tesis, se realizó el análisis quimiométrico de los datos obtenidos.
- (2) Programa de Vigilancia Ambiental para la determinación de compuestos disruptores endocrinos para dar cumplimiento a la Directiva 2000/60/CE. Evaluación de la actividad estrogénica total en las muestras mediante el ensayo de Levaduras Recombinantes (RYA). Correlación y análisis quimiométrico de los datos obtenidos mediante LC-MS y RYA.

A continuación, se describen ambos PVA, la determinación química de los EDCs y de la estrogénicidad mediante RYA, y el análisis quimiométrico de los datos generados (ver ANEXO 4).

4.1.1. CUENCAS DE LOS RÍOS Y PUNTOS DE MUESTREO ESTUDIADOS

A continuación, se describen brevemente las características de las cuencas de los ríos de norte a sur, en las que se han determinado los EDCs estudiados en el PVA en Portugal en esta tesis:

En el Noroeste de la Península Ibérica se sitúan los ríos con origen en España, el Miño, el más largo de Galicia con una longitud de 350 km y una amplia cuenca de 12.486 km² cuyo último tramo forma la frontera entre España y Portugal y el río Lima, con una cuenca bastante inferior pero que ha sido estudiado en algunos estudios (Rocha y col., 2013; Rocha y col., 2014b).

La cuenca hidrográfica del río Cávado (1.589 km²), limita al norte con la cuenca del río Lima y al este y al sur, con las cuencas de los ríos Duero y Ave. Se han determinado EDCs en esta tesis en el punto de muestreo de Ponte Nova Barcelós (PNB), ubicado en un área con actividad agrícola y en posteriores estudios (Rocha y col., 2013).

El río Ave nace en Portugal y su cuenca (1.390 km²) fluye a través de una zona agrícola en las áreas más urbanizadas e industrializadas del distrito de Porto y tiene pocas EDARs, presentando alta contaminación debido a los vertidos industriales y domésticos. Ha sido objeto de estudio en el PVA de esta memoria Formariz (Fz), ubicado en una zona de contaminación textil, y en otros estudios (Rocha y col., 2013; Rocha y col., 2013d).

El río Leça, situado en el Norte de Portugal, recibe efluentes de varias industrias y agua residual municipal, y su estuario es un importante puerto internacional, con embarcaciones mercantes, veleros de pesca y una terminal de aceite. Debido a la fuerte presión antropogénica de la zona estudiada, las autoridades Portuguesas han considerado este río como uno de los más contaminados en el Norte de Portugal (Rocha y col., 2012b). En el río Leça, cerca de la ciudad de Porto, está Ponte Moreira (PM).

El río Duero fluye 900 km desde su origen en España hasta su estuario en Porto y tiene una gran cuenca de ~98.000 km² con 51 presas en su recorrido. Pasa por diferentes zonas, que incluyen áreas muy pobladas, industriales, campos agrícolas, etc, que contribuyen a su contaminación con vertidos de efluentes de EDARs a su paso. Estudios que han determinado insecticidas (Ferreria y col., 2002) BPA y otros contaminantes (Almeida y col., 2007) en el Duero, establecen este estuario como muy contaminado. Se han realizado diversos estudios para determinar EDCs en su cuenca en Portugal (Ribeiro y col., 2009b; Rocha y col., 2012a; Rocha y col., 2013; Rocha y col., 2013a). Sin embargo, en el PVA llevado a cabo en esta tesis no se incluyó ningún punto de muestreo ubicado en esta cuenca, porque en el PVA realizado anteriormente, no se detectaron niveles altos de los pesticidas y EDCs analizados.

En el estuario del río Aveiro, como se conoce al estuario del río Vouga, hay presencia de varias industrias y actividades agrícolas. Esta zona de la costa portuguesa proporciona condiciones naturales para ser un puerto con embarcaciones de navegación y recreo y es un sitio de vertidos de residuos domésticos e industriales. El aumento de densidad de población alrededor de la laguna ha incrementado la presión antropogénica, produciendo varios problemas medioambientales y de contaminación, contribuyendo a la disminución de su calidad del agua (Lopes y col., 2005). Uno de los puntos de muestreo del PVA llevado a cabo en Portugal en esta tesis es Ría Aveiro (RA), en el río Vouga. Posteriormente, se han realizado diversos estudios sobre EDCs en este estuario (Jonkers y col., 2010; Sousa y col., 2010; Rocha y col., 2015b; Rocha y col., 2016).

El río Mondego, ubicado en la costa Portuguesa Atlántica Oeste, fluye desde la montaña más alta continental de Portugal hasta el Océano Atlántico. Durante su recorrido de 227 km, atraviesa zonas rurales y altamente industrializadas y urbanizadas antes de llegar al estuario (1,600 ha), notablemente contaminado (Ferreira y col., 2004). El estuario presenta actividad pesquera en el norte y aportaciones de aguas residuales y nutrientes en el sur. Sus principales fuentes de contaminación son vertidos de EDARs en su cuenca y distintos tipos de industrias y escorrentía agrícola. Adicionalmente, se producen vertidos directos de agua residual sin tratamiento (Ferreira y col., 2003), en algunos casos procedentes de granjas de pollos y ganado. La contaminación en esta zona ha ido aumentando en la última década por el incremento de eutrofización (Ferreira y col., 2004) y la disminución de biodiversidad acuática. Está dividido en 2 partes que divergen 7.5 km río arriba de la desembocadura y tienen distintas características hidrográficas (Ribeiro y col., 2009a; Rocha y col., 2014a). Ponte Formoselha (PF) está ubicado cerca de la desembocadura del río en el Océano Atlántico.

El Tajo es el río es el más largo de la Península Ibérica (1038 km). Nace en la Serranía de Albarracín en España, país en el que se localiza su cuenca principalmente (716 km). Pasa cerca de Madrid y fluye entre ambos países (47 km) y finalmente en Portugal (275 km), donde desemboca en el Océano Atlántico cerca de Lisboa, la ciudad más importante en el margen del río Tajo. Debido a la dimensión del río y su enorme cuenca (ca. 80,100 km²), pasa a través de muchas regiones que incluyen áreas altamente habitadas, polos industriales y amplios campos agrícolas los cuales, son potenciales fuentes de contaminación. Lisboa y el resto de ciudades en la zona de su desembocadura constituyen una importante área metropolitana (distrito de Lisboa) con alrededor de 2 millones de habitantes, un puerto importante y grandes complejos industriales, como los que producen químicos, artículos metalúrgicos y derivados alimentarios. Por tanto, el estuario del Tajo, uno de los más grandes de la costa oeste de Europa, está sujeto a una gran presión antropogénica (Mauricio y col., 2006; Rocha y col., 2015a). En el PVA realizado en Portugal en esta tesis se han incluido varios puntos de muestreo en la cuenca del río Tajo: Ponte Ribeira de Pernes (PRP) en el afluente Alviela, Praia de Coruche (PC) y Ponte de Sacavem (PdS) en el afluente Trancao y Estero Seixal (ES), cerca de Lisboa y de la desembocadura del Tajo.

Ubicados en el suroeste de Portugal, y fluyendo de sur a norte se encuentran los ríos Sado, con una longitud de 180 km y una cuenca de 7640 km² y actividad antropogénica, (Ribeiro y col., 2009c; Rocha y col., 2013b) y el río Mira con una cuenca 1600 km² (Rocha y col., 2016).

Finalmente, el río Guadiana, con una longitud de 778 km, constituye el tercer río más largo de la Península Ibérica. Fluye desde España y en su último tramo bordeando Portugal. Su cuenca cubre 66.800 km², de los cuales tan solo 11.580 km² (17%) pertenecen a Portugal. Su explotación es principalmente de agua subterránea y un gran número de pequeños sistemas de abastecimiento. Los principales problemas de esta cuenca son la sobreexplotación de los acuíferos en la parte alta de su cuenca, para las amplias extracciones para el uso agrícola, la contaminación agrícola y la fragmentación por diversas presas. Hay un deterioro en la calidad del agua del río Guadiana, principalmente por los vertidos directos de agua residual doméstica e industrial que se produjeron en su cuenca. Tiene inviernos lluviosos y veranos secos y calurosos y es uno de los ríos más afectados por las sequías. En su cuenca se concentran algunas de las municipalidades más pobres de Portugal, asociando la falta de disponibilidad de agua con indicadores de pobreza. El punto de muestreo Monte de Vinha (MdV), en el que se detectaron altos valores de plaguicidas en el anterior PVA realizado, está ubicado en la zona transfronteriza entre ambos países y por tanto la contaminación detectada en este punto proviene de España.

Puntos de muestreo: De los 46 puntos de muestreo seleccionados en el primer PVA relativo a la D. 76/464/CE (ver Tabla 1 de (Tauler y col., 2001)), 27 tienen actividades agrícolas principalmente, 13 incluyen actividades agrícolas e industriales y solamente 6 puntos tienen un origen predominantemente industrial. Respecto a los 10 puntos de muestreo seleccionados en el segundo PVA (D. 2000/60/CE), solamente 2 tienen como actividad principal la agrícola, 5 engloban ambos tipos de actividades y 3 tienen actividad industrial textil predominante (Portos, Formariz y Ponte Moreira, en el norte de Portugal). En la figura 4.1. se incluye la ubicación de los diversos puntos de muestreo en el mapa de Portugal:

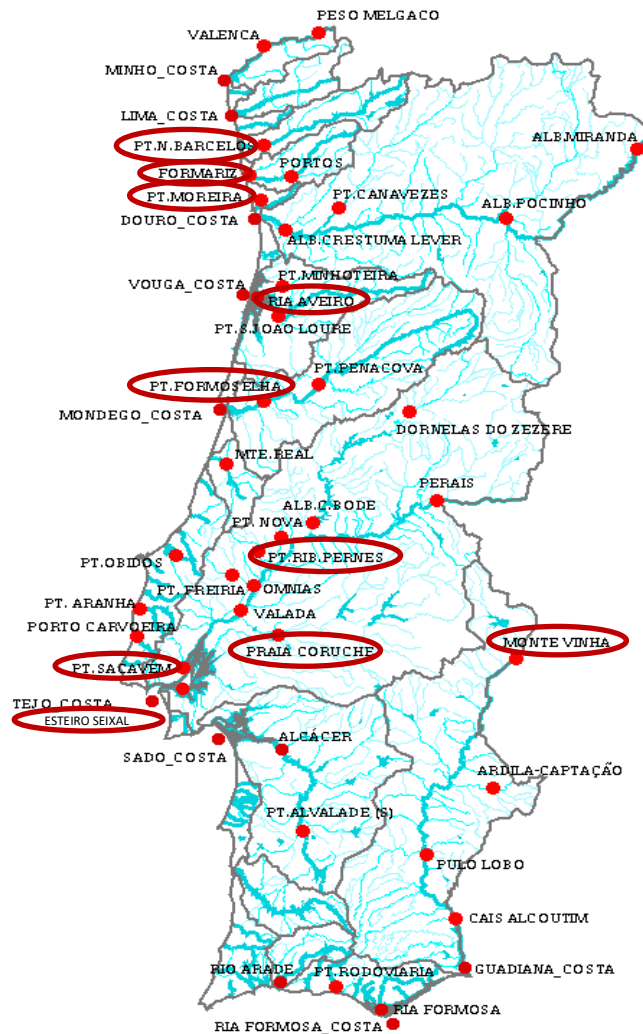


Figura 4.1. Mapa de Portugal con la localización de los 10 puntos de muestreo

La toma de muestras fue llevada a cabo por el *Instituto do Ambiente de Portugal*, utilizando protocolos estándares. Las muestras fueron previamente pre-concentradas en cartuchos Oasis HLB y enviadas a Barcelona en avión a temperatura de - 4 C para garantizar la estabilidad de los compuestos. En el laboratorio del CSIC se realizó la extracción mediante SPE y el análisis químico de las muestras de agua, mediante GC-MS en el primer PVA de plaguicidas y EDCs y LC-MS en el segundo PVA de EDCs y la determinación de la actividad disruptora endocrina utilizando el ensayo de levaduras recombinantes(RYA). En la figura 4.1. se incluye la ubicación de los diversos puntos de muestreo en el mapa de Portugal:

4.1.2. PVA PARA EL CUMPLIMIENTO DE LA DIRECTIVA 76/464/CE EN PORTUGAL

En el PVA llevado a cabo, se analizaron mensualmente 76 compuestos semi-volátiles (SVOCs) - en 46 puntos de muestreo situados a lo largo de los ríos portugueses, durante un período de 14 meses (de abril 1999 a mayo 2000), es decir, un total de 644 muestras de agua. Debido al gran número de datos generados (n=644), se decidió llevar a cabo un análisis quimiométrico mediante Análisis de Componentes Principales (PCA), para la interpretación de los datos generados.

Los plaguicidas estudiados en el PVA incluyeron, además de los contaminantes prioritarios incluidos en la lista de la D. 76/464/CE, otros compuestos seleccionados de acuerdo al siguiente criterio:

- Compuestos plaguicidas tóxicos y utilizados en gran volumen.
- Compuestos incluidos en la Lista COMMPS (*Combined Monitoring-based and Modelling-based Priority Settings*), como Irgarol 1501, terbutilazina, 4-nonilfenol, bisfenol A, desetilatrazina, etc.

Sin embargo, no fueron analizados sistemáticamente durante todo el periodo del PVA y por tanto en algunos meses faltan los datos y no puede construirse una matriz de datos completa.

Los plaguicidas considerados finalmente para llevar a cabo el estudio quimiométrico fueron: los 19 SVOCs considerados en el PVA de la D. 76/464/CE (Tauler y col., 2001) y los 10 plaguicidas seleccionados en el PVA de la D. 2000/60/CE (Tauler y col., 2004), marcados con un asterisco:

<u>Triazinas</u>	<u>Herbicidas ácidos</u>
Atrazina *	Bentazona
Simazina *	Dicloroprop
Terbutilazina (TBA) *	Mecoprop
<u>Cloroanilidas</u>	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)
Alacloro *	Ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T)
Metolacloro*	<u>Origen industrial</u>
<u>Clorofenoles</u>	Tributilfosfato (TBP) *
3-clorofenol	<u>Diversos</u>
4-cloro-3-metilfenol	Irgarol *
2,4,6-triclorofenol (2,4,6 TCP) *	Bifenilo
Pentaclorofenol (PCP) *	Propanil *
<u>Fenilureas</u>	
Linuron	

Brevemente, la metodología analítica consistió en pre-concentrar 200 mL de agua superficial mediante extracción en fase sólida en un cartucho polimérico de SPE (Oasis de 60 mg) y su posterior análisis por GC-EI-MS en modo SIM y scan. Adicionalmente, los analitos y productos de transformación más polares se analizaron mediante LC-MS con interfase de electrospray con el método descrito en (Céspedes y col., 2004), mientras que el resto de plaguicidas incluidos en el estudio quimiométrico fueron analizados por GC-MS y se compararon ambas técnicas cromatográficas. Las triazinas (atrazina y simazina), alacloro y metolacloro fueron analizados mediante LC-MS con interfase de electrospray junto a los compuestos disruptores endocrinos (NP, OP, BPA, estrógenos y progestógenos).

El análisis sistemático mensual de estos compuestos en muestras de agua localizadas en los mismos puntos de la geografía portuguesa, permite evaluar los niveles y destino de los contaminantes prioritarios. Por consiguiente, la información obtenida es útil para evaluar el impacto medioambiental de los compuestos estudiados en Portugal, pudiendo así establecer: los compuestos más ubicuos detectados, los principales "hot spots" o puntos donde se concentra un mayor índice de contaminación, el origen agrícola o industrial de la contaminación detectada y las distribuciones espaciales y temporales de los contaminantes orgánicos detectados en aguas medioambientales.

4.1.3. PVA PARA EL CUMPLIMIENTO DE LA DIRECTIVA 2000/60/CE EN PORTUGAL

Siguiendo los requerimientos del *Instituto do Ambiente do Portugal* de evaluar la actividad estrogénica de las aguas superficiales, sedimentos y fangos en los ríos seleccionados en Portugal, en el marco de esta tesis se llevó a cabo un Plan de Vigilancia Ambiental para la determinación de los 21 compuestos disruptores endocrinos seleccionados en muestras de agua de Portugal durante 2 años (desde abril 2001 a diciembre 2002). Se analizaron los EDCs descritos a continuación en un total de 186 muestras de agua correspondientes a 10 zonas de muestreo.

<u>Alquilfenoles</u>	<u>Estrógenos</u>
Nonilfenol (NP)	Estrona (E1)
Octilfenol (OP)	β-Estradiol (E2)
Terbutilazina (TBA)	Estriol (E3)
<u>Alquilfenoles etoxilados</u>	Etinilestradiol (EE2)
Nonilfenol mono etoxilado (NPE ₁ O)	Diestilstilbestrol (DES)
Nonilfenol di etoxilado (NPE ₂ O)	<u>Ftalatos</u>
<u>Comp. bifenólicos</u>	Diimetilftalato (DMP)
Bisfenol A	Dietilftalato (DEP)
<u>Alcoholes etoxilados</u>	Dibutilftalato (DBO)
<u>Benzotiazoles</u>	Butilbenzilftalato (BBP)
	Di (2-etilhexil)ftalato (DEP)

En este trabajo, se aplicó el método multiresiduo establecido en el capítulo 2 (Céspedes y col., 2004) para el análisis químico y biológico de EDCs en muestras de aguas y se evaluó la estrogénicidad. Posteriormente se realizó un análisis quimiométrico con los datos generados de las 176 muestras analizadas mediante LC-MS, para la determinación de los 5 EDCs seleccionados (NP, OP, NP₁EO, NP₂EO y BPA), detectados en la mayoría de las muestras correspondientes a los 10 puntos de muestreo.

Los objetivos que se fijaron en el PVA para el cumplimiento de la D. 2000/60/CE en Portugal:

1. Determinación de los 21 EDCs seleccionados en 186 muestras de agua, correspondientes al muestreo mensual en 10 ríos de la geografía portuguesa, desde abril 2001 hasta diciembre 2002. Análisis mediante LC-MS. Confirmación de los niveles de estrógenos mediante LC-MS/MS
2. Identificación de los EDCs más ubicuos y de los hot spots o puntos con concentraciones elevadas.
3. Determinación de la estrogénicidad total de las muestras analizadas mediante la aplicación de ensayos de Levaduras Recombinantes (RYA).
4. Correlación entre las concentraciones individuales de EDCs obtenidas mediante LC-MS y la actividad estrogénica total de las muestras (E2 eq) establecidas mediante el RYA.

5. Aplicación de técnicas quimiométricas para determinar la distribución ambiental de los 5 EDCs más detectados, establecer distribuciones geográficas y temporales, así como correlaciones entre los compuestos más ubicuos detectados (y determinar los puntos de contaminación puntual y difusa).

4.2. RESULTADOS: DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS Y EDCs EN PVAs EN PORTUGAL

4.2.1. Niveles de plaguicidas obtenidos en el PVA de la D. 76/464/CE en Portugal

Los niveles de triazinas detectados en el análisis químico (SPE y LC-MS) fueron dentro del mismo rango que los detectados en el sur de Europa por otros autores (Aguilar y col., 1999; Azevedo y col., 2000; Lacorte y col., 2001; Cerejeira y col., 2003; Rodriguez-Mozaz y col., 2004; Tauler y col., 2004). La variación estacional de las concentraciones de plaguicidas tiene un mayor input en primavera, tras su aplicación en cultivos, tal y como se recoge en algunas publicaciones (Quintana y col., 2001; Cerejeira y col., 2003; Carabias-Martínez y col., 2003).

Los plaguicidas detectados más frecuentemente en las muestras fueron TBP, seguido de atrazina y simazina (88%, 70% y 57% de las muestras respectivamente), tal y como puede verse en el siguiente gráfico (Figura 4.2.):

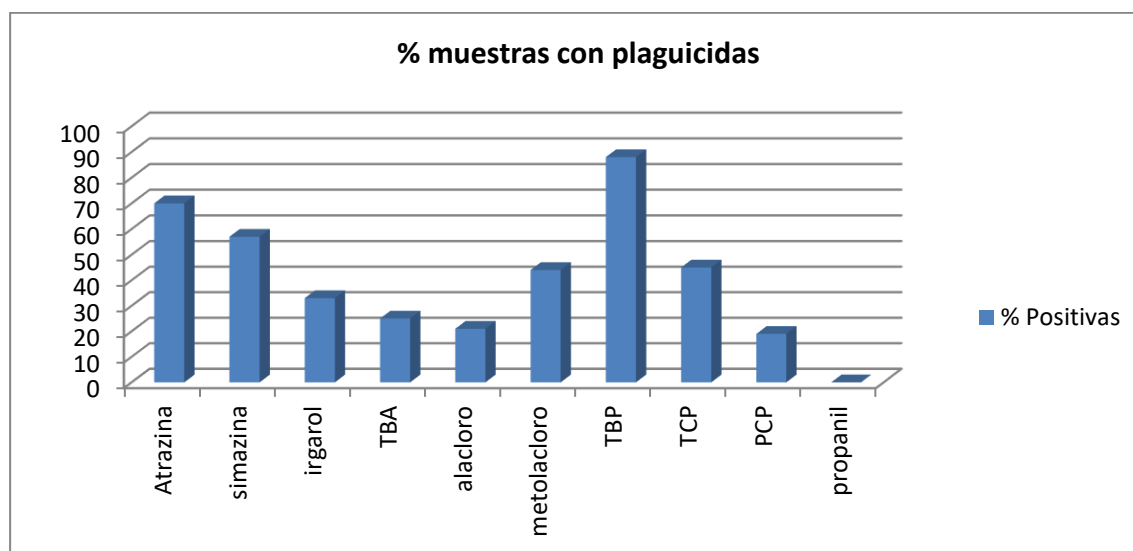


Figura 4.2. Porcentaje de muestras en las que se ha detectado cada uno de los 10 plaguicidas seleccionados (n=256 para atrazina y simazina y n= 14 para el resto).

En la Figura 4.3., se indica la distribución de niveles de concentración obtenidos para cada plaguicida. La mayoría de las muestras fueron detectadas a concentraciones inferiores a 0,1 $\mu\text{g/L}$. TCP fue el plaguicida que registró mayor número de muestras con valores superiores a 1 $\mu\text{g/L}$ (9 muestras); propanil y PCP, los compuestos más detectados a niveles entre 0,3 y 1 $\mu\text{g/L}$ fueron propanil y PCP, mientras que entre 0,1 y 0,3 $\mu\text{g/L}$ fueron TCP, atrazina, simazina y TBP.

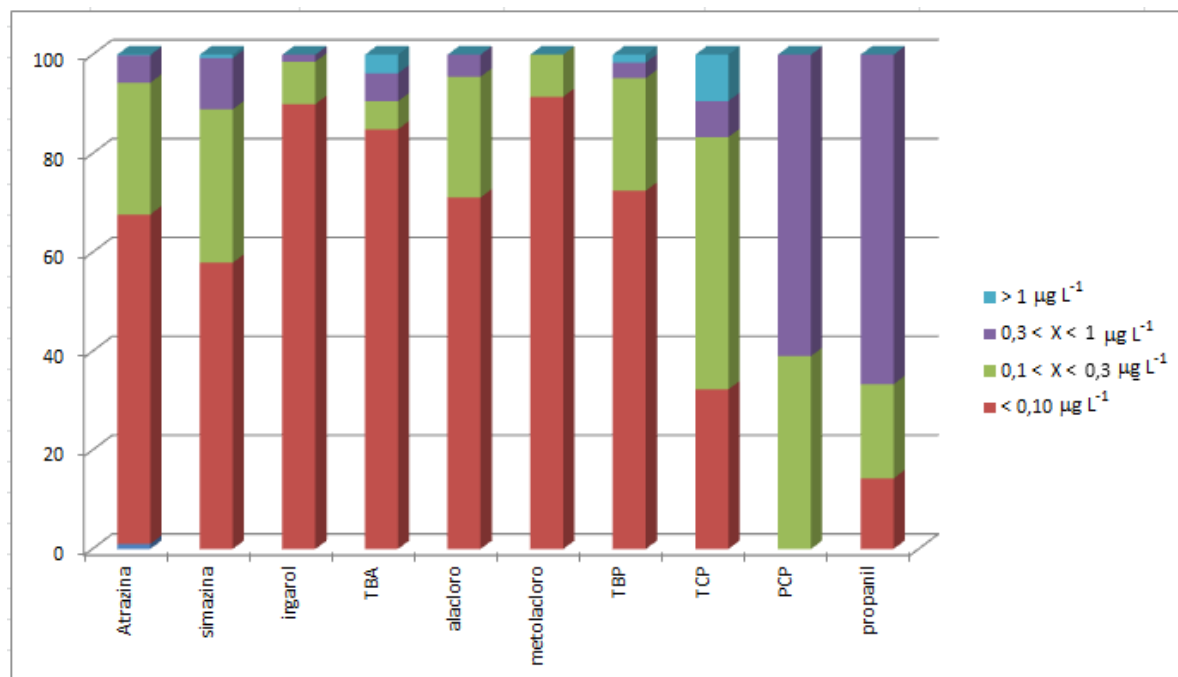


Figura 4.3. Rangos de concentración de los plaguicidas detectados en aguas de Portugal.

Atrazina, simazina, alacloro y metolacloro son algunos de los herbicidas detectados más a menudo en aguas superficiales. Los tres primeros están incluidos en la lista de 33 sustancias prioritarias del Anexo X de la Directiva Marco del Agua (D. 2000/60/CE) de la UE. Metolacloro e irgarol no eran compuestos prioritarios incluidos en la legislación, sin embargo, se incluyeron en el estudio por ser contaminantes con propiedades tóxicas detectados con frecuencia en las aguas. Propazina y terbutilazina se incluyeron porque varios países están utilizándolos como reemplazo de la atrazina. Si tenemos en cuenta los valores establecidos en las Normas de Calidad Ambiental (NCA) del RD 60/2011 o de la D. 2013/39/UE, muy pocas muestras superaron los valores medios anuales (MA) y la Concentración Máxima Admisible (CMA) para atrazina, simazina, alacloro, TBA y PCP, mientras que ninguna muestra superó el nivel establecido para metolacloro (1 µg/L).

A continuación, se resumen los niveles obtenidos de los 10 plaguicidas estudiados en el estudio quimiométrico, en la tabla 2 del artículo (Tauler y col., 2001), agrupados en familias:

- **Triazinas** (atrazina, simazina y TBA), herbicidas ampliamente utilizados:

Atrazina: se detectó en el 70% de las muestras (n=180), pero solo en 2 de ellas a niveles superiores a 1 µg/L, en algunas muestras los niveles fueron superiores a 5 µg/L en MdV, punto fronterizo entre España y Portugal, coincidiendo con el período de aplicación del plaguicida en alguno de los dos países.

Simazina: los niveles más altos de simazina detectados en el estudio realizado, corresponden a áreas agrícolas, relacionadas con aplicaciones locales especialmente altas en abril 2000. Los niveles medios a los que se ha detectado mensualmente indican que su presencia es generalizada independientemente del mes de muestreo. Así, en la mayoría en 145 muestras de 256 analizadas, se detectó al menos una vez a concentraciones superiores a 0.1 µg/L.

Terbutilazina: herbicida que sustituye a la atrazina que a la vez puede ser uno de los metabolitos de la atrazina, fue detectado en la cuarta parte de las muestras, generalmente a concentraciones inferiores a 0.1 µg/L.

- Cloro acetanilidas:

Alacloro y metolacloro: fueron detectados en el 21% y 44% de las muestras respectivamente, en la mayoría de casos a concentraciones inferiores a 0.1 µg/L y en ningún caso superaron el valor 1.0 µg/L.

- Compuestos de origen industrial:

Tributilfosfato: fue el compuesto más ubicuo, detectado en el 88% de las muestras analizadas a niveles más altos en Porto, contaminación puntual localizada en la zona industrial, con correlaciones positivas, mientras que, en el resto de puntos, con contaminación difusa, fue generalmente detectado a concentraciones inferiores a 0.1 µg/L. El origen de su contaminación puede ser doble: contaminación puntual localizada en la zona industrial de Porto, con correlaciones positivas y contaminación difusa en el resto de puntos de muestreo.

- Clorofenoles: Son generados en varios procesos industriales y detectados frecuentemente en aguas superficiales, de consumo y en efluentes a niveles que pueden causar efectos tóxicos (0.1 – 10 µg/L).

Pentaclorofenol (PCP): de las 41 muestras en las que fue detectado, en más del 50% (n=25) estaba presente a niveles entre 0.3 y 1 µg/L. Las NCA (o EQS) establecidos para este compuesto son 2 µg/L para efluentes y 0.1 µg/L para aguas superficiales, por lo cual actualmente incumplirían la normativa al superar los valores límite establecidos.

2,4,6, Triclorofenol (2,4,6-TCP): de las 96 muestras en las que fue detectado en Portugal (45% del total), en 9 de ellas presentó valores superiores a 1 µg/L.

- Diversos:

Irgarol 1051: antiincrustante para la pintura de los barcos, se detectó en ríos con actividades deportivas o de pesca con barcos. En 7 de las 70 muestras en que fue detectado, se encontró a niveles superiores a 0.1 µg/L.

Propanil: fue detectado en el 10% de las muestras, en la mayoría de ellas a niveles entre 0.3 y 1.0 µg/L y en ningún caso superior a 1 µg/L.

4.2.2. Estudio quimiométrico de los datos de plaguicidas del PVA de la D. 76/464/CE

El estudio quimiométrico de los datos generados en el PVA para el cumplimiento de la D. 76/464/CE se incluye en las dos publicaciones:

1) *“Organic Pollutants in Surface Waters from Portugal using Chemometric Interpretation” (2001).* R.Tauler, D. A. Azevedo, S.Lacorte, R.Céspedes, P.Viana, D.Barceló. *Environmental Technology*, Vol. 22. 1043-1054, donde se presentan los resultados obtenidos mediante Análisis de Componentes Principales (PCA) que permiten:

- La identificación de las principales fuentes de contaminación agrícola e industrial y contaminantes SVOCs (plaguicidas) más ubicuos en las aguas superficiales de Portugal.
- La determinación de la distribución espacial (geográfica) y temporal de las principales fuentes de contaminación.
- Diferenciar entre las principales fuentes de contaminación difusa y emisiones puntuales.
- Correlacionar los contaminantes más ubicuos.
- Detectar los *“hot spots”* o zonas de mayor contaminación, e identificar las fuentes de contaminación difusas, agrícolas e industriales.

2) *“Chemometric modelling of main contamination sources in surface waters of Portugal” (2004)* R.Tauler, S.Lacorte, M. Guillamón, R.Céspedes, P.Viana, D.Barceló. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 23. 565-575, donde se proponen y comparan varios métodos quimiométricos de análisis de datos:

- Los modelos en dos modos o direcciones Análisis de Componentes Principal (PCA) y MCR-ALS y
- Los modelos en tres modos o direcciones PARAFAC y TUCKER-3.

Esta comparación de diferentes métodos quimiométricos permite:

- El análisis, identificación e interpretación de las principales fuentes de contaminación de 19 SVOCs en aguas superficiales de Portugal correspondientes a todo el PVA (abril 1999 - mayo 2000),
- La determinación y modelización de las distribuciones geográficas y temporales de estas fuentes de contaminación y
- Diferenciar entre las principales fuentes de contaminación difusa y emisiones puntuales.

4.2.3. Determinación de EDCs y evaluación de la actividad estrogénica en aguas de Portugal

3) En el estudio: “*Detection and Evaluation of Endocrine Disruption Activity in Water Samples from Portugal Rivers (2005)* L. Quirós, R. Céspedes, S. Lacorte, P. Viana, D. Barceló and B. Piña. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 24. 389-395”, se combinó el análisis químico mediante LC-MS para la determinación de las concentraciones de los EDCs seleccionados y el análisis de levaduras recombinantes (RYA) para la determinación de la estrogénicidad en 183 muestras de agua.

Los principales objetivos establecidos en este estudio para el cumplimiento de la Directiva 2000/60/CE, fueron los siguientes:

- Determinación mediante LC-MS de las concentraciones de los EDCs seleccionados en 183 muestras de agua, correspondientes al muestreo mensual en 10 ríos de Portugal.
- Identificación de los EDCs más ubicuos y de los *hot spots* o puntos con concentraciones elevadas. Establecer las distribuciones geográficas y temporales
- Determinación de la estrogénicidad total de las muestras analizadas mediante la aplicación de ensayos de Levaduras Recombinantes (RYA).
- Correlación entre las concentraciones individuales de EDCs obtenidas mediante LC-MS y la actividad estrogénica total de las muestras (E2 eq) establecidas mediante el RYA.
- Demostrar la viabilidad del ensayo RYA para realizar *monitorings* continuos en aguas y su utilidad para detectar picos de estrogénicidad incluso cuando los presuntos contaminantes no han sido caracterizados

Los EDCs incluidos en este artículo son los compuestos alquilfenólicos (NP, NP₁EO, NP₂EO y OP) y el BPA, detectados frecuentemente en aguas superficiales. Se determinaron los EDCs mensualmente desde abril 2001 hasta diciembre de 2002 en 10 puntos de muestreo en ríos de Portugal, desde Ponte Nova Barcelós (PNB) al Norte de Portugal, hasta Estero Seixal (ES), situado bajo Lisboa. Se incluyeron puntos urbanos, de origen industrial y/o agrícola.

Artículo científico número 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,(2001) Vol. 22 . 1043-1054*

ORGANIC POLLUTANTS IN SURFACE WATERS FROM PORTUGAL USING CHEMOMETRIC INTERPRETATION

R. TAULER¹*, D. DE ALMEIDA AZEVEDO², S. LACORTE³, R. CÉSPEDES³, P. VIANA⁴ AND D. BARCELÓ³

¹Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Diagonal 647, Barcelona, 08028, Spain

²Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, CT, Bl. A, I. Fundão, Rio de Janeiro, 21949-900, Brazil

³Department of Environmental Chemistry, IIQAB-CSIC, Jordi Girona 18-26, Barcelona, 08034, Spain

⁴Direção Geral do Ambiente, Ministério do Ambiente, Portugal

(Received 1 September 2000; Accepted 8 March 2001)

ABSTRACT

Surface water samples from 45 sampling points across Portugal have been analyzed monthly by automated Solid Phase Extraction (SPE) and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC/MS) in SIM and SCAN modes. Sampling was carried out during a period of six months (April-September, 1999), in order to determine the levels of contamination of 72 organic compounds mainly selected from the EC Council Directive list (CEC 76/464/EEC). Atrazine, simazine, deethylatrazine, alachlor, metolachlor, Irgarol, terbutylazine, tributylphosphate, 2,4,6-trichlorophenol, 2-chlorophenol, 3-chlorophenol, pentachlorophenol, dimethoate, lindane, linuron, propanil, *o,p'*-DDD, *o,p'*-DDT, *o,p'*-DDE and malathion were the main detected compounds. Although Irgarol, terbutylazine, deethylatrazine and deisopropylatrazine are not listed in the EC Directive, these herbicides and transformation products are currently in use and they were also included in the monitoring program and detected at some sites. Fifty-nine percent of the samples were below $0.1\mu\text{g l}^{-1}$, the detection limit required by the EEC Drinking Water Directive (DWD). Some compounds were detected at values higher than the DWD, e.g. atrazine ($2.7\mu\text{g l}^{-1}$) and alachlor ($5.43\mu\text{g l}^{-1}$) in April. Simazine was also present with a high value ($2.3\mu\text{g l}^{-1}$) in September. Tributylphosphate ($5.40\mu\text{g l}^{-1}$) and 2,4,6-trichlorophenol ($2.31\mu\text{g l}^{-1}$) were also found at high concentrations near industrial sites. Chemometric interpretation of the more representative contaminants was performed by means of Principal Component Analysis, allowing the resolution of the more relevant contamination sources and the description of their temporal and spatial (geographical) distributions.

Keywords: GC/MS, herbicides, river water, Principal component analysis.

INTRODUCTION

Pesticides currently used over the world are numerous and have various chemical and physico-chemical properties. Generally, monitoring programs are performed according to existing legislation (76/464/CEE and COM(2001) 17 final in Europe, EPA in USA) or local Directives. These Directives indicate the most used, toxic and persistent compounds, and establish quality objectives to reduce their impact in the environment. In many instances, such as in the US-EPA, methods of analysis are also indicated. Survey lists can contain more than one hundred pesticides and degradation products, examples are the National Pesticides Survey list of the US EPA and the EC Council Directive (CEC 76/464/EEC)[1]. For drinking water, the Commission of

European Communities has fixed a level of $0.1\mu\text{g l}^{-1}$ for individual pesticides and $0.5\mu\text{g l}^{-1}$ for total pesticides [2,3]. This is a very strict measure, and analytical methods still need to be developed for a variety of pesticides to comply with this Directive. In contrast, the Office of Water of the US EPA has established drinking water regulations and health advisory levels for individual pesticides, e.g., alachlor $2\mu\text{g l}^{-1}$, atrazine $3\mu\text{g l}^{-1}$, simazine $4\mu\text{g l}^{-1}$, metolachlor $10\mu\text{g l}^{-1}$ [1]. Method development in Europe has been required to produce methods with LOD (limit of detection) approximately one order of magnitude lower than the EPA standards, thus causing more difficulties in monitoring a large number of organic pollutants. The efforts of different research groups working in this area are directed towards achieving the detection limits required by the EEC that should be at

least $0.02 \mu\text{g l}^{-1}$ in order to determine analytes at $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$. The water volume that needs to be preconcentrated for achieving a LOD that satisfies the EEC Drinking Water Directive can vary between 150-350 ml [1].

The use of GC-MS with electron impact (EI) is the most widely employed technique in environmental pesticide analysis for confirmation and quantification purposes. It is simple, reliable and fast [4-8]. In the past few years a tendency has been observed towards the use of GC-MS with SIM (Single Ion Monitoring) for quantitative purposes, instead of its use only as a qualitative confirmation technique. One of the most recent methods described in the literature is based on solid phase extraction (SPE) techniques and GC-MS [8].

As part of a monitoring study 256 river, estuarine and coastal water samples from Portugal were analyzed during a period of six months (April to September, 1999). A total number of 72 semi-volatile organic compounds were systematically determined, and the main compounds detected were atrazine, simazine, tributylphosphate, alachlor, metolachlor, terbutylazine, 2,4,6-trichlorophenol, pentachlorophenol, propanil, and irgarol. Assessment of the data generated in this monitoring program was needed to determine the potential impact of these compounds in the environment. Chemometrics provides powerful tools for the analysis of the large, environmental, multivariate data generated within a monitoring program. The goal of exploratory data analysis using chemometric techniques is the computation and graphical display of patterns in data sets, looking for possible groupings and sources of data variation. These methods allow the deduction of correlated variables, sample grouping and outlier detection; they also allow the screening and investigation of the data structure, that can be used in subsequent multivariate analysis steps. Principal component analysis is the multivariate statistical method more frequently used in chemometrics for the transformation and visualization of complex data sets into a new perspective in which the more relevant information is made more obvious [9]. Due to the large number of data generated within this monitoring program in Portugal surface waters, it was decided to do a chemometric analysis and interpretation of the different data generated within this study. The whole data set has been investigated for possible correlations and for the deduction of geographical and temporal contamination sources and trends. This exploratory data analysis has been performed by Principal Component Analysis [10-12].

Summarizing, the main objectives of the present paper were: (1) the identification of the major agricultural and industrial pollutants in Portugal waters, and (2) the investigation of their major input sources as well as their temporal and spatial distributions using Principal Component Analysis and multivariate data analysis tools. To our knowledge this is the first pilot survey study of organic priority pollutants with subsequent chemometric interpretation carried out in Portugal waters. The final objective was to detect the major 'hot spot' areas in the Portugal waters and to identify diffuse sources of pollution

with the aid of multivariate statistical chemometric techniques.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

The standards used were 98-99% pure. Seventy-two compounds were studied (see reference 13). Pesticide standards were obtained from Promochem (Wesel, Germany) and Riedel-de Haën (Seelze, Germany). Irgarol was from Ciba-Geigy (Barcelona, Spain) and terbutylazine was from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Anilines, nitrobenzenes, chlorotoluidines and phenols were from Sigma-Aldrich (Spain). α and β endosulfan, α and γ chlordane were from Supelco (USA). Stock solutions of 1000ppm were prepared by weighing 10 mg of each of the solutes and dissolving them in chromatographic-grade dichloromethane (Merck, Germany). They were then stored at -20°C . HPLC-grade solvents methanol and water were from Merck. Acetic acid was purchased from Fluka (Switzerland).

Sampling

In order to determine the levels of priority organic compounds in surface waters from Portugal, 45 different sampling sites were established in such a way that they covered the whole country. Special attention was given to areas with high industrial or agricultural activities (the cities of Porto and Lisbon and the Sado estuary). In this study, samples obtained from each of the sites were collected monthly from April to September. Figure 1 shows the map from Portugal and the sampling points and Table 1 shows the geographical coordinates and known activities of each point.

Samples were collected in 1l precleaned amber glass bottles, acidified with acetic acid to pH~4.0, filtered through 1.2 and $0.45 \mu\text{m}$ glass fiber filters (Whatman, England) in order to remove suspended particles and transported immediately to Barcelona by plane at 4°C to avoid degradation. Samples were kept at 4°C in the dark until analysis. Solid phase extractions (SPE) were carried out no more than one week after arrival.

Solid phase extractions

Automated solid phase extractions were performed with the ASPEC XL - GILSON (Gilson, Villiers-le-Bel, France) according to the method developed by Lacorte *et al.* [8]. In brief, cartridges (Oasis of 60mg, WATERS, USA) were washed sequentially with 6 ml of dichloromethane, 6 ml of acetonitrile and 6 ml of water dropwise. 200 ml of sample was passed through the cartridge at a flow rate of 6 ml min^{-1} and then washed with 1 ml of water. Cartridges were dried under vacuum for 30 min. Elution was carried out with 2.5 ml of acetonitrile-dichloromethane (1:1) followed by 3.2 ml of dichloromethane at a flow rate of 1 ml min^{-1} . Evaporation of

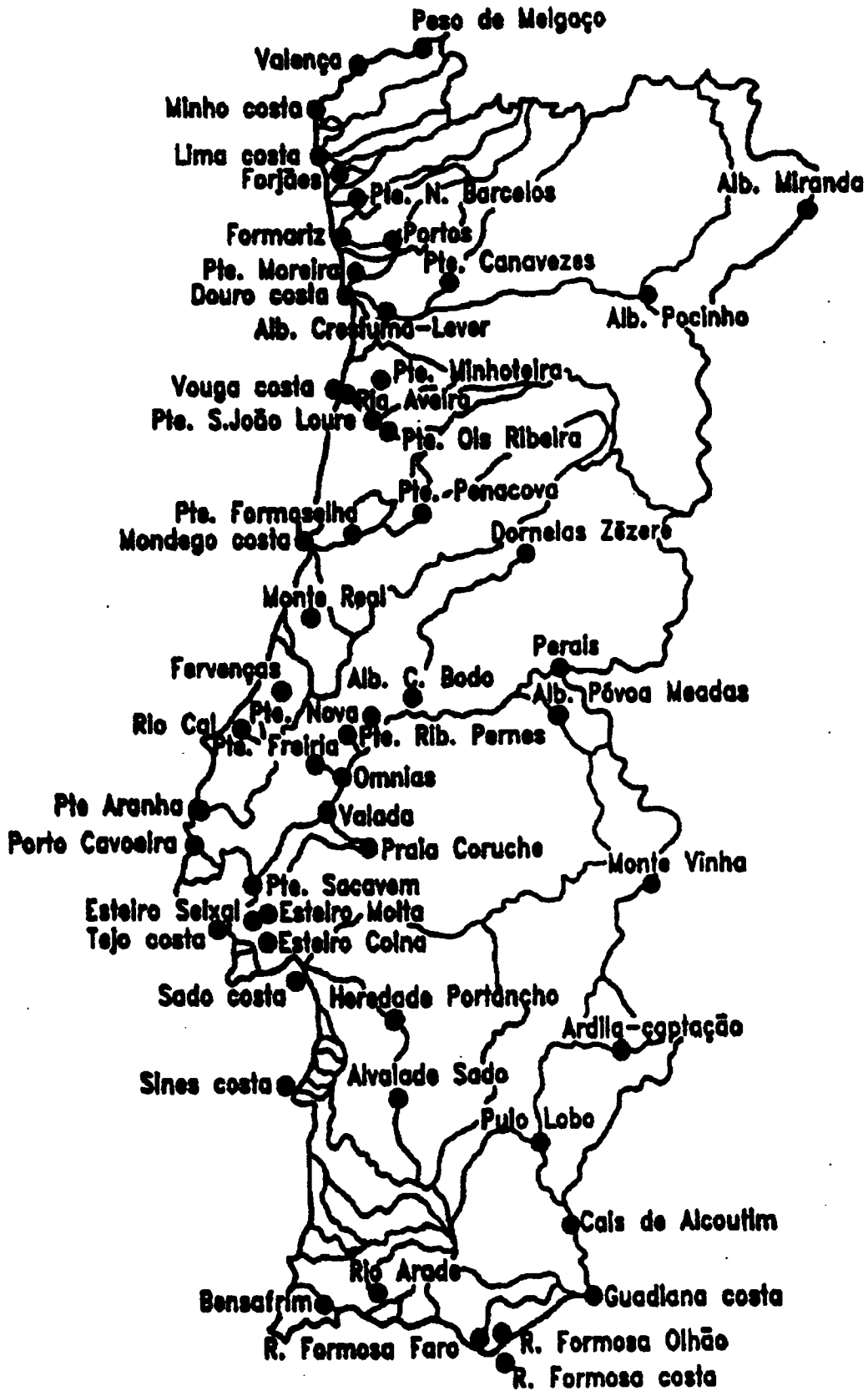


Figure 1. Map of Portugal, showing the sampling points.

Table 1. Sample identification and activities of the sampling area.

Nº	Sample Points	River	Sample type	Activities
1	Peso de Melgaço	Minho	Riverine	Agricultural (corn, wines)
2	Valença	Minho	Riverine	Agricultural (corn, wines)
3	Forjaes	Neiva	Riverine	Agricultural (corn, wines)
4	Ponte Nova Barcelos	Cávado	Riverine	Agricultural (corn, wines)
5	Portos	Ave	Riverine	Industrial (textile)
6	Formariz	Ave	Riverine	Industrial (textile)
7	Ponte Moreira	Leça	Riverine	Industrial (textile)
8	Alb. de Miranda do Douro	Douro	Riverine	Agricultural (wine, olives)
9	Alb. do Pocinho	Douro	Riverine	Agricultural (wine, olives, almond)
10	Alb. Crestuma-Lever	Douro	Riverine	Agricultural (wine)
11	Ponte de Canavezes	Támega	Riverine	Agricultural (wine)
12	Ponte Minholeira	Antua	Riverine	Industrial (paper), Agricultural
13	Ponte S. Joao de Loura	Vouga	Riverine	Industrial (paper), Agricultural
14	Ponte Óis de Ribeira	Águeda	Riverine	Industrial (paper), Agricultural (wine)
15	Ria Aveiro	Novo	Riverine	Industrial (paper), Agricultural (wine)
16	Ponte Penacova	Mondego	Riverine	Industrial (paper), Agricultural (wine)
17	Ponte Formoselha	Mondego	Riverine	Agricultural (olives)
18	Monte Real	Lis	Riverine	Agricultural (rice)
19	Fervenças	Alcobaça	Riverine	Industrial, Agricultural (rice)
20	Ponte da Aranha	Sizandro	Riverine	Agricultural (corn)
21	Rio da Cal	Cal	Riverine	Agricultural (vegetables)
22	Porto da Cavoeira	Lisandro	Riverine	Agricultural (corn, vegetables)
23	Perais	Tejo	Riverine	Agricultural (vegetables)
24	Ómnias	Tejo	Riverine	Industrial (paper)
25	Alb. Póvoa e Meadas	Nisa	Riverine	Industrial, Agricultural (vegetables)
26	Alb. Castelo do Bode	Zézere	Riverine	Industrial (paper)
27	Dornelas do Zézere	Zézere	Riverine	Agricultural (olives)
28	Ponte Nova Barcelos	Almonda	Riverine	Agricultural (olives)
29	Ponte da Ribeiro-Pernes	Alviela	Riverine	Industrial, Agricultural
30	Ponte de Freiria	Maior	Riverine	Industrial (textil)
31	Ponte Sacavém	Tranco	Riverine	Agricultural (vegetables)
32	Praia de Coruche	Sorraia	Riverine	Industrial, Agricultural (vegetables)
33	Valada	Tejo	Riverine	Agricultural (rice, corn)
34	Esteiro Coina	Tejo	Estuarine	Agricultural (vegetables, rice)
35	Esteiro Seixal	Tejo	Estuarine	Industrial (paper), Agricultural (rice)
36	Esteiro Molta	Tejo	Estuarine	Industrial, Agricultural (vegetables)
37	Monte da Vinha	Guadiana	Riverine	Industrial, Agricultural (vegetables)
38	Ardila-captação	Ardila	Riverine	Agricultural (rice), Industrial (paper)
39	Pulo do Lobo	Guadiana	Riverine	Agricultural (olives, oak)
40	Cais de Alcoutim	Guadiana	Riverine	Agricultural (oak)
41	Alvalade do Sado	Sado	Riverine	Agricultural (wines)
42	Herdade de Portancho	Sado	Riverine	Agricultural (corn, oak)
43	Bensafrim	Bensafrim	Riverine	Agricultural (corn)
44	Rio Arade	Arade	Riverine	Agricultural (greenhouse)
45	R. Formosa_Faro	Ria Formosa	Coastal	Agricultural (citrics)
46	R. Formosa_Olhão	Ria Formosa	Coastal	Agricultural (almond, greenhouse)

the solvent was performed under a stream of nitrogen. The final sample volumes (0.2-0.5 ml) were weighed and corrected by solvent density.

GC/MS conditions

Gas chromatography-mass spectrometry analyses were performed in a Trace GC 2000 Series and Trace MS

(ThermoQuest, Finnigan Instruments, USA). Helium was used as carrier gas and a fused silica column HP-5MS (30 m x 0.25 mm, d, 0.25 µm) was programmed at 60°C for 1min, from 60°C to 175°C (4 min) at 6°C min⁻¹, from 175 °C to 240°C (5min) at 3°C min⁻¹, and from 240 to 300°C (1 min) at 7°C min⁻¹. Injection was performed in splitless mode, with an interface temperature of 270°C, the source temperature was of 200°C and the injector temperature was set at 250°C. Electron impact at 70 eV was used. All samples were analyzed in Single Ion Monitoring (SIM) mode for quantification purposes (major ions corresponding to the typical fragments of the compounds are indicated in ref. [8] and [13]) and SCAN mode in the range 70-450 u for confirmation of the spectral data against a real standard and library comparison. Quality parameters related to this method are specified in references 8, 13 and 14.

Exploratory data analysis

The whole data set was organized in a large data table or data matrix, where the rows identify the different sampling sites and the columns (variables) identify the different organic compounds detected in each sample. Samples from the same month were set together and different months were arranged consecutively. Owing to the fact that not all the compounds were always detected in all the samples and that not all the sites were sampled in each of the months, the whole data

matrix was reduced to the more frequently sampled sites (12 samples in April and 43 samples for the rest of the months May to September) and to the ten organic compounds (variables) more frequently detected with values higher than their LOD in a large number of samples (see in Table 2, the ten most frequently found organic compounds). These ten compounds were (in parenthesis, their identification as variable number in Figures and text): atrazine (1), simazine (2), Irgarol (3), terbutylazine (TBA, 4), alachlor (5), metolachlor (6), tributylphosphate (TBP, 7), 2,4,6-trichlorophenol (TCP, 8), pentachlorophenol (PCP, 9), propanil (10).

The initial basic assumption of the exploratory data analysis was that the larger variations observed in the concentrations of the different detected compounds were due to a reduced number of contamination sources of different origin. The goal of this exploratory data analysis is the identification of these sources, as well as the deduction of their spatial (geographical) and temporal distribution.

To accomplish this goal, Principal Component Analysis, PCA [10] was applied. This multivariate data analysis technique looks for the major sources of correlated data variation by means of an orthogonal matrix decomposition expressed by equation $D = U V^T + N$, where $D(n,m)$ is the data matrix with n rows (number of samples) and m columns (number of variables, number organic compounds analyzed), $U(n,nc)$ is the scores matrix with n rows (number

Table 2. Number of detected positive samples

	I ¹	<0.10 µg l ⁻¹	0.1<0.3 µg l ⁻¹	0.3<1.0 µg l ⁻¹	>1.0 µg l ⁻¹	nd ²	Total	Positive	%Pos ³
Atrazine	1	120	48	10	2	76	256	180	70
Simazine	2	84	45	15	1	115	256	145	57
Irgarol	3	63	6	1	0	143	214	70	33
Terbutylazine	4	45	3	3	2	161	214	53	25
Alachlor	5	32	11	2	0	169	214	45	21
Metolachlor	6	86	8	0	0	119	214	94	44
Tributylphosphate, TBP	7	137	43	6	3	14	214	189	88
2,4,6-Trichloro-phenol, TCP	8	31	49	7	9	117	214	96	45
Pentachlorophenol, PCP	9	0	16	25	0	173	214	41	19
Propanil	10	3	4	14	0	193	214	21	9.8
o,p'-DDE	-	2	0	0	0	212	214	2	0.93
o,p'-DDD	-	6	0	0	0	208	214	6	2.8
o,p'-DDT	-	3	0	0	0	211	214	3	1.4
Malathion	-	4	0	0	0	210	214	4	1.9
Dimethoate	-	0	3	10	0	201	214	13	6.1
Lindane	-	9	0	0	0	247	256	9	3.5
Linuron	-	0	10	0	0	247	256	10	3.9
Deethylatrazine	-	0	8	9	0	80	87	17	19.5
2-Chlorophenol	-	0	13	0	0	201	214	13	6.1
3-Chlorophenol	-	0	51	1	0	164	214	52	24

¹ Identification number of this compound (variables) in Principal Component Analysis and Figures 3, 4 and 5

² nd= not detected

³ percentage of positive samples

of samples) and nc columns (number of principal components) and $V^T(nc,m)$ is the loadings matrix with nc rows (number of principal components) and m columns (number of variables). The number of components is selected to reduce the residual unexplained variance or noise in matrix $N(n,m)$ up to a reasonable level. The principal components in matrices U and V^T give the sources of independent (orthogonal) data variation and they are ordered by maximum explained variance. Thus, the first principal component explains maximum variance of D , the second one explains the maximum variance once the variance explained by the first component is subtracted, and the same successively for the following principal components. The plots of the scores (matrix U) and of the loadings (matrix V^T) are very useful in the visual inspection and interpretation of the data structure and properties. Source identification, cluster of samples and correlation between variables may be studied using these score and loadings plots [9,12]. Score plots allow the deduction of the geographical and temporal distribution of the detected contamination sources, mapping the samples and showing their differences and similarities. Loading plots allow source identification and map the more important variables for each principal component detecting the major correlations between them.

Experimental data were initially autoscaled, i.e. the variables (organic compound concentrations) were mean centered and scaled to unit variance. Mean centering removes constant background contributions (9-11), which are of no interest for data variance interpretation. In this particular case, mean centering produced little effect on the results since most of the values of every variable were very low and their average was usually also a low value close to zero. Scaling to unit variance had a more significant effect since it increased the weight of those variables with lower variances. In some cases, this effect may distort the results of the data analysis, especially if these variables have very few values larger than the detection limit. In this study, however, those organic compounds (variables) having very few values above the detection limit were already removed before PCA was applied, and only those ten organic compounds which were most frequently detected giving a significant number of values larger than the detection limit were considered.

Data analysis was carried out using PLS Toolbox MATLAB software (Eigenvector Research. *PLS Toolbox version 2.0*; Manson, WA, 1998)

RESULTS AND DISCUSSION

Results of the monitoring study

From the 72 compounds investigated, tributylphosphate, atrazine, simazine, Irgarol, terbuthylazine, alachlor, metolachlor, 2,4,6-trichlorophenol, pentachlorophenol, propanil, dimethoate, lindane, linuron, 2-chlorophenol, 3-chlorophenol and also *o,p'*-DDE, *o,p'*-DDD, *o,p'*-DDT, malathion, deethylatrazine, were the main detected

compounds. The main results obtained are presented in Table 2.

Atrazine, simazine, alachlor, metolachlor, propanil, terbuthylazine, malathion, linuron, lindane are pesticides with agricultural use. In the spring, after application, the concentrations of the herbicides atrazine, alachlor and simazine in surface waters could reach levels between 5 and $10 \mu\text{g l}^{-1}$, 3 to 10 times greater than the US EPA maximum contaminant levels. Atrazine was detected in approximately 70% of the samples (Table 2), although about 67% of the detected values (47% of total analyzed samples) were below $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$. Concentration values of atrazine are illustrated in Figure 2A for selected samples in the six months monitoring study. Deethylatrazine (DEA), a degradation product of atrazine, was only detected in 20% of analyzed samples at levels around $0.14\text{-}0.46 \mu\text{g l}^{-1}$.

Simazine was always as ubiquitous as atrazine, although about 58% of the detected values were below $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$. Selected results are illustrated in Figure 2B. It was mainly detected in the Guadiana river sites; 'Monte da Vinha' (site 37), 'Pulo Lobo' (site 39) and 'Cais de Alcoutim' (site 40), respectively (see map in Figure 1). One exception was observed for the site 'Ponte Moreira' (site 7) on the north coast in September, with a value of $2.3 \mu\text{g l}^{-1}$. These sporadic high values can be attributed to its non-agricultural use in Spain. The tendency for decreasing values of simazine only begins in June. The results show that there are some differences during the sampling period and that there is a relationship with the increase of simazine with the agricultural activities in the evaluated area.

Detected values for atrazine ($2.7 \mu\text{g l}^{-1}$) and alachlor ($5.4 \mu\text{g l}^{-1}$) in April, both for site 'Alvalade do Sado', were very high, since in this area, south of Lisbon, there is a high agricultural activity. Terbuthylazine was mainly detected in two sites; 'Alb. Póvoas e Meades' and 'Porto da Carvoeira', with greater values observed for the first. Mean concentration values were $1 \mu\text{g l}^{-1}$ in both sites, due to high agricultural activities in these areas. Due to the fact that atrazine can leach and reach ground water [15], its use has been banned in several countries and often has been replaced by terbuthylazine. The site 'Monte da Vinha' in the Spain border, always showed positive values for many of these compounds, although a tendency for decreasing values from April to September was also observed, mainly for atrazine, alachlor and metolachlor, due to their application period (spring). *o,p'*-DDT and its degradation products *o,p'*-DDD and *o,p'*-DDE were detected below $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ during August, mainly in the coastal water samples 'Formosa_Faro' and 'Formosa_Olhão', probably due to resuspension from the sediment. Malathion was detected in 'Formosa_Faro' reaching $0.18 \mu\text{g l}^{-1}$, due to local treatments.

Irgarol was also investigated and detected in 33% of the samples. The majority of values (29%) were below $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$, with exceptions for the site 'Formosa_Faro' (site 45), coastal water, but the greatest values observed were for 'Portos' (site 5) in September. Results are shown in Figure 2C. Irgarol is

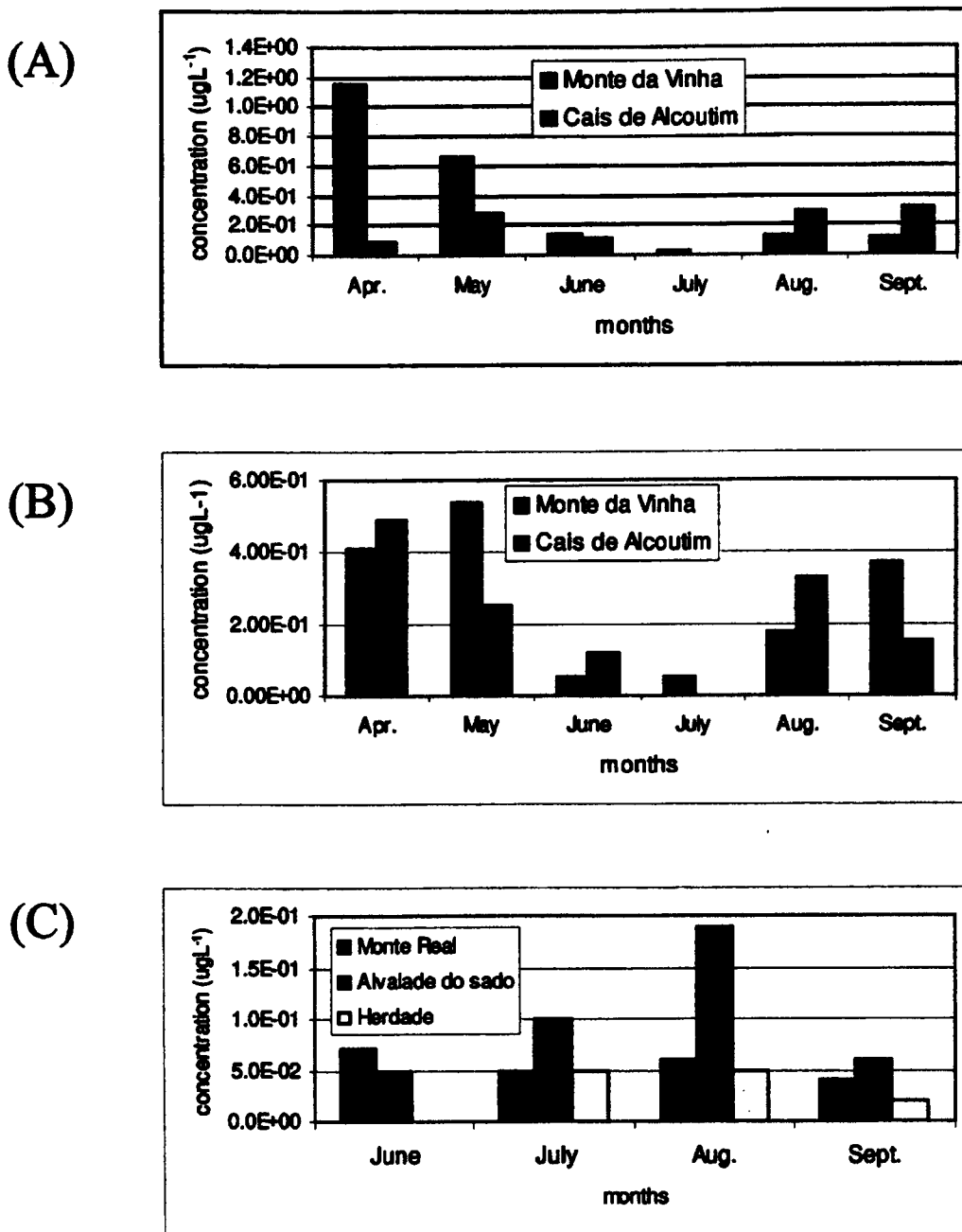


Figure 2. Concentration of atrazine (A), simazine (B) and Irgarol (C) from April until September 1999 in selected sites with high levels of total triazine. See Table 1 for sample codes.

used as antifouling herbicide. Irgarol has been recently detected in coastal water samples, mainly in marine sites, by GC/MS or LC/MS [16-22]. In this monitoring, Irgarol was detected in river water as boating activities occur on these rivers. Irgarol is added to ship/boat paints to prevent fouling and diffuses into the surrounding waters and contaminates the aquatic environment. Observed values were between 0.006 to 0.42 $\mu\text{g l}^{-1}$. Although Irgarol is not present in the EEC

76/464 Directive, its presence was investigated as this compound has been detected in coastal waters in previous works of our group [16-17].

Trichlorophenol, pentachlorophenol and tributylphosphate are used in industrial applications. Tributylphosphate was detected in 88% of analyzed samples. Values below 0.1 $\mu\text{g l}^{-1}$ were 72% of these positive samples. However, it was always detected at very high values

(2.5-5.3 $\mu\text{g l}^{-1}$) in Portos, which is an industrialized area, in May, June, July and September. Tributylphosphate has been widely used since the 1940s in industrial and domestic products such as fire retardant plasticizers and high temperature functional fluids [24]. In Spain, in the rivers Llobregat and Besos, concentrations of tributylphosphate during 1985-1986 were usually below 0.1 $\mu\text{g l}^{-1}$ with incidental values of 14-24 $\mu\text{g l}^{-1}$ [25]. Pentachlorophenol and 2,4,6-trichlorophenol were also detected in many samples. 2,4,6-trichlorophenol was generally detected at trace level (0.02-0.4 $\mu\text{g l}^{-1}$) while higher values (0.5-2.3 $\mu\text{g l}^{-1}$) were observed during June and August. Chlorophenols are used in many industrial activities (tannery and textiles industries) in the north of Portugal and they have been investigated in previous work [23].

Results of the exploratory data analysis

Only ten organic compounds were finally selected for the exploratory data analysis. As previously stated these compounds were detected in many samples, with a larger number of positive concentration values (more than 10%), above their detection limit. Figure 3 gives the boxplot of the reduced autoscaled data set. This plot is used for descriptive statistical analysis. For each variable, the boxes contain 50% of all the data measured for that variable centered at its median

(line inside the boxes) and the stars indicate the larger values observed for this variable (larger than 1.5 times the interquartile range marked by a horizontal line). The interquartile range is a robust estimate of the spread of the data since the changes in the upper and lower 25% of the data do not affect it. As is clearly seen from this plot, the distribution of the values shown in Figure 3 is highly skewed, with the median of the autoscaled variables (mean centered and divided by their standard deviation) always close to zero, since these are the more frequently observed values once they were centered. Relatively high correlations were only observed between variables 1 (atrazine) and 5 (alachlor) with a correlation coefficient of 0.87 and also between them and with variable 10 (propanil) with correlations of 0.65 and 0.68 respectively. These three organic compounds are of agricultural use and the relatively high correlations could confirm that these three compounds have a common origin. All the other correlations were relatively low (with correlation coefficients below 0.5) or very low (with correlation coefficients below 0.1), showing a rather independent behavior from the rest of variables.

For autoscaled data, five principal components were needed to explain more than the 75% of the data variance. Loadings plots for the first four principal components are given in Figure 4. Atrazine (variable 1), alachlor (variable 5) and propanil (variable 10), all of them of agricultural origin, are the major contributors to first Principal Component, PC1.

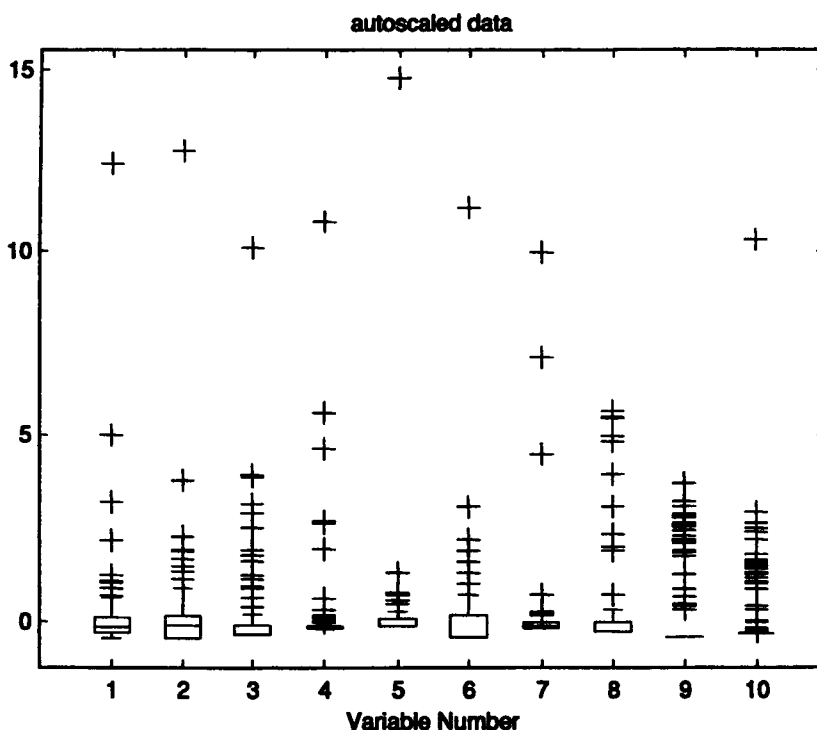


Figure 3. Boxplot indicating variable number (compounds, see table 2 for identification) and concentration ($\mu\text{g l}^{-1}$). Each variable has 46x6=276 measured values. For each variable, the box has lines at the lower quartile (0 $\mu\text{g l}^{-1}$ concentration) indicating the amount of negative samples.

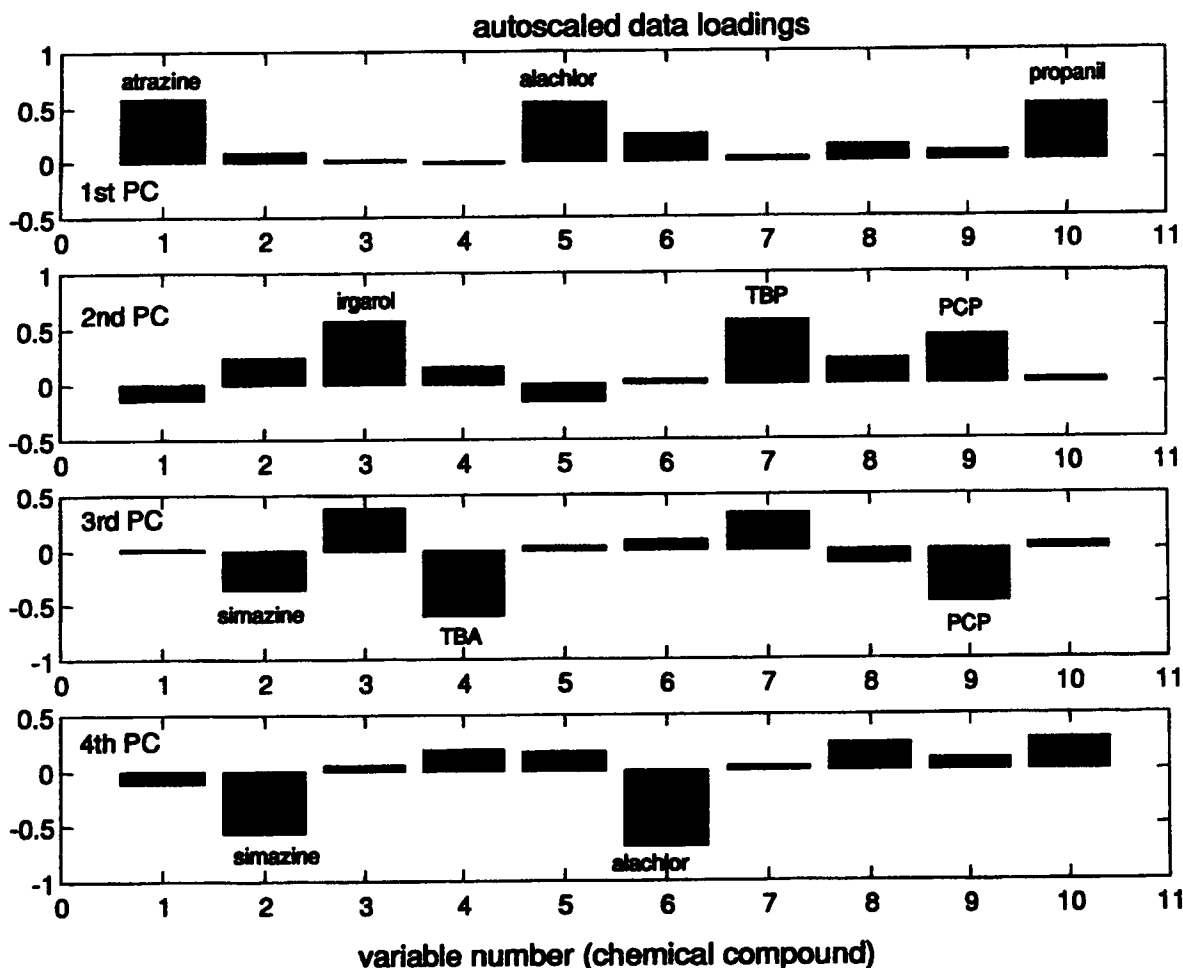


Figure 4. Source composition profile resolved by Principal Component Analysis. Variable number in x-axis refers to the analytes (see table 2 for compound identification) and y-axis indicates the relative concentration (contribution) of each principal component.

The percentage of explained variance for this first PC was around 27%. Score plots for autoscaled data in Figure 5A show that the samples with higher scores in the PC1 axis were 'Alvalade do Sado' in April and 'Monte da Vinha' also in April, both riverine samples in the central and southern part of Portugal with high agricultural activities (Table 1). 'Monte da Vinha' is on the Spanish border and also receives the impact of agricultural activities in Spain. Taking into account the loadings (Figure 4) and scores (Figure 5A), the first principal component is clearly associated with a major input source of contamination from the more frequently used herbicides in agricultural practices.

The second principal component PC2, was mostly loaded with Irgarol (variable 3), TBP (variable 7) and PCP (variable 9) and explained a 16 % of the autoscaled data variance. As already mentioned, Irgarol is related with antifouling herbicides for boat painting and TBP and PCP are

of industrial origin. 'Portos' (September, May, June and July) and 'Ponte Moreira' in September are the samples with higher scores on the PC2 axis (also in Figure 5A). These two sampling sites are in the northern part of Portugal, close to the coast of Porto and they are mostly affected by industrial activities. Therefore, this second principal component describes a second major input source of contamination related to industrial activities.

In the third principal component PC3, (13 % of explained variance), simazine (variable 2), TBA (variable 4) and PCP (variable 9) had high negative loadings, whereas Irgarol and TBP had positive loadings. Several samples were spread along the PC3 axes in Figure 5B. On the left of the plot, the samples with higher negative scores were taken at "Ponto de Carvoeira" in April, "Alb. Povia e Meadas" in May, July, August and September, "Ponte Moreira" in September (which also has high scores on fourth Principal Component, PC4),

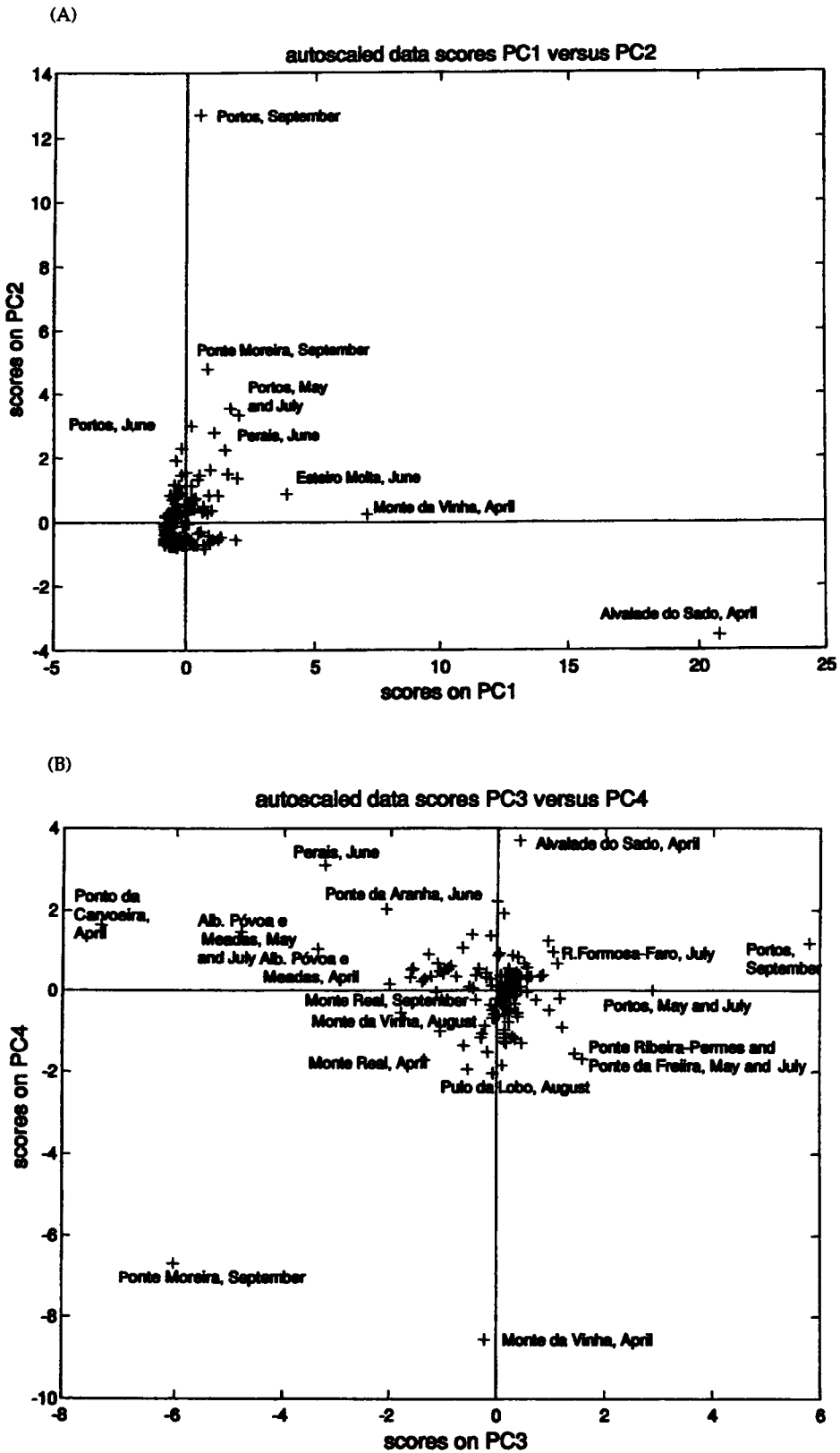


Figure 5. Autoscaled data scores of (A) Principal Component 1 vs. Principal Component 2 and (B) Principal Component 3 vs. Principal Component 4, indicating sites and periods of highest levels of studied pollutants and of environmental relevance.

"Ponte Aranha" in June, "Monte da Vinha" in August and "Monte Real" in April and September. These samples had high concentrations of simazine, TBA and PCP and they are distributed over different regions of Portugal with mixed industrial and agricultural activities. On the contrary, at the right hand of the PC3 axis of the plot, with high positive scores on PC3 and correspondingly, with low concentrations of simazine, TBA and PCP and high concentrations of Irgarol and TBP, appeared the samples analyzed at 'Portos', 'Ponte da Ribeiro-Fernes' and 'Ponte de Freira' in May and July. All these locations are located close to industrial activities.

Finally, the forth-principal component, PC4 (11% of explained variance), had high negative loadings for simazine (variable 2) and alachlor (variable 6), showing that these two variables could also have a different input source to that detected in the other principal components. PC4 gave high negative scores for 'Monte da Vinha' in April and for 'Ponte Moreira' in September. These two samples had high concentrations of simazine and alachlor, although the latter also gave high loadings for TBA and PCP and consequently, high scores also in PC3.

CONCLUSIONS

A pilot monitoring program carried out in Portugal during a 6 month period determined the 10 most ubiquitous compounds out of 72 priority semivolatile organic pollutants systematically analyzed. Due to the great number of data generated, exploratory data analysis by PCA has been used to determine the major input sources (industrial and agricultural) and the more important correlations between the

studied pollutants. Spatial (geographical) and temporal distribution of the main contamination sources were also estimated from PCA. The highest contaminated areas were detected in the industrial North around Porto from April to September and in the more agricultural central part of Portugal (from 'Monte da Vinha' to 'Esteiro Molta' and 'Alvalade do Sado'), especially in spring and the beginning of summer (from April to July). Looking at the principal component plots, most of the values measured during the month of August for the ten selected organic compounds were usually lower than those measured during the other months. This can be related to the decrease on industrial and agricultural activities during this month. Results obtained by PCA summarized in a rational way that most of the results are in agreement with those observed in a laborious and detailed visual inspection of the monitoring values. However, PCA allowed a more global, faster and thorough description of the main sources of environmental contamination and of their geographical and temporal distributions.

ACKNOWLEDGEMENTS

D. A. Azevedo acknowledges the grant from CNPq, a Brazilian research support organisation. Direção Geral do Ambiente, Ministério do Ambiente (Portugal) is acknowledged for financial support to this project. Rosa Maria Alonso and Roser Chaler are acknowledged for technical assistance. This work has been supported by the MAST-III of the European Communities ACE (MAS3-CI98-0178) and CITYT (MAR1999-1673-CE).

REFERENCES

1. Barceló D. and Hennion M.C., *Trace Determination of Pesticides and their Degradation Products in Water*. Elsevier Science, Amsterdam, ISBN. 0-444-81842-1 (1997).
2. Fielding M, Barceló D, Helweg A, Galassi S, Tortenson L, Van Zoonen P, Wolter R and Angeletti G., Pesticides in ground and drinking water. In: *Water Pollution Research Report 27*, Commission of the European Communities, Brussels, 1-136 (1992).
3. Lacorte, S., Puig, D. and Barceló, D. In: *Sample Handling Of Organic Pollutants (Pesticides And Phenols) in Water Matrices By HPLC, Handbook of HPLC*, Katz, E.; Eksteen, R.; Schoenmakers, P.; Miller, N. (Eds), Marcel Dekker INC, NY. ISBN: 0-8247-9444-3 (2000).
4. Brower E.R., Kofman S. and Brinkman U.A.Th., Selected procedures for the monitoring of polar pesticides and related microcontaminants in aquatic samples, *J. Chromatogr. A*, **703**, 167-190 (1995).
5. Psathaki, M., Manoussaridou, E., Euripides, G. and Stephanou, G., Determination of organophosphorus and triazine pesticides in ground and drinking water by solid phase extraction and gas chromatography with nitrogen phosphorus or mass spectrometric detection, *J. Chromatogr. A*, **667**, 241-248 (1994).
6. Lacorte, S., Molina, C. and Barceló, D. Screening of organophosphorus pesticides in environmental matrices by various gas chromatographic techniques. *Analyt. Chim. Acta*, **281**, 71-84 (1993)
7. Fernandez-Alba A. R., Agüera A., Contreras M., Peñuela G., Ferrer I. and Barceló D., comparison of various sample handling and analytical procedures for the monitoring of pesticides and metabolites in ground waters, *J. Chromatogr. A*, **823**, 35-47 (1998).
8. Lacorte S., Guiffart I., Fraise D. and Barceló D., Broad spectrum analysis of 109 priority compounds listed in the 76/464/CEE Council Directive using solid-phase extraction and GC/EI/MS, *Analyt. Chem*, **72**, 1430-1440 (2000).

9. Tauler, R., Interpretation of environmental data using Chemometrics, In: *Sample Handling and Trace Analysis of Pollutants: Techniques, Applications and Quality Assurance*. Barceló D. (ed.), Elsevier Science, Amsterdam, pp 689-734 (1999).
10. Einax J.W., Zwaninger H.W. and Geiss, S., *Chemometrics in Environmental Chemistry*, VCH, Weinham (1997).
11. Vandeginste B.G.M., Massart D.L., Buydens L.M.C., De Jong S., Lewi P.J. and Smeyers-Verbeke, J., *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*, Elsevier Science, Amsterdam (1998).
12. Salou J., Tauler R., Bayona J.M. and Tolosa I., Input characterization of sedimentary organic chemical markers in the north western Mediterranean Sea by exploratory data analysis, *Environ. Sci. Technol.*, **31**, 3482-3490 (1997).
13. Azevedo D.A., Lacorte S., Vinhas T., Viana P. and Barceló D., Monitoring of priority pesticides and other organic pollutants in river water from Portugal by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **879**, 13-26 (2000).
14. Barceló D., Environmental Protection Agency and other methods for the determination of priority pesticides and their transformation products in water, *J. Chromatogr.*, **643**, 117-143 (1993).
15. Tauler R., Barceló D. and Thurman, E.M., Multivariate correlation between concentrations of selected herbicides and derivatives in outflows from selected u.s. midwestern reservoirs, *Environ. Sci. Technol.*, **34**, 3307-3310 (2000).
16. Ferrer I., Ballesteros B., Marco M.P. and Barceló, D., Pilot survey for determination of the antifouling agent irgarol 1051 in enclosed seawater samples by a direct enzyme-linked immunosorbent assay and solid-phase extraction followed by liquid chromatography-diode array detection, *Environ. Sci. Technol.*, **31**, 3530-3536 (1997).
17. Martínez K., Ferrer I. and Barceló D., Part per trillion determination of antifouling pesticides and their byproducts in seawater samples by off-line solid-phase extraction followed by high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **879**, 27-37 (2000).
18. Readman J.W., Wee Kwong L.L., Grondin D., Bartocci J., Villeneuve J. P. and Mee L. D., Coastal water contamination from a triazine herbicide used in antifouling paints, *Environ. Sci. Technol.*, **27**, 1940-1942 (1993).
19. Tolosa I., Readman J. W., Blaevoyt A., Ghilini S., Bartocci J. and Horvat, M., Contamination of Mediterranean (Cote d'Azur) coastal waters by organotin and irgarol 1051 used in antifouling paints, *Mar. Pollut. Bull.*, **32**, 335-341 (1996).
20. Gough M. A., Fothergill J. and Hendrie J. D., A survey of southern England coastal waters for the s-triazine antifouling compound Irgarol 1051, *Mar. Pollut. Bull.*, **28**, 613-620 (1994).
21. Tóth S., Becker van Slooten K., Spack L., de Alencastro L. F. and Tarradellas J., Irgarol 1051, an antifouling compound in freshwater, sediment and biota of Lake Geneva, *J. Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **57**, 426-433 (1996).
22. Thomas K. V., Determination of selected antifouling booster biocides by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **825**, 29-35 (1998).
23. Castillo M., Alonso M. C. and Riu J., Barceló D., Identification of polar, ionic and highly soluble organic pollutants in untreated industrial wastewaters, *Environ. Sci. Technol.*, **33**, 1300-1306 (1999).
24. Barceló D., Porte C., Cid, J. and Albaigés J., Determination of organophosphorus compounds in Mediterranean coastal waters and biota samples using gas chromatography with nitrogen phosphorus and chemical ionization mass spectrometry, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **38**, 199-209 (1990).
25. Gómez-Belinchón J. I., Grimalt J. O. and Albaigés J., Analysis and persistence of tributyl phosphates in riverine and marine coastal waters, *Chemosphere*, **17**, 2189-2197 (1988).

Artículo científico número 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. (2004) Vol. 23. 565-575

CHEMOMETRIC MODELING OF MAIN CONTAMINATION SOURCES IN SURFACE WATERS OF PORTUGAL

ROMÀ TAULER,*† SILVIA LACORTE,‡ MIRIAM GUILLAMÓN,‡ RAQUEL CESPEDES,‡ PAULA VIANA,§ and DAMIA BARCELÓ‡

†Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Diagonal 647, Barcelona 08028, Spain

‡Department of Environmental Chemistry, IIQAB-CSIC, Jordi Girona 18-26, Barcelona 08034, Spain

§Direção Geral do Ambiente, Ministerio do Ambiente, Rua da Murgueira, Zambujal, 2720, Amadore, Portugal

(Received 26 March 2003; Accepted 25 July 2003)

Abstract—Various chemometric data analysis methods, such as principal components analysis, multivariate curve resolution–alternating least squares, parallel factor analysis, and Tucker3, are proposed and compared for the resolution and modeling of main contamination sources in a large environmental data array obtained in an exhaustive environmental monitoring program that examined the quality of surface waters of Portugal. The study covered the analysis of 19 priority semivolatile organic compounds (SVOCs) frequently found in a total number of 644 surface water samples, including 46 different sites from throughout Portugal and corresponding to a period of 14 months, from April 1999 to May 2000. Main contamination sources of the analyzed SVOCs were identified and interpreted according to their chemical composition and according to their resolved geographical and temporal distribution profiles.

Keywords—Environmental chemometrics Principal components analysis Multivariate curve resolution Contamination sources Portugal

INTRODUCTION

Combating pollution is one of the priority activities [1,2] imposed by the European Union, in view of improving the quality of life and living resources. Pollution caused by agricultural and industrial activities is the main source for the poor environmental quality situation among the European Union countries. Poorly managed agricultural operations can lead to pollution of surface and groundwater by nitrates and other nutrients as well as pesticides. Industries may be the source of metals and other organic pollutants into the environment. Point-source pollution caused by spills, runoff, wastewater, and urban sludge is increasingly under control, and management actions and implementation of routine controls lead to potential benefits such as improved water quality. European policy actions include minimization of point-source pollution and elimination of historic pollution that is already confined in soils, sediments, and groundwater. However, the currently emerging problem is more related to diffused persistent pollution, because the majority of point-source pollution has been intercepted in Europe and brought under control. The borderline between these two types of pollution, point source and diffused source, is difficult to establish. Diffused pollution cannot be easily identified and the concentration levels at which the division should be made between diffused and point-source pollution is difficult to establish. Diffused pollution is caused by the regular use of various types of pollutants at low concentrations that are, after application, spread to the environment by means of runoff, dispersion, and diffusion. These pollutants can be found in river waters at trace levels, but their presence also has been reported in coastal

waters and lakes, suggesting that mobilization can occur and that they can be found far away from the focus of application. Monitoring programs have been implemented in many countries, but treatment of data and interpretation of results is still needed to enhance improvement actions.

Chemometrics [3] provides powerful tools for resolution and modeling of large environmental multivariate data arrays generated within environmental monitoring programs [4]. The goal of these studies is the computation, resolution, modeling, screening, and graphical display of patterns in large data sets, looking for possible groupings and sources of data variation, as well as for their temporal and geographical distributions. The fundamental assumption of multivariate exploratory data studies is that measured concentrations of contaminants are due to a reduced number of contamination sources of different origin (industrial, agricultural, and others) and that these sources can be modeled by profiles describing their chemical composition and their geographical and their temporal distributions [5,6]. Large environmental analytical data arrays containing concentration information on multiple chemical compounds collected at different sampling sites and at different sampling periods are arranged in large tables, data matrices, or in more complex data arrays according to various methods or modes of experimental measurement [7]. In the chemometrics literature, these complex ordered data arrays are commonly called multiway or multimode data arrays [8,9].

Principal components analysis (PCA) [10,11] is one of the multivariate data analysis methods frequently used in exploratory analysis and modeling of two-way data arrays (data tables or data matrices). Principal components analysis allows the transformation and visualization of complex data sets into a new perspective in which the more relevant information is made more obvious. By using PCA, main con-

* To whom correspondence may be addressed
(roma@apolo.qui.ub.es).

tamination sources may be resolved and their geographical and temporal distributions may be interpreted and further investigated. A possible complementary method proposed to achieve similar goals is the multivariate curve resolution–alternating least squares (MCR-ALS) method [12,13]. Although this method is traditionally used for curve resolution purposes [14], that is, to resolve spectra and concentration profiles having a smooth curved shape [15–17], there is no fundamental reason for this method not to be used also for resolution and modeling of noncurved and nonsmooth type of profiles, including those describing geographical and temporal pollution patterns obtained in environmental data studies.

Either PCA or MCR-ALS can be easily extended to complex data arrays ordered in more than two ways or modes, giving three-way data arrays (data cubes or paralelipeds) or multiway data arrays. In PCA and MCR-ALS, before data analysis, the multiway data set is unfolded to give an augmented two-way data matrix and the resolved two-way profiles can be transformed afterwards to recover the profiles in the three modes. However, the state of art of multiway data analysis includes other methods where the structure of the multiway data is explicitly built into the model and fixed during the resolution process. Among these methods, those based on parallel factor analysis (PARAFAC) and Tucker3 multiway models have been proposed and used in recent years [3,8,9,18,19], and they also have been used for the analysis of environmental data sets [9,20–22].

In the present work, all of these approaches, including multiway PCA, MCR, PARAFAC, and Tucker3-based methods, have been applied and compared for the analysis of a data set obtained in a very exhaustive and systematic monitoring program in Portugal, covering 19 priority semi-volatile organic compounds (SVOCs) in a total number of 644 surface water samples at 46 different geographical sites from throughout Portugal and covering a period of 14 months, from April 1999 to May 2000. Preliminary studies covering experimental details and a much more reduced data set already have been published [23,24]. Summarizing, the main objectives of this work were to compare how different chemometric methods including multiway PCA, MCR-ALS, PARAFAC-ALS, and Tucker3-ALS, have been applied in the investigation of a large environmental monitoring data set; to identify the main contamination sources of SVOCs in surface waters of Portugal; to resolve and model the geographical and temporal distributions of these contamination sources; and to distinguish between emission point and diffused main sources of pollution.

MATERIALS AND METHODS

Experimental data

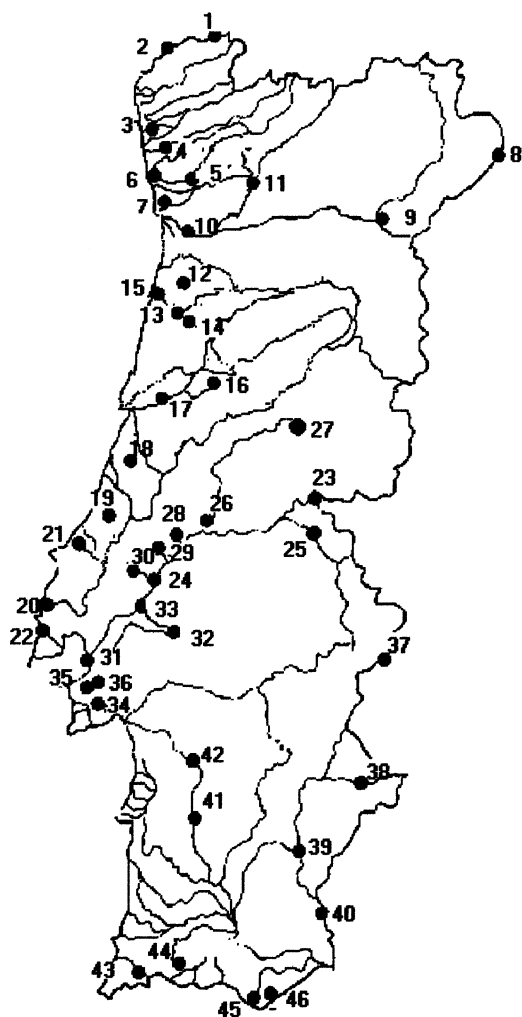
Experimental details concerning sampling strategy and quality assurance were reported in previous works [23,24]. Surface water samples were collected at 46 different geographical sites (see map and sampling sites in Fig. 1). In Figure 1, these sampling sites are identified by a code number and also are listed with their land use and main activities and inputs. These code numbers have been used throughout this work to identify the samples, especially in the plots giving the geographical distribution of contamination sources. Code numbers increase from north to south, that is, lower code numbers refer to sampling sites in northern sampling sites and higher code numbers refer to southern sampling

sites. Most of the samples were taken from rivers (riverine type) throughout Portugal, except sample sites 34, 35, and 36, which were from Tejo Estuary (estuarine type), and sampling sites 45 and 46, which were in the south at the Algarve Atlantic coast (coastal type). Water samples were obtained monthly over a period of 14 months, from April 1999 through May 2000. The sampling periods are identified by a code number from 1 (April 1999) to 14 (May 2000). The months of April and May were repeated in the 2000 campaign to get an approximate picture of a one-year cycle. These two months were of special interest because this is when most pesticide treatments were performed.

As a part of a more general study, special emphasis has been given to the widespread presence of semivolatile organic pollutants more frequently detected at levels higher than 0.1 $\mu\text{g/L}$. Concentrations of 0.1 $\mu\text{g/L}$ and higher of these compounds are of environmental and ecotoxicological concern and of relevance in the European Union drinking water directives [1,2]. Identification and statistical distribution of the 19 most frequently detected SVOCs in surface waters throughout the 14-month monitoring campaign showed that many of the values found for each of these 19 SVOCs were rather low values, with averages close to zero. Most of the observed variance was caused by the values in the upper quartile (75–100%) [25], indicative of more heavily contaminated samples. Out of a total of 12,236 values, 457 values (i.e., 3.88%) were missing. Many of these missing values were found for particular samples or for particular time periods, which indicated sampling problems. For instance, for pentachlorophenol, the first 92 entries corresponding to April and May 1999 were systematically missing. From the total of 12,236 values, 9,438 (71.13%) were below the limit of detection. However, looking at this situation from another point of view, as much as approximately 29% of the measured values were at relatively high concentrations, most of them at higher concentrations than allowed in the European Union drinking water directives (0.1 $\mu\text{g/L}$). This chemometrical data analysis and modeling study is focused toward the distribution of these larger values, in an attempt to discern the main contamination sources of these larger values and to resolve and model their geographical and temporal distributions. To be able to do this and to apply the proposed multiway data analysis methods (see next sections), the entire ordered sparse data array structure was kept, including the very large number of low concentration values in many of the 46 sampling sites during the 14 months of the study.

Initial data arrangement and pretreatment

Although many other organic compounds were initially investigated, only those 19 SVOCs more frequently found were considered for multivariate data analysis. Data were initially organized in 14 data tables or matrices, each of them corresponding to one month of the sampling campaign, giving data arrays of 46 rows corresponding to the 46 different sampling sites (Fig. 1), and 19 columns corresponding to the 19 analyzed SVOCs. The compounds finally considered for the study were alachlor, atrazine, bentazone, biphenyl, 3-chlorophenol, 4-chlorophenol, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), dichloroprop, dimethoate, linuron, 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid, mecoprop, 4-chloro-3-methylphenol, metholachlor, pentachlorophenol, simazine, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid, tributylphosphate,



Nº	Sample Points	River	Activities
1	Peso de Melgaço	Mínho	Agricultural (corn, wines)
2	Valença	Mínho	Agricultural (corn, wines)
3	Forjaes	Neiva	Agricultural (corn, wines)
4	Ponte Nova Barcelos	Cávado	Agricultural (corn, wines)
5	Portos	Ave	Industrial (textil)
6	Formariz	Ave	Industrial (textil)
7	Ponte Moreira	Leça	Industrial (textil)
8	Alb. de Miranda do Douro	Douro	Agricultural (wine, olives)
9	Alb. do Pocinho	Douro	Agricultural (wine, olives, almond)
10	Alb. Crestuma-Lever	Douro	Agricultural (wine)
11	Ponte de Canavezes	Távoga	Agricultural (wine)
12	Ponte Minholeira	Antua	Industrial (paper), Agricultural
13	Ponte S. Joao de Loura	Vouga	Industrial (paper), Agricultural
14	Ponte Óis de Ribeira	Águeda	Industrial (paper), Agricultural (wine)
15	Ria Aveiro	Aveiro	Industrial (paper), Agricultural (wine)
16	Ponte Penacova	Mondego	Agricultural (olives)
17	Ponte Formoselha	Mondego	Agricultural (rice)
18	Monte Real	Lis	Industrial, Agricultural (rice)
19	Fervenças	Alcobaça	Agricultural (corn)
20	Ponte da Aranha	Sizandro	Agricultural (vegetables)
21	Rio da Cal	Cal	Agricultural (corn), vegetables)
22	Porto da Cavoeira	Lisandro	Agricultural (vegetables)
23	Perais	Tejo	Industrial (paper)
24	Omnias	Tejo	Industrial, Agricultural (vegetables)
25	Alb. Póvoa e Meadas	Nisa	Industrial (paper)
26	Alb. Castelo do Bode	Zézere	Agricultural (olives)
27	Domelas do Zézere	Zézere	Agricultural (olives)
28	Ponte Nova	Almonda	Industrial, Agricultural
29	Ponte da Ribeiro-Pernes	Alviela	Industrial (textil)
30	Ponte de Freiria	Maior	Agricultural (vegetables)
31	Ponte Sacavém	Tranco	Industrial, Agricultural (vegetables)
32	Praia de Coruche	Sorraia	Agricultural (rice, corn)
33	Valada	Tejo	Agricultural (vegetables, rice)
34	Esteiro Coina	Tejo	Industrial (paper), Agricultural (rice)
35	Esteiro Seixal	Tejo	Industrial, Agricultural (vegetables)
36	Esteiro Moita	Tejo	Industrial, Agricultural (vegetables)
37	Monte da Vinha	Guadiana	Agricultural, Industrial (paper recycling)
38	Ardila-captação	Ardila	Agricultural (olives, oak)
39	Pulo do Lobo	Guadiana	Agricultural (oak)
40	Cais de Alcortim	Guadiana	Agricultural (wines)
41	Alvalade do Sado	Sado	Agricultural (corn, oak)
42	Herdade de Portancho	Sado	Agricultural (corn)
43	Bensafrim	Bensafrim	Agricultural (greenhouses)
44	Rio Arade	Arade	Agricultural (citrics)
45	R. Formosa Faro	Ria Formosa	Agricultural (almond, greenhouses)
46	R. Formosa Olhão	Ria Formosa	Agricultural (almond, greenhouses)

Fig. 1. Geographical area under study (Portugal). Sampling sites are identified by code numbers and sample location and main activities also are given. Sampling sites with lower code numbers are in northern Portugal and sampling sites with higher code numbers are in southern Portugal.

and 2,4,6-trichlorophenol. On the whole, the data set was arranged in two different ways, as one single columnwise augmented large concentration data matrix of dimensions 644×19 (see Fig. 2A), or as a three-way concentration data cube of dimensions $46 \times 19 \times 14$ (see Fig. 2B and C). In the columnwise augmented concentration data matrix, the concentration data matrices from different months were arranged consecutively one in top of the other. The three-way data cube was formed by the 14 frontal slices (data matrices), all of them with 46 rows (sampling sites) and 19 columns (SVOCs). This data cube structure is characterized by three modes, that is, the geographical mode (46 sampling sites), the composition mode (19 SVOCs), and the temporal mode (14 months). In the columnwise augmented data matrix, only one of these three modes is explicit in its columns and not confounded, the composition mode (19 SVOCs). The other two modes (geographical and temporal) are mixed and confounded in the rows of the columnwise data matrix.

Semivolatile organic compound concentration values below the limit of detection and nondetected values were set to one half of the detection limit value. Missing values were

estimated by PCA by using MATLAB (The Mathworks, Natick, MA, USA) PLS Toolbox software (Eigenvector Research, Mason, WA, USA). Different data pretreatment methods were tested and compared. They included column mean centering, column autoscaling, and log transformation. They were performed on the columns of the columnwise augmented data matrix shown in Figure 3. In multiway data analysis, this columnwise data scaling usually is called *j*-scaling. Similarly, for the data arranged in the three-way data cube structure, the data also were pretreated in the same way as for the columnwise augmented data matrix before they were finally arranged in the data cube. Column mean centering removed constant background contributions, which usually were of no interest for data variance interpretation. However, in these particular water samples, mean centering caused little change in the results because most of the values of the different SVOCs in water were low and their averages were close to zero. Column scaling to unit variance increased the weight of variables that initially had the lowest variances. In some cases, this effect would significantly distort the data analysis, making the interpretation

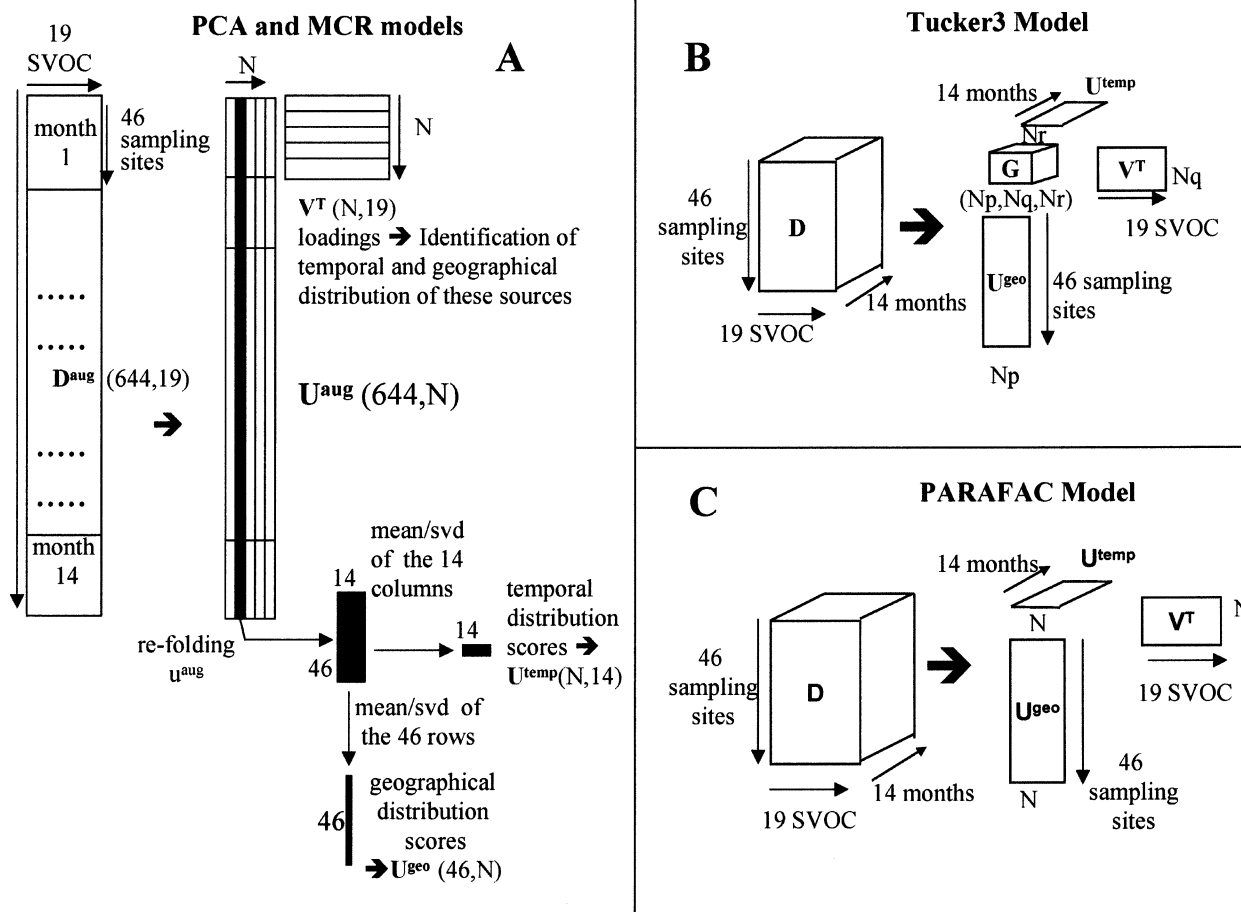


Fig. 2. (A) Bilinear model for principal components analysis (PCA) and multivariate curve resolution (MCR) of augmented data matrix D^{aug} (644,19) when using Equation 2. The U^{aug} (644, N) and V^T (N ,19) are the resolved augmented scores and loadings matrices considering N components. For a particular contamination source or component n (column filled black), a scores matrix U (46,14) is obtained by refolding the long augmented score column vector element, u^{aug} (644,1). Taking averages of the columns and of the rows of this score matrix, the geographical u^{geo} (46,1) and the temporal u^{temp} (14,1) profile distributions of this contamination source are obtained. Joining them for the N resolved components, U^{geo} (46, N) and U^{temp} (N ,14) new scores matrices are obtained giving the geographical and temporal distributions of the N contamination sources. (B) Tucker3 model of data cube D (46,14,19); the G matrix of the Tucker3 model is the core array matrix whose elements g_{pqr} give the interactions between components in the three modes. (C) Trilinear parallel factor analysis (PARAFAC) model of data cube D (46,14,19). The meanings of U^{geo} , U^{temp} , and V^T in (B) and (C) are the same as in (A) and as described in the manuscript. SVOC = semivolatle organic compound.

of the obtained results more difficult, especially for those variables having only very few values higher than the detection limit.

Log transformation of experimental data is another procedure that frequently has been recommended in the literature for skewed data sets, such as those in environmental studies where the majority of the values are low values with a minor contribution of high values. With log data pretreatment, a more symmetrical distribution of experimental data is expected; however, introduction of nonlinearities in the data structure also may occur. To remove large negative values, a constant value equal to one was added to all the variable entries. In this way, log values always were non-negative (see Fig. 2).

Principal components analysis and multivariate curve resolution–alternating least squares analysis of a columnwise augmented data matrix

First, to investigate the multivariate correlation between variables, identify and resolve the main contamination sources, and model their geographical and temporal distributions, PCA

[10,11] and MCR-ALS [12,13] were applied to the augmented columnwise data matrix D^{aug} as shown in Figure 2. In both cases a linear mixture model was assumed to explain the observed data variance using a reduced number of contamination sources. See previous references [3,10–13] for a more detailed description of these two methodologies. The bilinear data matrix decomposition used in both cases may be written by

$$d_{ij}^{\text{aug}} = \sum_{n=1}^N u_{in}^{\text{aug}} v_{jn} + e_{ij} \quad (1)$$

In this equation, d_{ij}^{aug} is the concentration of SVOC j in the sample i in the augmented experimental data matrix D . The u_{in}^{aug} (score of component n on row i) is the contribution of contamination source n in sample i . The v_{jn} (loading of variable j on component n) is the contribution of SVOC j in contamination source n , and e_{ij} is the residual in sample i variable j of d_{ij} not modeled by the N environmental contamination sources. The same equation can be written in matrix form as

$$D^{\text{aug}} = U^{\text{aug}} V^T + E^{\text{aug}} \quad (2)$$

where D^{aug} is the whole data array arranged in an augmented

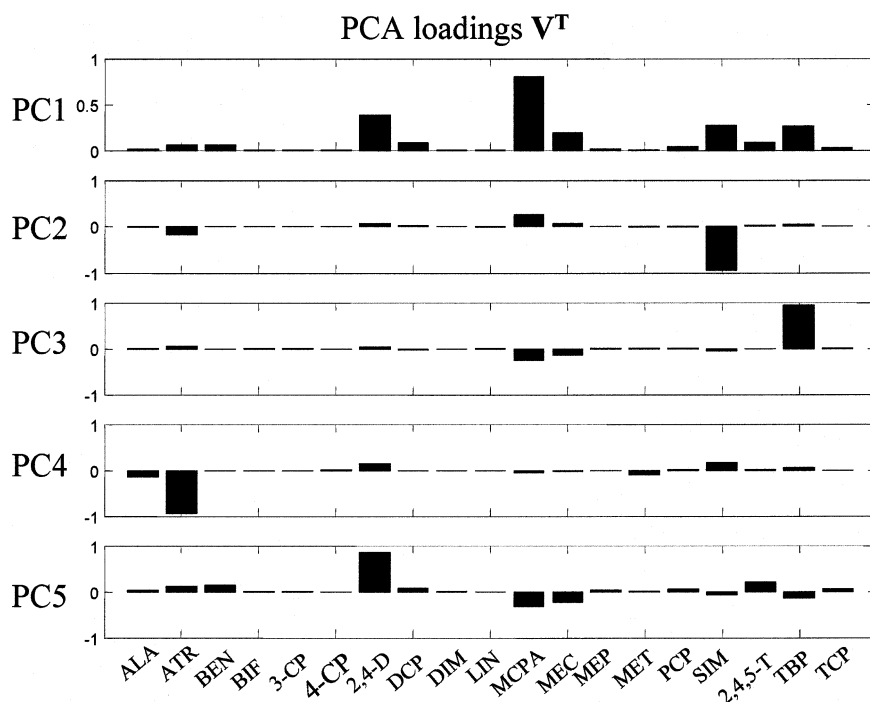


Fig. 3. Principal components analysis (PCA) loadings for the mean-centered augmented data matrix. From top to bottom, first to fifth principal components (PC1–PC5) are given. See Table 1 for compound names and short identifications.

data matrix of dimensions 46×14 rows (46 sampling sites and 14 months) and 19 columns (SVOCs). Equation 2 describes the factorization of the experimental data matrix on two factor matrices, the loadings matrix V^T and the augmented scores matrix U^{aug} . Loadings matrix V^T identifies the nature and composition of the N main contamination sources defined by means of their chemical composition (SVOC concentrations) profiles. Scores augmented matrix U^{aug} gives the geographical and temporal distribution of these contamination sources. This geographical and temporal information appears intermixed (confounded) in the columns of the resolved augmented scores matrix U^{aug} and this information is not directly available from the matrix. In this work, a relatively easy way to recover geographical (U^{geo}) and temporal (U^{temp}) information by proper scores (U^{aug}) rearrangement and averaging or singular value decomposition is proposed and depicted in detail in Figure 2. In this way, U^{geo} , U^{temp} , and V^T (three mode components) were estimated and directly compared with those resolved by three-way model-based methods such as PARAFAC and Tucker3 (see *Results and Discussion*). Finally, E^{aug} gives the residual part of D^{aug} not modeled by the N contamination sources, that is, the unexplained data variance associated with noise and minor nonmodeled environmental contamination sources. The determination of the complexity of the model in PCA and in MCR-ALS, that is, the number of components or contamination sources included in the model, is performed as a compromise between different goals, model simplicity (few components), maximum variance explained by the model (more components), and model interpretability.

Principal components analysis [3,10,11] provides a least squares solution of Equation 1 under orthogonal constraints and maximum explained variance by each successively extracted component, whereas MCR-ALS models give a non-negative least squares solution of the same equation without using orthogonal constraints [12,13] or explanation of maxi-

um variance. Although PCA orthogonal solutions of Equation 2 for a two-way data matrix are unique, MCR-ALS solutions of the same equation are not unique, and they may be rotationally ambiguous [12–14,26]. However, MCR-ALS models provide solutions that are more similar to the real sources of data variance than are PCA model solutions. Multivariate curve resolution–alternating least squares solutions can be seen as oblique rotated PCA solutions fulfilling nonnegativity constraints. The MCR-ALS models provide a complementary insight to the problem under study, thus helping the interpretation of real environmental sources of data variance. In previous works, MCR-ALS has been shown to be a powerful tool for species profiles resolution in different chemistry systems [27,28], and more recently MCR-ALS also has been shown to be useful for the resolution and interpretation of environmental contamination sources [29,30] from multivariate analysis of environmental data tables. The MCR-ALS solutions can be additionally constrained to fulfill a trilinear model [31]. When this trilinearity constraint is applied, the profiles in the three different modes (U^{geo} , U^{temp} , and V^T) are directly recovered and they can be compared with the profiles obtained when using other methods based on the trilinear model, such as PARAFAC. Multivariate curve resolution–alternating least squares results recently were compared with results from Tucker3-ALS and PARAFAC-ALS in the resolution of different chemical systems [32,33] with similar or even better results, depending on data structures and data complexities. In most of these cases, MCR-ALS was ranked very positively in comparison with the other methods.

Tucker3–alternating least squares and parallel factor–alternating least squares analysis of a three-way data structure (cube of data)

In Figure 2B and C, Tucker3 and PARAFAC three-way models are briefly summarized. Both types of models may be

described as factorizations of a three-way data array of dimensions $46 \times 19 \times 14$ (i.e., a data cube formed by the 14-month frontal slices with the dimensions of 46 sampling sites by 19 analyzed SVOCs). The elementwise equation that describes the Tucker3 model data decomposition is

$$d_{ijk} = \sum_{p=1}^{N_p} \sum_{q=1}^{N_q} \sum_{r=1}^{N_r} g_{pqr} \mathbf{u}_{ip}^{\text{geo}} \mathbf{v}_{jq} \mathbf{u}_{kr}^{\text{temp}} + e_{ijk} \quad (3)$$

and that describing the PARAFAC model data decomposition is

$$d_{ijk} = \sum_{n=1}^N \mathbf{u}_{in}^{\text{geo}} \mathbf{v}_{jn} \mathbf{u}_{kn}^{\text{temp}} + e_{ijk} \quad (4)$$

In the Tucker3 model, three different indices (p , q , and r) are used to describe the components in the three modes of the data array, whereas in the PARAFAC model a single index n describes the components in the three modes of the data array. The vector elements \mathbf{u}^{geo} , \mathbf{u}^{temp} , and \mathbf{v} belong, respectively, to the factor matrices: sample scores matrix \mathbf{U}^{geo} describing the source geographical distribution, sample scores matrix \mathbf{U}^{temp} describing the source temporal distribution, and SVOC loadings matrix \mathbf{V}^{T} describing the chemical composition nature of these sources. Each of these matrices can be interpreted in a similar way and compared to those obtained by PCA and MCR-ALS of the augmented matrix (see above in Fig. 2A). Apart from the fact that a different number of components are defined for each mode in Tucker3 models compared to PARAFAC models, another main difference between these two models is the presence of the so-called core elements g_{pqr} in the Tucker3 model, allowing for interaction between components in the three modes. The Tucker3 model reduces to the PARAFAC model when the same number of components is considered in the three modes and the core elements out of the diagonal are all zero, giving a superdiagonal identity data core three-way array. As in PCA, in Tucker3 three-way factor decompositions, orthogonal constraints usually are applied. However, the solutions obtained by Tucker3 in this case are not unique [8,9] and there is rotational freedom. The PARAFAC three-way factor decompositions instead give unique solutions and nonnegative ALS algorithms frequently are used [18,19]. The algorithms used for MCR-ALS, PARAFAC-ALS, and Tucker3-ALS decomposition methods are in the three cases ALS algorithms.

In Tucker3 models, the determination of the complexity of the model often is performed by looking at the percentage of explained variance and at the magnitude and interactions between g_{pqr} core elements [18,19]. In PARAFAC models, the determination of the complexity of the model often is performed by looking at the core consistency (which hopefully should give a unit superdiagonal matrix) and also by looking at the percentage of explained variance. For a large number of components, Tucker3 models may be rather difficult to interpret because of the large number of possible interactions between the elements in the core array. The results of Tucker3 and PARAFAC usually are presented as for PCA and MCR-ALS in the form of scores and loadings plots.

Computer software

Most of the data treatments, algorithms, computer programs, and graphics used algorithms and software developed under the MATLAB computer and visualization environment (Release 12, Mathworks). For PCA and missing data pretreat-

ment, we used PLS Toolbox Version 2.1 (Eigenvector Research) and MCR-ALS software (<http://www.ub.es/gesq/mcr/mcr.htm>). For PARAFAC-ALS and Tucker3-ALS, the N-way toolbox, which is freely accessible from the Internet (<http://www.models.kvl.dk/source/>) was used.

RESULTS AND DISCUSSION

Binary correlations between the 19 more frequently found SVOCs are given in Table 1. For most of these compounds, correlation values were below 0.1, but in some instances some correlations were as large as 0.74 for correlation between atrazine and metholachlor. The presence of these relatively high correlated compound concentrations was interpreted as being due to a common application of some herbicides in mixtures. For instance, atrazine, metholachlor, and alachlor are three herbicides usually are applied together to the same type of crops. On the other hand 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid showed a relatively high correlation with mecoprop and with 2,4-D. The more probable reason for this is that these two compounds are also administrated together in formulations. Finally, 4-chloro-3-methylphenol also showed relative high correlation with 3-chlorophenol (both are of industrial origin).

Table 2 gives the results of the application of PCA for column mean-centered data, for column autoscaled data, and for log-transformed column mean-centered data. When using five principal components (PCs), the amount of explained data variance was respectively 84.0, 46.1, and 69.6%. Results for column mean-centered data were nearly identical to those obtained for raw data that were not mean-centered. The reason for this is that concentration means of the different analyzed compounds always were low and very close to zero. In order not to bias the interpretation toward one of these treatments, the complete study was repeated with these three data pretreatments. However, in trying to be concise, PCA results for column mean-centered data are given first and commented upon in detail. Then, only main trends obtained with other pretreatments and methods are summarized. The PCA column mean-centered data results were selected first because they provided a relatively simple interpretation of the main contamination sources that was confirmed afterwards with the other pretreatments and methods.

Principal components analysis-resolved profiles for the first five components are given in Figures 3 and 4. The first principal component (PC1), explaining 29.1% of data variance (upper part of Fig. 3), was mostly loaded by 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid, 2,4-D, mecoprop, and simazine, all of which are of agricultural origin, and by tributylphosphate, which is of industrial origin. With many applications throughout the year, the commonly used herbicide 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid gave the highest contribution to PC1, because it was encountered in 24.3% of the samples at concentrations higher than 0.1 $\mu\text{g/L}$. The presence of the other herbicides also in PC1 was correlated to their use with 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid, because this herbicide generally is formulated with 2,4-D or mecoprop. Use of simazine and tributylphosphate also is widespread throughout Portugal and these compounds contribute to diffused pollution. Geographical and temporal distributions of this main contamination source are readily available from scores \mathbf{U}^{geo} and \mathbf{U}^{temp} obtained by the proposed refolding and averaging procedure of augmented scores matrix \mathbf{U}^{aug} from PCA (see Fig. 2A). In Figure 4, the geographical distribution of this PC1 is given on the right subplot. This PC1 describes a main diffused contam-

Table 1. Binary correlations between concentrations of analyzed semivolatle organic compounds

Compounds ^a	ALA	ATR	BEN	BIF	3-CP	4-CP	2,4-D	DCP	DIM	LIN	MCPA	MEC	MEP	MET	PCP	SIM	2,4,5-T	TBP	TCP
Alachlor (ALA)	1.00																		
Atrazine (ATR)	0.49	1.00																	
Benazone (BEN)	0.02	-0.02	1.00																
Biphenyl (BIF)	0.05	0.04	0.01	1.00															
3-Chlorophenol (3-CP)	-0.01	-0.02	-0.01	0.17	1.00														
4-Chlorophenol (4-CP)	-0.01	-0.02	0.00	0.01	-0.02	1.00													
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)	-0.01	-0.03	0.12	-0.02	-0.02	0.00	1.00												
Dichloroprop (DCP)	-0.02	-0.04	0.37	0.02	0.04	0.06	0.20	1.00											
Dimethoate (DIM)	0.01	0.07	0.07	0.07	0.14	0.14	0.01	0.02	1.00										
Linuron (LIN)	0.01	0.10	-0.02	0.10	0.07	-0.01	-0.01	0.03	0.09	1.00									
4-Chloro-2-methylphenoxyacetic acid (MCPA)	-0.02	-0.02	0.10	-0.01	-0.02	0.03	0.47	0.23	0.07	-0.01	1.00								
Mecoprop (MEC)	-0.02	-0.02	0.02	0.00	-0.01	-0.01	0.17	0.19	0.04	0.08	0.52	1.00							
4-Chloro-3-methylphenol (MEP)	-0.01	-0.02	0.05	0.24	0.43	-0.02	0.05	0.02	0.17	0.02	0.00	0.04	1.00						
Metholachlor (MET)	0.29	0.74	0.05	0.13	-0.03	-0.02	-0.02	0.03	0.00	0.18	-0.04	-0.01	-0.04	1.00					
Pentachlorophenol (PCP)	-0.01	-0.02	0.04	0.05	0.08	0.05	0.23	0.13	0.19	0.13	0.06	0.03	0.17	-0.04	1.00				
Simazine (SIM)	0.09	0.17	-0.01	0.04	0.00	-0.01	0.07	-0.03	0.00	0.27	0.00	0.00	-0.01	0.12	0.17	1.00			
2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)	0.02	-0.02	0.33	-0.02	-0.01	-0.01	0.24	0.12	0.01	0.03	0.17	0.04	-0.02	0.02	-0.01	-0.01	1.00		
Tributylphosphate (TBP)	0.02	0.01	-0.01	0.02	-0.01	-0.01	0.18	-0.01	-0.01	0.01	0.16	-0.01	-0.01	0.02	0.09	0.00	0.01	1.00	
2,4,6-Trichlorophenol (TCP)	0.05	-0.01	-0.02	-0.06	-0.03	-0.02	0.04	0.00	0.09	0.01	0.01	0.00	0.04	0.00	0.15	0.00	0.02	0.00	1.00

^a Compound abbreviations are identified in the first column.

ination source that is widespread in mixed industrial and agricultural regions of Portugal. The highest PC1 contributions were in Portos (site 5), Formariz (site 6), Ponte Moreira (site 7), Ponte da Aranha (site 20), Rio da Cal (site 21), Ponte de Freiria (site 30), and Esteiro Coia (site 34). Among them, Portos, Formariz, and Ponte Moreira are all close to small highly polluted rivers (Ave and Leça) with high industrial (textile) and agricultural activities. The other sites with high PC1 scores also have mixed activities, although they are less heavily industrialized than those in the Porto area. From the upper left part of Figure 4, the highest contributions of this contamination source were obtained in June and July 1999 (months 3 and 4, respectively).

The second principal component (PC2) explained 25% of the remaining data variance once the contribution of PC1 was deleted. The PC2 was loaded mostly (Fig. 3) by simazine (large negative loading) and much less by 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid (small positive loading). Therefore, these two compounds are inversely correlated in this PC2, which mostly explains samples where simazine had relative high concentrations and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid had low concentrations. This indicates that simazine has an independent source compared to that found in PC1, where it was positively correlated with 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid. Simazine is widely applied on grapes, whereas 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid is used on other type of vegetables and seldom is applied to grapes. Moreover, simazine and atrazine (with a small negative loading) are used in similar applications and often are formulated together, among other pesticides, so it is not surprising to find some positive correlation between them and a negative correlation between these two and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid. In Figure 4, representative sampling sites where the contamination source described by PC2 was more important are given. Ponte Moreira (site 7), Ponte da Aranha (site 20), Ponte de Freiria (site 30), Monte da Vinha (site 37), Pulo do Lobo (site 39), and Cais de Alcoutim (site 40) gave high negative score values (higher simazine and atrazine input concentrations), corresponding to sites with the highest mean concentration values of these herbicides, which particularly were found in April and September 1999 and in April and May 2000 (Fig. 4). Therefore, this second PC mainly identified a diffused agricultural main contamination source from simazine and atrazine herbicides.

The third principal component (PC3; 13.9% of explained variance) was mostly loaded by tributylphosphate and was somewhat negatively loaded (to a lesser extent) by 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid and mecoprop (see Fig. 5). The highest positive PC3 scores were found in strongly industrialized areas such as Portos (site 5) and Formariz (site 6), especially in September 1999 and March and May 2000. This third PC3 described an industrial high-emission contamination point source of tributylphosphate in the Ave River textile industrial area (sampling sites 5 and 6 in Fig. 1).

The fourth principal component (PC4) explained 8.7% of the remaining variance and was negatively loaded (Fig. 3) by alachlor, atrazine, and metolachlor and positively loaded by simazine and 2,4-D. As previously stated, alachlor and metolachlor usually are formulated together with atrazine and are used for corn cultivation. Figure 4 shows geographical and temporal distributions of this contamination source. Monte da Vinha (site 37, close to the Spanish border) had the highest PC4 scores, followed by Pulo do Lobo (site 39), Cais de Alcoutim (site 40), and Alvalde do Sado (site 41), especially

Table 2. Explained variances by principal component (PC) analysis. Explained variances are given individually for each PC and (in parentheses) for the total number of considered components

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
% Variance ^a	29.1 (29.1)	25.1 (54.2)	13.9 (68.1)	8.7 (76.8)	7.2 (84.0)
% Variance ^b	11.8 (11.8)	11.4 (23.2)	9.2 (32.4)	7.1 (39.6)	6.5 (46.1)
% Variance ^c	28.3 (28.3)	15.7 (44.0)	9.9 (53.9)	8.5 (62.4)	7.2 (69.6)
% Variance ^d	26.2 (26.2)	20.7 (46.9)	11.0 (57.9)	8.3 (66.3)	7.7 (74.0)
% Variance ^e	27.1 (27.1)	23.0 (50.1)	13.2 (63.3)	8.9 (72.2)	8.2 (80.4)

^a Explained variances for columnwise unfolded and augmented mean-centered data matrix D_c^{aug} .

^b Explained variances for columnwise unfolded and augmented autoscaled data matrix D_c^{aug} .

^c Explained variances for columnwise unfolded and augmented log mean-centered data matrix D_c^{aug} .

^d Explained variances for rowwise unfolded and augmented mean-centered data matrix D_r^{aug} .

^e Explained variances for tubewise unfolded and augmented mean-centered data matrix D_t^{aug} .

in May 2000. These sites are close to the Guadiana River area in southern Portugal (sampling sites 37, 38, 39, 40, and 41) and all of them have strong agricultural influences, not only from Portugal but also from Spain. This PC4 clearly describes the contamination produced by the three herbicides alachlor, atrazine, and metholachlor diffused in different agricultural areas in central and southern Portugal and Spain, with a peak increase observed in the May 2000 sampling campaign.

Finally, the fifth principal component (PC5) explained only 7.2% of the remaining data variance. This component was loaded positively by 2,4-D and less significantly by atrazine, bentazone, and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (Fig. 5), whereas 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid and mecoprop were negatively loaded. The highest contribution of this PC5 was found in harvest and postharvest periods (June, July, September, and December 1999) and at Formariz (site 6), Ponte Moreira (site 7), Alboade de Miranda do Douro (site 8), Rio da Cal (site 21), Ponte da Ribeiro-Pernes (site 29), Monte da Vinha (site 37), and Bensafrim (site 43). Only two samples

(Valença [site 2] and Esteiro Coina [site 34]) gave negative scores. In this case, the scores distribution was diffused and spread over the entire geographical area, including industrial areas in the Porto and Douro northern areas and in the more agricultural southern areas along the Algarbe coast. This PC5 was related to diffused pollution of the two herbicides 2,4-D and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid, which are widely used in horticulture.

When data were autoscaled, data variance was more equally distributed among PCs. Variance explained with PC1 and PC2 was relatively lower than for mean-centered data (Table 2). Industrial emission point contamination sources were not as perceptible because individual events and point contamination sources counted much less in the final results of the analysis of the autoscaled data set. On the other hand, variables corresponding to organic compounds at uncertain low concentration levels increased weight considerably and gave large loadings in PC1s. Autoscaled PCA results were more difficult to interpret in this case and did not provide further relevant in-

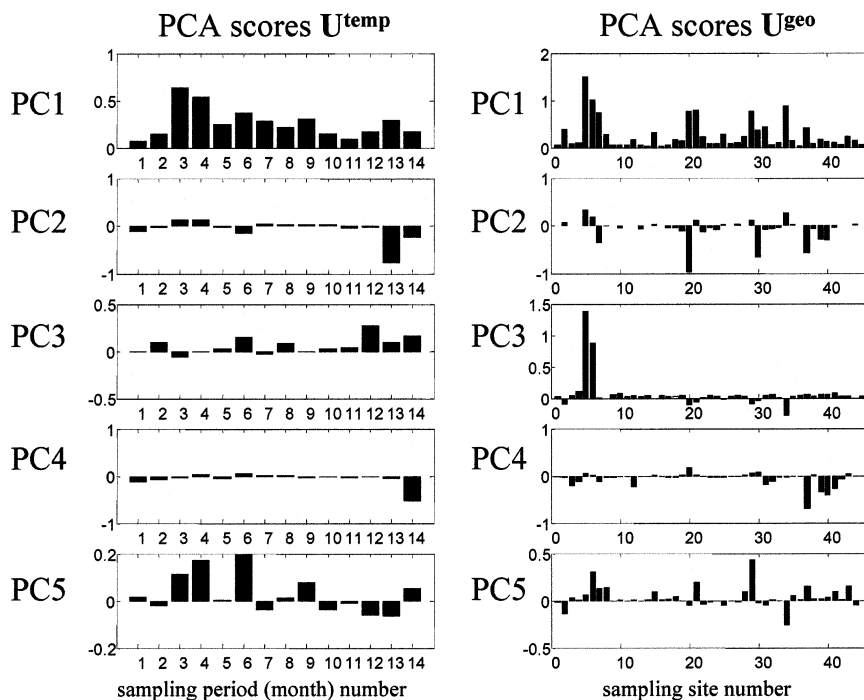


Fig. 4. Temporal (left) and geographical (right) distribution of resolved principal components analysis (PCA) scores for mean-centered augmented data matrix after refolding arrangement described in Figure 2. From top to bottom, first to fifth principal components (PC1–PC5) are given. Sampling site number identification is given in Figure 1; lower code numbers are for northern samples and higher code numbers are for southern areas. Sampling period (month) is from 1 to 14 for April 1999 to May 2000.

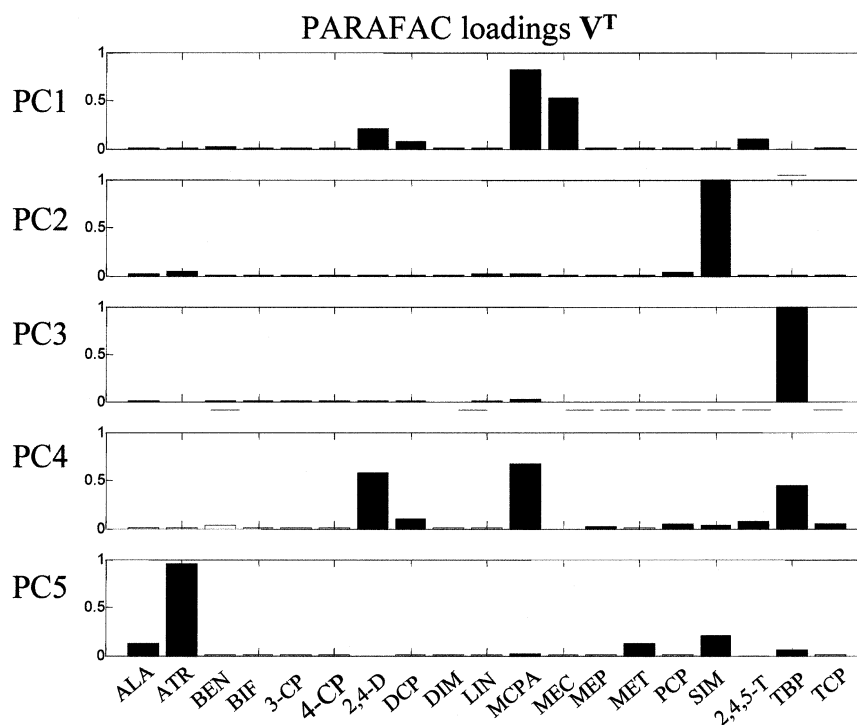


Fig. 5. Parallel factor analysis (PARAFAC) loadings (using nonnegativity constraints) for the three-way data cube. From top to bottom, first to fifth (PC1–PC5) PARAFAC components are given. See Figure 3 for comparison with principal components analysis (PCA) loadings. See Table 1 for compound names and short identifications.

formation apart from that given previously for mean-centered data. Log-transformed mean-centered data gave very similar PCA results to mean-centered data that were previously explained extensively. Only a few differences in the order of the components explaining less variance were observed; for instance components PC4 and PC5 were interchanged. As indicated in Table 2, the percentage of variance explained by each component for log-transformed mean-centered data was lower (69.6%) than for the raw mean-centered data (84.0%), but was still considerably higher than for autoscaled data (46.1%).

The MCR-ALS models were directly applied to raw data, without any further data pretreatment other than PCA estimation of missing data and setting values below the detection limit to one half of the detection limit (see *Initial data arrangement and pretreatment*). When using five components, the explained data variance was now 84.1%, very close to the value obtained by PCA (84.4%) for mean-centered data. The MCR-ALS resolved components were now not orthogonal and, therefore, variances explained individually by each component did overlap and their sum was not equal to the total variance explained by all of them simultaneously. However, as stated before, in the general case, real sources of contamination are not orthogonal; they are nonnegative and they overlap. The MCR-ALS model attempts their resolution. If, apart from nonnegativity constraints, trilinearity also is applied as a constraint during MCR-ALS resolution [31], the profiles in three modes, the loadings V^T and the scores U^{geo} and U^{temp} , are directly obtained. However, because of this trilinearity constraint, the amount of explained data variance for the same number of components decreased to 62%. A trilinear model is a more rigid structure and data fit becomes worse. However, resolved profiles assuming a trilinear model are simpler to interpret. A compromise between simplicity of data interpretation and

amount of explained variance should be attained (see below for PARAFAC results). Loadings and scores obtained when using the trilinearity constraint in MCR-ALS were, in fact, practically identical to those obtained when using the PARAFAC-ALS method (see Figs. 5 and 6). In fact, the assumption of trilinearity did not significantly distort the pattern of variation of the resolved components in different modes. The PC1 described a contamination source of 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid, mecoprop, 2,4-D, dichloroprop, and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and was rather similar to PC1 resolved by PCA except for simazine and tributylphosphate. The PC2 expressed mostly contamination from simazine (like PC2 in PCA). The PC3 was the main contamination source of tributylphosphate, again similarly to PCA for PC3. The PC4 is now related to a source of simultaneous contamination by 2,4-D, 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid, and tributylphosphate. This was not resolved in the same way in PCA, where this contamination appeared to be mixed in PC1 and PC5. Finally, the PC5 and PC4 from PCA were again rather similar and were exchanged in order of amount of explained variance. The PC5 described mostly one contamination source of alachlor, atrazine, and metholachlor. The PARAFAC geographical and temporal scores (Fig. 6) keep some similarities with PCA scores (Fig. 4), but they were simpler. Identification of contamination sources by PARAFAC is more straightforward but in many cases the model is too rigid and cannot account for possible deviations of trilinearity, specially for temporal variation among the same contamination sources at different geographical sites. A trilinear model assumes that one particular contamination source (described by loadings) has exactly the same geographical and temporal contamination pattern (scores) for all samples, whatever are the samples analyzed; whereas in PCA and MCR-ALS (without the trilinearity constraint), a more flexible modeling of these contamination

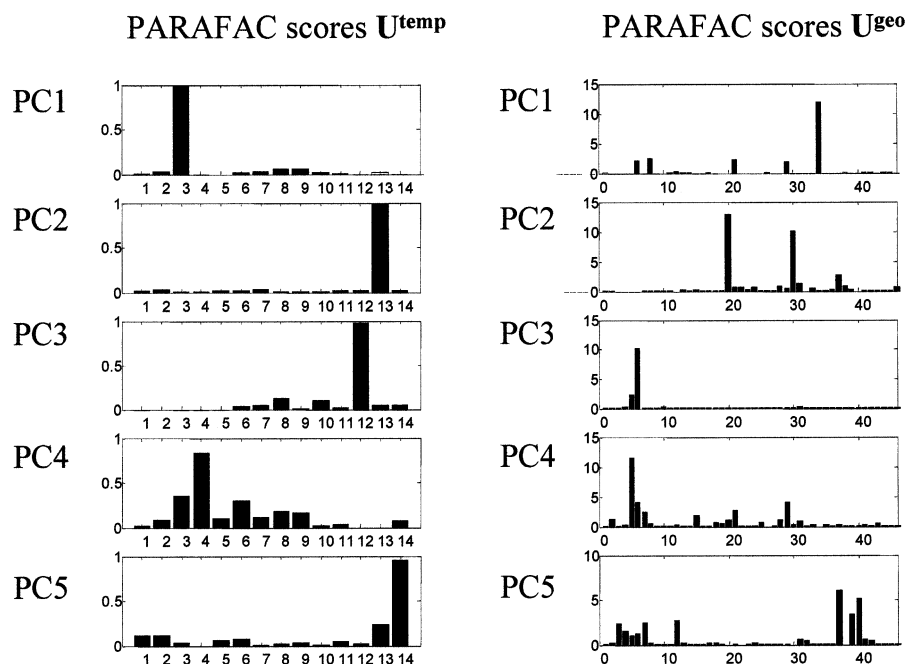


Fig. 6. Temporal (**left**) and geographical (**right**) distribution of resolved parallel factor analysis (PARAFAC) scores for the three-way data cube. From top to bottom, first to fifth (PC1–PC5) PARAFAC components are given. Sampling site number identification is given in Figure 1; lower code numbers are for northern samples and higher code numbers are for southern areas. Sampling period (month) is from 1 to 14 for April 1999 to May 2000. See Figure 4 for comparison with principal components analysis (PCA) scores.

sources is attempted, by letting different temporal patterns for the same contamination source occur for different samples. The procedure to average temporal and geographical profiles obtained by PCA, MCR, or both (Figs. 2A and 4) provides a way of comparison with profiles obtained by assuming a trilinear model such as in PARAFAC or in MCR-ALS with the trilinearity constraint (Fig. 6).

To select the correct number of components in Tucker3- and PARAFAC-based models, chemical ranks (rank in absence of experimental noise) of the three unfolded data matrices formed by matricizing the data cube along each of their three modes were investigated. In Table 2, the explained PCA variances considering a different number of components for these three augmented and unfolded matrices (rowwise, columnwise, and tubewise augmented matrices) are given. Only small differences between the magnitudes of these explained variances were obtained when the same number of components was considered in each data mode. This would indicate that experimental data do not deviate strongly from a trilinear model. This also is confirmed when the results with multiple Tucker3 models with different numbers of components were compared (Table 3). Explained data variances always improved for the model when using equal number of components in the three modes. Whenever the number of components in one mode was lower than the number of components in the other modes, explained data variances decreased significantly. The model with five components in the three modes again was considered appropriate when taking into account the amount of explained data variance ($\sim 65\%$) and the model complexity (five components in each mode). Core consistency of the PARAFAC model [18] when using five components also was good (92.4%), with all nondiagonal elements of Tucker congruence coefficients (18) close to zero. Finally, Tucker3 composition loadings and Tucker3 geographical and temporal scores (results not shown) also were estimated for the five-components

model in the three modes by using the same data pretreatment method (mean-centering) and constraints (orthogonality) as for PCA. Interpretation of results when using such a Tucker model was not easy because of the large number of possible interactions between core array components ($5 \times 5 \times 5 = 125$ elements), although many of them were rather small. In fact, the Tucker3 model finally resolved that profiles for the five-components model in all modes were rather similar to those obtained by PCA and they are not given here for brevity.

CONCLUSION

The main contamination sources of SVOCs in surface waters of Portugal were identified and resolved by application of various chemometric methods. These contamination sources had different origins: agricultural, for simazine, atrazine, alachlor, and metholachlor in central and southern Portugal;

Table 3. Selected Tucker3 models with their explained variances^a

Model number ^b	Number of components			Explained variance (%)
	First mode	Second mode	Third mode	
1	1	1	1	21.6
32	2	2	2	37.3
63	3	3	3	48.2
94	4	4	4	57.3
125	5	5	5	65.0

^a Experimental data were mean-centered as in principal component analysis (PCA) and constraints applied were also the same as in PCA (i.e., orthogonality).

^b A total of 125 Tucker3 models were tested. Only those models giving the best fit are given for brevity. Best models always had the same number of components in the three modes. When the number of components in one mode decreased, data fitting was significantly worse.

industrial, specially for tributylphosphate in the Porto and Ave river areas (northern Portugal); and mixed for 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid, 2,4-D, and mecoprop, which had widespread use throughout Portugal. Temporal distribution profiles of these contamination sources in the one-year period covered by this study showed peak values in spring and summer seasons. Stronger conclusions about geographical distribution and temporal evolution of these contamination sources would require a more extensive analysis of data acquired in multiyear monitoring programs and some work presently is being pursued in this direction. Similar interpretations about the more important contamination sources (loadings) and about their geographical and temporal distribution (scores) were possible when using different chemometric methods, increasing the reliability of the conclusions achieved in this work. The proposed method for averaging PCA and MCR-ALS unfolded score profiles proved to be an efficient and useful way to uncover mixed geographical and temporal information from two-way bilinear models when applied to three-way data. In this way also, information obtained by these methods can be easily compared with the information provided by score profiles obtained when using three-way methods such as PARAFAC and Tucker3.

Acknowledgement—This work received financial supported from the Ministry of Environment of Portugal.

REFERENCES

- Commission of the European Communities. 1976. Dangerous substances discharge into the environment. L 129. Directive 76/464/CEE. In *Official Journal of the European Community*. Brussels, Belgium.
- Commission of the European Communities. 1976. Guidance document on elements for pollution reduction programs under article 7 of council directive 76/464/CEE. ADONIS 71065. Brussels, Belgium.
- Massart DL, Vandeginste BGM, Buydens LMC, de Jong S, Lewi PJ, Smeyers-Verbeke J. 1998. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.
- Einax JW, Zwaninger HW, Geiss S. 1997. *Chemometrics in Environmental Chemistry*. VCH, Weinham, Germany.
- Hopke PK. 1995. The mixture resolution problem applied to airborne particle source apportionment. *Chemometrics in environmental chemistry*. In Einax J, ed, *The Handbook of Environmental Chemistry*, Vol 2, Part H. Springer, Berlin, Germany, pp 47–85.
- Hopke PK. 1991. An introduction to receptor modelling. *Chemom Intell Lab Syst* 10:21–43.
- Geladi P. 1989. Analysis of multiway (multimode) data. *Chemom Intell Lab Syst* 7:11–30.
- Smilde AK. 1992. Three-way analysis. Problems and projects. *Chemom Intell Lab Syst* 15:143–157.
- Henrion R. 1994. N-way principal component analysis theory, algorithms and applications. *Chemom Intell Lab Syst* 25:1–23.
- Jolliffe IT. 1986. *Principal Component Analysis*. Springer, New York, NY, USA.
- Wold S, Esbensen K, Geladi P. 1987. Principal component analysis. *Chemom Intell Lab Syst* 2:37–52.
- Tauler R, Smilde AK, Kowalski BR. 1995. Selectivity, local rank, three-way data analysis and ambiguity in multivariate curve resolution. *J Chemom* 9:31–58.
- Tauler R. 1995. Multivariate curve resolution applied to second order data. *Chemom Intell Lab Syst* 30:133–146.
- Lawton WH, Sylvestre EA. 1971. Self modeling curve resolution. *Technometrics* 13:617–633.
- de Juan A, Vander Heyden Y, Tauler R, Massart DL. 1997. Assessment of new constraints applied to the alternating least squares method. *Anal Chim Acta* 346:307–318.
- Mendieta J, Diaz-Cruz MS, Tauler R, Esteban M. 1996. Application of multivariate curve resolution to voltammetric data. II. Study of metal-binding properties of the peptides. *Anal Biochem* 240:134–141.
- de Juan A, Maeder M, Martínez M, Tauler R. 2000. Combining hard- and soft-modelling to solve kinetic problems. *Chemom Intell Lab Syst* 54:49–67.
- Bro R. 1997. PARAFAC. Tutorial and applications. *Chemom Intell Lab Syst* 38:149–171.
- Andersson CA, Bro R. 1998. Improving the speed of multiway algorithms. Part I Tucker 3. *Chemom Intell Lab Syst* 42:93–103.
- Barbieri P, Andersson CA, Massart DL, Predonzani S, Adami G, Reisenhofer E. 1999. Modeling bio-geochemical interactions in the surface waters of the Gulf of Trieste by three-way principal component analysis (PCA). *Anal Chim Acta* 398:227–235.
- Leardi R, Armanino C, Lanteri S, Alberotanza L. 2000. Three-mode principal component analysis of monitoring data from Venice lagoon. *J Chemom* 14:187–195.
- Zeng Y, Hopke P. 1990. Methodological study applying three-mode factor analysis to three-way chemical data sets. *Chemom Intell Lab Syst* 7:237.
- Tauler R, de Almeida-Azevedo D, Lacorte S, Cespedes R, Vana P, Barcelo D. 2001. Organic pollutants in surface waters from Portugal using chemometric interpretation. *Environ Technol* 22:1043–1054.
- Lacorte S, Viana P, Guillamon R, Tauler R, Vinhas T, Barcelo D. 2001. Main findings and conclusions of the implementation of Directive 76/464/CEE concerning the monitoring of organic pollutants in surface waters (Portugal, April 1999–May 2000). *J Environ Monit* 3:475–482.
- Montgomery DC, Runger GC. 1999. *Applied Statistics and Probability for Engineers*. John Wiley, New York, NY, USA.
- Paatero P, Hopke PK, Song XH, Ramadan Z. 2002. Understanding and controlling rotations in factor analytical models. *Chemom Intell Lab Syst* 60:253–264.
- Vives M, Gargallo R, Tauler R. 1999. Study of the intercalation equilibrium between the polynucleotide poly(adenylic)-poly(uridylic) acid and the ethidium bromide dye by means of multivariate curve resolution and the multivariate extension of the continuous variation and mole ratio methods. *Anal Chem* 71:4328–4337.
- Cruz BH, Díaz-Cruz JM, Diaz-Cruz MS, Ariño C, Esteban E, Tauler R. 2001. Differential pulse polarographic study of the Pb(II) complexation by glutathione. *J Electroanal Chem* 516:110–118.
- Tauler R, Barcelo D, Thurman EM. 2000. Multivariate correlations between concentration of selected herbicides and derivatives in outflows from selected US midwestern reservoirs. *Environ Sci Technol* 34:3307–3314.
- Salau J, Tauler R, Bayona JM, Tolosa I. 1997. Input characterization of sedimentary organic chemical markers in the northwestern Mediterranean Sea by exploratory data analysis. *Environ Sci Technol* 31:3482–3490.
- Tauler R, Marqués MI, Casassas E. 1998. Multivariate curve resolution applied to three-way trilinear data: Study of a spectrofluorimetric acid–base titration of salicylic acid at three excitation wavelengths. *J Chemom* 12:55–75.
- de Juan A, Tauler R. 2001. Comparison of three-way resolution methods for non-trilinear data sets. *J Chemom* 15:749–771.
- Smilde A, Tauler R, Saurina X, Bro R. 1999. Calibration methods for complex second order data. *Anal Chim Acta* 398:237–251.

4.3.

Artículo científico número 6:

***“Detection and Evaluation of Endocrine Disruption Activity
in Water Samples from Portugal Rivers”***

*L. Quirós, R.Céspedes, S.Lacorte, P. Viana, D.Barceló. y B. Piña
Environmental Toxicology and Chemistry (2005) Vol. 24. 389-395*

DETECTION AND EVALUATION OF ENDOCRINE-DISRUPTION ACTIVITY IN WATER SAMPLES FROM PORTUGUESE RIVERS

LAIA QUIRÓS,[†] RAQUEL CÉSPEDES,[‡] SÍLVIA LACORTE,[‡] PAULA VIANA,[§] DEMETRIO RALDÚA,[†]

DAMIÀ BARCELÓ,[§] and BENJAMIN PIÑA*[†]

[†]Department of Molecular Biology, IBMB-CSIC, and

[‡]Department of Environmental Chemistry, IIQAB-CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

[§]Direção Geral do Ambiente, Rua da Murgueira, Zambujal, 2720 Amadora, Portugal

(Received 8 March 2004; Accepted 21 July 2004)

Abstract—Water samples ($n = 183$) from Portuguese rivers were tested for the presence of endocrine disruptors using the recombinant yeast assay (RYA) combined with chemical identification of compounds having endocrine-disruption properties by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Ten selected locations were sampled monthly for a period of 20 months, from April 2001 to December 2002. More than 90% of samples showed either no detectable or low levels of estrogenicity (<0.1 ng/L of estradiol equivalents). The remaining samples (17 in total, 9.3%) showed estrogenicity values ranging from 0.1 to 1.7 ng/L of estradiol equivalents; only two samples showed values greater than 1 ng/L of estradiol equivalents. Most highly estrogenic samples (13 of 17 samples) originated in five sampling sites clustered in two zones near Porto and Lisbon. Chemical analysis detected alkylphenolic compounds (octyl- and nonylphenol plus nonylphenol ethoxylates) in all samples, albeit at concentrations less than 1 $\mu\text{g/L}$ for each compound in 80% of samples. Total analyte concentration exceeded 10 $\mu\text{g/L}$ in only 10 samples, with all but one of those originating from only two sampling sites. In these two locations, a good correlation was observed between the concentrations of octylphenol, nonylphenol, and to a lesser extent, bisphenol A in the samples and their estrogenicity values as calculated by RYA. We conclude that estrogenic activity can be explained by alkylphenol contamination in only these sites; for the remainder, we propose that pesticides and urban waste may be the main factors responsible for estrogenic contamination.

Keywords—Endocrine disruption Alkylphenols Bisphenol A Recombinant yeast assay River monitoring

INTRODUCTION

Endocrine disruption occurs when a chemical alters the efficiency or the metabolism of the endocrine system in organisms that are exposed to it. Given the multiple functions of hormones in many animals, from snails to vertebrates and humans, this alteration can lead to multiple deleterious effects, from sterility to mental deficiencies and a variety of developmental problems [1–3].

Of all hormonal systems that are relevant in vertebrates, the one based on the female steroid-hormone estradiol appears to be particularly sensitive to environmental endocrine disruptors [4]. Like other steroid hormones, estradiol (as well as its natural derivatives, estrion and estrone, which as a group are called estrogens) exerts its biological functions through binding to a protein called the estrogen receptor. The endocrine system greatly amplifies these signals; as a consequence, estradiol produces biological effects at concentrations less than 100 pM. Although many (but not all) environmentally relevant endocrine disruptors have effective concentrations much higher than this, the sensitivity of endocrine systems indicates that an effective control of putative disruptors should be able to detect them at $\mu\text{g/L}$ concentration levels [4,5].

Several structural trends could mark a given molecule as a putative ligand for the estrogen receptor [6], but there apparently is no way to predict whether a given molecule will act as an endocrine disruptor [7]. Thus, the endocrine-disruption potential of a given molecule or a sample cannot be assessed by conventional analytical methods, only by functional assays

that normally are based on the ability of disruptors to bind to the estrogen receptor [8,9]. The recombinant yeast assay (RYA) is one of the most convenient functional assays to evaluate the potential for endocrine disruption of a substance or, in the present case, a sample from the environment. The principle is simple: A single-cell organism (a yeast) is genetically engineered to elicit an easy-to-read response on addition of estrogens or estrogen-like compounds, including endocrine disruptors. The engineered yeast cells harbor two foreign genetic elements: An estrogen receptor from any vertebrate (in our case, human), and a convenient gene with an expression that is easy to follow (i.e., a reporter gene; in our case, the β -galactosidase gene from *Escherichia coli*). This design ensures that the reporter enzyme is expressed only in the presence of the estrogen–estrogen receptor complex and in a manner very similar to the way that many female genes are regulated in vertebrates. The fundamental similarity of all eukaryotes ensures that the mechanism also works in yeast [5,10,11].

We combined the RYA and chemical analysis to check the occurrence of endocrine disruptors in 10 Portuguese rivers, expanding from Ponte Nova Barcelos at the north of Portugal to Esteiro Seixal, just downstream from Lisboa. For each site, we analyzed water samples taken once a month, from April 2001 to December 2002. The chemical analysis included putative or known endocrine disruptors, such as nonylphenol (NP), nonylphenol monoethoxylate (NPEO1) and diethoxylate (NPEO2), octylphenol (OP), and bisphenol A (BPA). These substances are frequently found in surface waters and have been included in the New Water Framework Directive [12] because of their potential estrogenic effects in aquatic biota and RYA assays [2,13,14]. We found a direct correlation be-

* To whom correspondence may be addressed
(bpcbmc@cid.csic.es).

Table 1. Acronyms, monitored rivers, and potentially polluting activities associated with the sampling points covered in the present survey

Sampling point ^a	Acronym	River	Activities
Ponte Nova Barcelos	PNB	Cávado	Urban, agriculture (corn, wheat, wine)
Formariz	Fz	Ave	Urban, textile industry
Ponte Moreira	PM	Leça	Urban, textile industry
Ria Aveiro	RA	Novo	Paper industry, wine
Ponte Formoselha	PF	Mondego	Agriculture (olives)
Ponte Ribeira Pernes	PRP	Alviela	Agriculture, industry
Praia do Caruche	PC	Soraia	Industry, agriculture (vegetables)
Monte da Vinha	MdV	Guadiana	Industry, agriculture (vegetables)
Ponte do Sacavém	PdS	Tranco	Agriculture (vegetables)
Esteiro Seixal	ES	Tejo	Urban, paper industry, agriculture (rice)

^a Rivers are in Portugal.

tween endocrine disruption by RYA and chemical composition in at least two sampling points. Our results demonstrate the feasibility of using RYA for continuous monitoring of environmental samples as well as its utility for detecting peaks of estrogenicity even when the putative estrogenic contaminants are uncharacterized.

MATERIAL AND METHODS

Sampling sites

Samples of surface water were collected monthly for a period of 20 months, from April 2001 to December 2002 (with the exception of July 2001). Ten sampling points were selected (Table 1 and Fig. 1) according to a previous survey [15], which showed high levels of pollutants at these locations. They cover the main rivers of Portugal in their courses through the large cities sampled and also correspond to sites with high agricultural activities (wheat, wine, olives, and vegetables) and with important industrial nuclei involving textile and paper production (Table 1). In each sampling campaign, water samples were collected from the middle bed of the river using 1-L, precleaned, amber glass bottles. Samples were kept at 4°C until extraction and were processed within 15 d after collection to avoid analyte degradation.

Chemical characterization

Samples were filtered through 1.2- and 0.45- μ m glass-fiber filters to remove suspended particles and extracted immedi-

ately with the automated system ASPEC XLTM (Gilson, Villiers-le-Bel, France) using LiChrolute C18 cartridges (500 mg; Merck, Darmstadt, Germany). Elution was performed using two 5-ml volumes of methanol:dichloromethane (9:1), and the extract was evaporated to dryness and reconstituted in 300 μ l of methanol. Analytes were determined by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) with an electrospray interface. The specific extraction and detection methods used, including quality parameters, have been reported elsewhere [13].

Yeast strains and plasmids

Yeast strain BY4741 (MATa *ura3 Δ 0 leu2 Δ 0 his3 Δ 1 met15 Δ 0*) was obtained from EUROSCARF (Frankfurt, Germany). Expression plasmid pH5HE0 contains the human estrogen hormone-receptor HE0 cloned into the constitutive yeast expression vector pAAH5 [10]. Plasmid pVITB2x contains two copies of the pseudo-palindromic estrogen-responsive element ERE2 from *Xenopus laevis* vitellogenin B₁ gene (5'-AGTCACTGTGACC-3') inserted into the unique *Kpn*I restriction site of plasmid pSFL Δ -178K [10]. Yeast manipulations, including transformation by the lithium acetate method, were performed as described previously [16].

Recombinant yeast assay

Transformed clones were grown overnight in minimal medium (6.7 g/L of yeast nitrogen base without amino acids

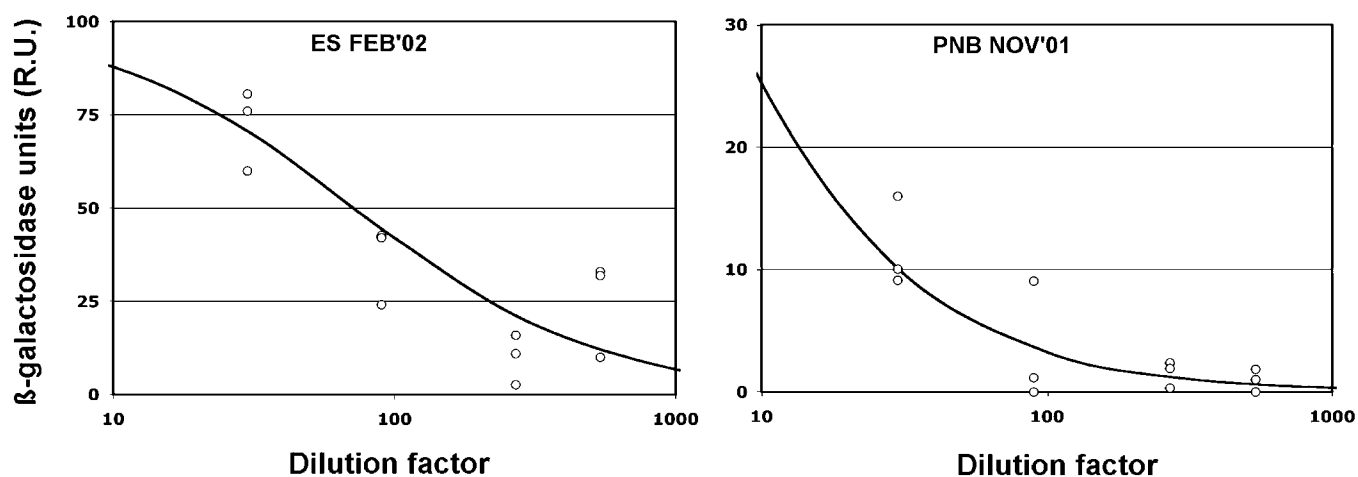


Fig. 1. Calculation of estradiol equivalents from recombinant yeast assay (RYA) results. Circles dots represent relative β -galactosidase values in relative units (RUs) obtained at different dilution factors. The figure shows results from a highly estrogenic sample (Esteiro Seixal [ES], February 2002; left) and from a weakly estrogenic one (Ponte Nova Barcelos [PNB], north of Portugal, November 2001; right). Calculated estrogenic activities for these samples are listed in Table 2. Continuous lines indicate the corresponding sigmoidal functions calculated by nonlinear regression methods and assuming 100 and 0 as the initial and final values, respectively.

[Difco, Basel, Switzerland] and 20 g/L of glucose supplemented with 0.1 g/L of prototrophic markers as required). The final culture was adjusted to an optical density at 595 nm of 0.5 and split into 150-, 100-, or 50- μ l aliquots (see below) in a 96-well polypropylene microtiter plate (Nunc[®], Roskilde, Denmark) [10]. We performed a serial dilution scheme in four steps. Samples (5 μ l) were dispensed into wells on the first row, which contained 150 μ l of culture. Rows 2 and 3 contained 100 μ l of culture; the fourth (and last) row contained 50 μ l of culture. Serial dilutions were made by transferring 50 μ l from the previous well to the next one; at the end, all rows contained 50 μ l and different dilutions of the samples with the following dilution factors: 1:30, 1:90, 1:270, and 1:540. In such a scheme, a typical 96-well plate fits 24 serial dilution series; each sample was tested in triplicate. For controls, samples were substituted by 100 nM estradiol (positive control, four wells), methanol (negative control, four wells), or yeast culture without any addition (blank, four wells). Plates were incubated for 4 h at 30°C under mild shaking. After incubation, 100 μ l of Y-PER[®] (Pierce[®], Rockford, IL, USA) were added to each well and further incubated at 30°C for 1 h. Afterward, 100 μ l of buffer Z (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM HCl, 1 mM MgSO₄, pH adjusted to 7.0) plus 0.5% 2-mercaptoethanol were added to the lysed cells. The β -galactosidase activity was determined by addition of 60 μ l of *ortho*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG; 4 mg/ml in water; Sigma, St. Louis, MO, USA) and incubation at room temperature. The chromogenic reaction was stopped when negative controls began turning yellow (30–90 min) by addition of 50 μ l of 1 M Na₂CO₃. Times for the addition of ONPG (initial time [t_i]) and of Na₂CO₃ (final time [t_f]) were recorded. Plates were then read in a microtiter photometric reader at 504 nm (A_{504}). The β -galactosidase activities of samples (arbitrary units [AUs]) were calculated according to the equation:

$$AU = A_{504}/(t_f - t_i)$$

These arbitrary units were then related to the maximal (set to 100) and minimal (set to 0) values from the positive and negative controls, respectively, in each plate as indicated (in relative units [RUs]):

$$RU = 100 \times \frac{(AU_{\text{sample}} - AU_{\text{min}})}{(AU_{\text{max}} - AU_{\text{min}})}$$

Calculation of estradiol equivalents

Estradiol equivalents (EEQs) are defined as the concentration of estradiol that is required to elicit the same response as that of the sample in the RYA assay. To translate results from serial dilutions to EEQs, we assumed that hormonal dose–response curves follow a sigmoidal function:

$$RU = \frac{100}{1 + (K_d/[L])}$$

where K_d represents the dissociation constant of the ligand–hormone complex and its value coincides with the median effective concentration (EC50), which equals the ligand concentration giving 50% of the maximal response. For extract serial dilutions, plotting dilution factors versus relative response followed an inverse sigmoidal function (Fig. 1) in which the apparent EC50 corresponds to the dilution (actual or predicted) giving 50% of the maximal response. Apparent EC50 values for each sample (a minimum of two replicas with

at least three points each) were calculated using standard non-linear regression methods. These values were converted to EEQs by assuming that they correspond to the EC50 value of estradiol (in our assay, 40 ng/L) [13].

RESULTS AND DISCUSSION

Estrogenicity in water samples from Portuguese rivers

Table 2 shows results from a total of 183 samples analyzed by RYA. Most samples (74%) did not contain estrogenic substances at a high-enough concentration to elicit a response in the RYA. In addition, 30 samples (16.7%) showed very low levels of estrogenicity (<0.1 ng/L of EEQs), which is just above our detection limits. The rest of the highly estrogenic samples (17 in total, 9.3%) showed estrogenicity values ranging from 0.1 to 1.7 ng/L of EEQs; only two samples showed values greater than 1 ng/L of EEQs. Figure 1 shows dilution–response curves for a high-estrogenic and a low-estrogenic sample.

The geographic distribution of highly estrogenic samples shows some clustering around Porto (Ponte Nova Barcelos, Formariz, and Ponte Moreira) and Lisboa (Ponte do Sacavém and Esteiro Seixal); 13 of the 17 samples with estrogenicity values greater than 0.1 ng/L of EEQs (including two with >1 ng/L of EEQs) originated at these sites (Fig. 2). Conversely, all but one sample from Ria Aveiro, Ponte Formoselha, and Ponte Ribeira Pernes belonged to the non- or low-estrogenic class. The Monte da Vinha site appears to be an exception, because it showed a relatively high proportion of highly estrogenic samples despite being far from major Portuguese industrial areas. Given its location in the Guadiana River, this site may receive influences from neighboring Spain (Fig. 2).

The appearance of estrogenic samples did not follow any general temporal trend. However, some sampling points did show a temporal clustering of estrogenic samples, such as Ponte Moreira from April to July 2002 or Esteiro Seixal and Ponte Nova Barcelos from January to March 2002 (Table 2). No estrogenic samples were collected in May 2001, December 2001, or August 2002, whereas more than half the samples collected in February, November, and December 2002 were estrogenic (Table 2). These temporal variations may reflect some intrinsic pattern of the pollutant distribution, but the current data do not allow us to rigorously establish such a correlation.

Quantitation of endocrine disruptors in Portuguese rivers

Alkylphenols and BPA are estrogenic pollutants commonly found in rivers and streams in industrialized areas [17,18]. Chemical analysis by LC-MS of the 183 samples from Portuguese rivers revealed the presence of at least one of these compounds in all samples tested. Minimum, median, and mean concentrations detected for all analytes tested are listed in Table 3. The most prevalent compound was NPEO2, which was found in all 183 samples; the least prevalent, BPA, was detected in 72% of samples. Concentrations of these compounds followed an uneven distribution among different samples. Despite their ubiquity, total levels of alkylphenols were low in more than 90% of samples; only 10 samples showed total alkylphenol values greater than 10 μ g/L. Nine of these 10 highly contaminated samples were collected in only two sites, Ponte Moreira and Ponte do Sacavém, which also showed the highest concentrations of BPA (Table 3). Therefore, we concluded that a diffuse background of contamination by al-

Table 2. Estrogenic activity from 183 Portuguese River samples as calculated by recombinant yeast assay

Year	Month	Sampling sites										
		Ponte Nova Barcelos	Formariz	Ponte Moreira	Ria Aveiro	Ponte Formoselha	Ponte Ribeira Pernes	Praia do Caruê	Monte da Vinha	Ponte do Sacavém	Esteiro Seixal	
2001	April	0.304 ± 0.093	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL
	May	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL
	June	BDL	0.119 ± 0.043	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL
	August	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	0.145 ± 0.040	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL
	September	1.202 ± 0.053	0.683 ± 0.044	BDL	BDL	0.042 ± 0.004	0.026 ± 0.009	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL
	October	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	0.200 ± 0.043	BDL	BDL	BDL
	November	0.034 ± 0.003	ND	0.045 ± 0.010	BDL	ND	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL
	December	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL
	January	BDL	BDL	0.046 ± 0.002	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL
	February	0.048 ± 0.008	BDL	BDL	0.032 ± 0.002	0.042 ± 0.005	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	0.261 ± 0.016
	March	0.255 ± 0.008	BDL	0.035 ± 0.004	0.033 ± 0.003	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	0.965 ± 0.231
	April	BDL	BDL	0.103 ± 0.044	0.054 ± 0.010	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	0.055 ± 0.000
2002	May	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL
	June	BDL	BDL	0.170 ± 0.031	BDL	ND	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL
	July	BDL	BDL	0.238 ± 0.035	BDL	ND	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL
	August	BDL	BDL	BDL	0.038 ± 0.007	ND	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL
	September	BDL	BDL	0.029 ± 0.004	BDL	ND	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL
	October	BDL	BDL	BDL	BDL	ND	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL
	November	0.077 ± 0.016	BDL	BDL	BDL	ND	0.060 ± 0.013	0.034 ± 0.005	0.088 ± 0.023	0.041 ± 0.006	1.711 ± 0.624	ND
	December	0.047 ± 0.007	0.066 ± 0.012	0.049 ± 0.008	BDL	ND	0.038 ± 0.005	0.036 ± 0.004	0.056 ± 0.010	0.313 ± 0.045	0.265 ± 0.058	BDL
										0.031 ± 0.002	ND	ND

^a Estradiol equivalents in ng/L, 95% confidence interval. BDL = below detection limit; ND = not done.

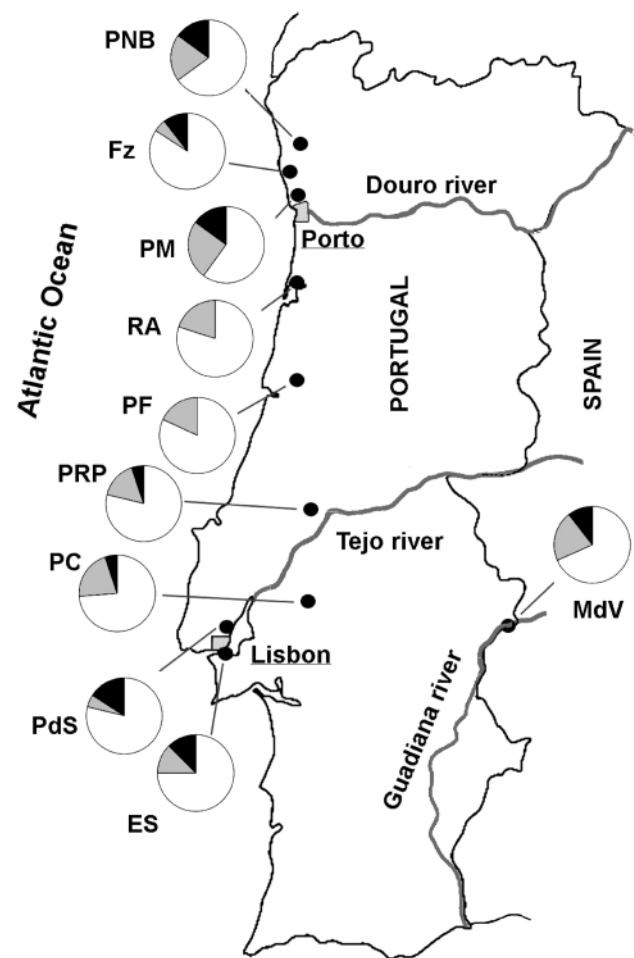


Fig. 2. Map of Portugal showing the geographical location of sampling points and the corresponding proportions of nonestrogenic (below detection limits; white sectors), low-estrogenic (<0.1 ng/L of estradiol equivalents [EEQs]; gray sectors), and high-estrogenic (>0.1 ng/L of EEQs; black sectors) samples. Refer to Table 1 for sampling point abbreviations.

kylphenolic compounds was combined with sporadic peaks of contamination, mainly occurring in two specific sampling sites and probably reflecting local contamination sources.

The estrogenic potential of different compounds can be calculated from their relative affinities to the estrogen receptor [13], as indicated by the EC₅₀ values reported in Table 3. Combining EC₅₀ values and the concentration factor because of the extraction procedure (1 L of water to 300 μL of final methanol extract), one can calculate for each compound the concentration that is required in the samples to elicit 50% of maximal response in the RYA at the minimal dilution used (1:30) (Table 3, row labeled EC₅₀ at min. dil.). We concluded that only NP and OP were present at high-enough concentrations in Portuguese river samples to trigger significant estrogenic response in the RYA assay (Table 3, italic entries). In addition, of all the sampling points, only Ponte Moreira, Ponte do Sacavém, and to a minor extent, Monte da Vinha, Ria Aveiro, and Esteiro Seixal presented samples with loads of these compounds high enough to explain the estrogenic response observed (Table 3).

Figure 3 shows the temporal distributions of NP, OP, and BPA loads and the EEQ values from RYA in Ponte Moreira and Ponte do Sacavém, which showed the highest proportion of samples with high levels of estrogenic pollutants. The single

Table 3. Concentrations ($\mu\text{g/L}$) of different endocrine disruptors in Portuguese River waters^a

Location ^b	NEPO1			NPEO2			NP			OP			Total AP			BPA		
	Max	Median	Average	Max	Median	Average	Max	Median	Average	Max	Median	Average	Max	Median	Average	Max	Median	Average
PNB	1.12	0.26	0.31	1.29	0.30	0.44	0.48	BDL	0.11	BDL	0.07	2.10	0.90	0.93	0.24	BDL	0.03	
Fz	3.62	0.36	0.64	5.24	0.40	1.11	0.62	BDL	0.14	BDL	0.10	9.15	1.03	1.99	BDL	BDL	BDL	
PM	27.75	1.16	3.25	6.11	0.88	1.42	12.97	2.34	2.62	0.91	0.91	39.52	4.53	8.21	5.03	0.19	0.81	
RA	9.32	BDL	0.80	1.12	0.14	0.28	9.48	0.91	0.57	BDL	0.11	15.29	0.44	1.76	0.95	BDL	0.09	
PF	9.92	BDL	0.23	1.41	0.30	0.45	0.38	BDL	0.11	0.13	0.04	2.45	0.45	0.56	0.16	BDL	0.01	
PRP	1.42	0.25	0.40	1.11	0.25	0.33	0.64	BDL	0.12	1.66	0.15	2.99	0.74	0.96	2.62	BDL	0.23	
PC	1.20	0.22	0.23	0.66	0.10	0.17	0.29	BDL	0.07	0.85	0.11	1.61	0.59	0.58	1.36	BDL	0.12	
MdV	0.92	0.26	0.30	0.86	0.15	0.24	2.69	BDL	0.26	0.09	0.43	4.17	1.11	1.23	1.08	BDL	0.10	
PdS	18.92	2.43	3.72	12.64	1.25	2.10	25.53	30.23	4.20	2.13	2.13	57.29	6.95	12.15	4.67	0.38	0.92	
ES	1.45	0.30	0.32	2.05	0.34	0.60	1.13	BDL	0.24	0.20	0.20	3.21	1.55	1.37	0.80	BDL	0.06	
EC50 ^c	2,983.20			BDL			79.20	188.00							1644.00			
EC50 at min. dil. ^d	29.83						0.79	1.88										

^a BDL = below detection limit; BPA = bisphenol A; EC50 = median effective concentration; NP = nonylphenol; NPEO1 = nonylphenol monoethoxylate; NPEO2 = nonylphenol diethoxylate; OP = octylphenol; Total AP = sum of NPEO1, NPEO2, NP, and OP.

^b See Table 1 for definitions of location abbreviations.

^c EC50 as in Céspedes et al. [13].

^d Minimum calculated from sample concentration and 1:30 assay dilution factors.

peak of estrogenic activity in Ponte do Sacavém (October 2002) coincided with a parallel peak of OP and, to a lesser extent, NP. A similar correlation is observed between the two peaks of estrogenicity in June and July 2002 and the high loads of OP, NP, and BPA in these samples from Ponte Moreira. In general, the correlation between chemical loads and estrogenicity was good for OP and somewhat weaker for NP and BPA (Fig. 3). We did find no correlation between sample estrogenicity and concentrations of NPEO1 or NPEO2 (data not shown). These different correlations agree with the differential intrinsic estrogenicity of these compounds except for NP, which in principle has the strongest estrogenic effect [13] but the distribution of which did not correlate completely with estrogenic activity in our samples. A possible explanation may lie in the presence of different isomers of NP, which cannot be separated by LC-MS but that show very different affinities for the estrogen receptor [19]. It is conceivable that the isomeric composition and, hence, its estrogenic activity of NP may vary depending on its technical origin.

The correlation between alkylphenol concentrations and estrogenicity values did not apply to Ponte Nova Barcelos, Formariz, Monte da Vinha, and Esteiro Seixal, all of which are sites where the observed concentrations for these compounds were much lower than the ones required to explain the observed peaks of estrogenicity (Tables 2 and 3). In previous surveys, we detected different putative endocrine disruptors, such as triazines, chloroacetanilides, phenylureas, tributylphosphate, and chlorophenols, in Ponte Novo Barcelos, Formariz, and Monte da Vinha from agricultural as well as industrial origin [20–22]. We do not have a good explanation for the high RYA values obtained in Esteiro Seixal samples. That sampling point lies in the estuary of the Tejo River, and chemical analyses carried out as a quality control for these waters since 1999 revealed moderate but significant concentrations of pesticides [15]. Given its proximity to Lisbon, several potential contaminants are conceivable, either from urban (untreated sewage), industrial (detergents, chlorinated phenolic compounds), and agricultural (pesticides) origin.

CONCLUSION

From the present results and those of previous surveys, we conclude that contamination of surface waters by endocrine disruptors occurs sporadically, following a punctuated pattern (Tables 2 and 3 and Fig. 3) [22]. It probably reflects a common trend in estrogenic contamination, which apparently occurs in discontinuous peaks rather than as a constant level of pollution. This pattern stresses the requirement for constant and continuous monitoring of geographical spots of ecological or sanitary interest. Because our survey included urban, industrial, and agricultural sites, the nature of estrogenic contaminants likely differs from site to site. We found only two sites (Ponte Moreira and Ponte do Sacavém) in which the concentrations of industrial surfactants and plasticizers were high enough to explain the estrogenicity levels detected by RYA. For the remainder of the sites, we propose that pesticides most likely are responsible for the estrogenicity peaks. Whatever the chemical nature of the contaminants may be, however, our results indicate that only a continuous monitoring program can ensure that unacceptable levels of endocrine disruption do not impact local ecosystems and, ultimately, affect human health. Functional tests that are affordable and not labor-intensive, such as the RYA, may be decisive in attaining such continuous control.

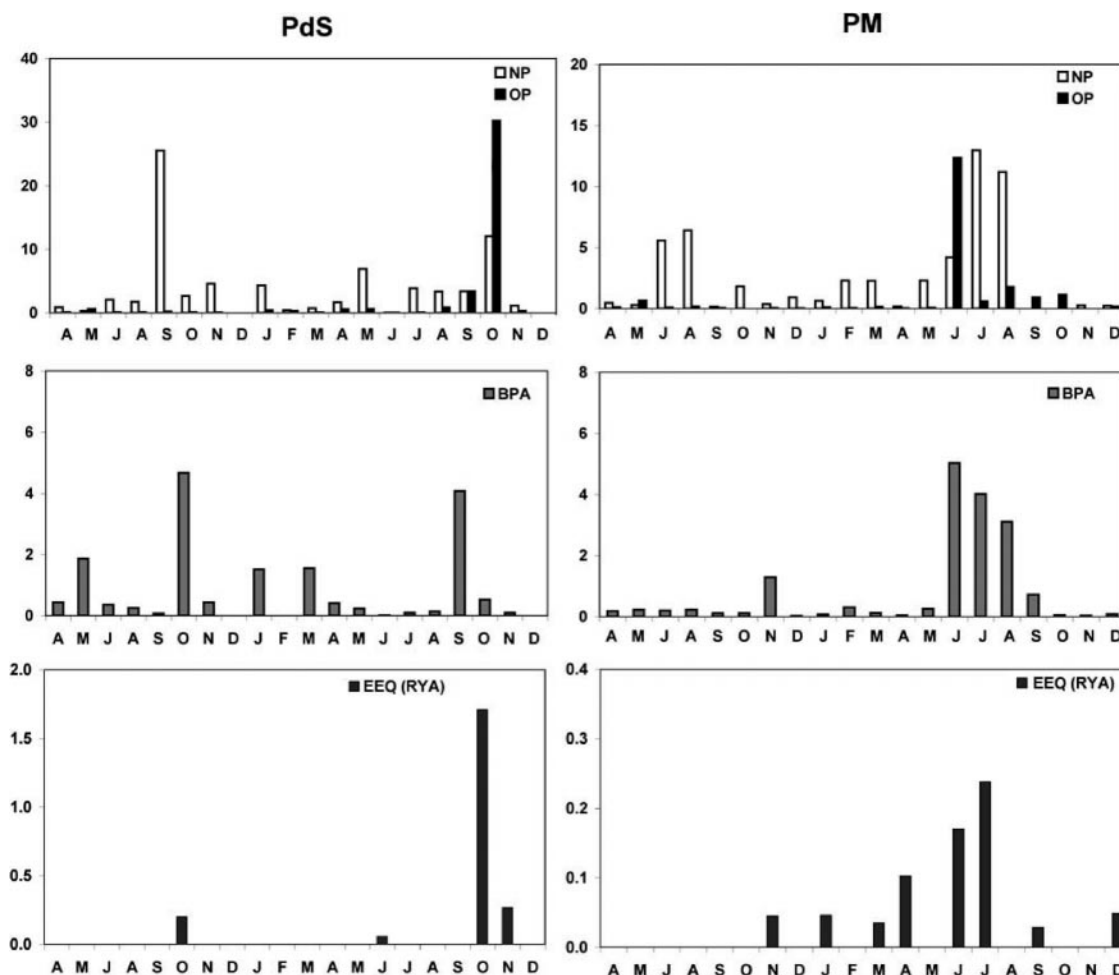


Fig. 3. Temporal variations of concentrations of nonylphenol (NP), octylphenol (OP), and bisphenol A (BPA) as well as estrogenicity values for samples from Ponte Moreira (left) and Ponte do Sacavém (right). Concentrations of NP, OP, and BPA are given in $\mu\text{g/L}$; estrogenicity values from recombinant yeast assay (RYA) are given in ng/L of estradiol equivalents (EEQs). Initials represent months. The eight values on the left correspond to samples taken during the period from April to December 2001 (July 2001 excluded); the rest refer to 2002 samples.

Acknowledgement—We thank Roser Chaler, Dori Fanjul, Margarete Ferreira, and Sílvia Jiménez for technical assistance. This work has been supported by the Ministerio do Ambiente of Portugal (Endocrine disruption in river waters from Portugal). We acknowledge additional funding from the Spanish Ministry for Science and Technology (CTM2006-0313E, BMC2001-0246 and SAF2002-00371) and the European Union (SWIFT-WFD, SSPI-CT-2003-502492 and EURO-LIMPACS, GOCE-CT-2003-505540). The present work reflects only the authors' views, and the European Community is not liable for any use that may be made of the information contained therein.

REFERENCES

- Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan DM, Sinks T, Tilson HA. 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect* 4(Suppl 104):715–740.
- Degen GH, Bolt HM. 2000. Endocrine disruptors: Update on xenoestrogens. *Int Arch Occup Environ Health* 73:433–441.
- Barlow S, Kavlock RJ, Moore JA, Schantz SL, Sheehan DM, Shuey DL, Lary JM. 1999. Teratology Society Public Affairs Committee position paper: Developmental toxicity of endocrine disruptors to humans. *Teratology* 60:365–375.
- Colborn T, vom Saal FS, Soto AM. 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 101:378–384.
- Coldham NG, Dave M, Sivapathasundaram S, McDonnell DP, Connor C, Sauer MJ. 1997. Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay. *Environ Health Perspect* 105:734–742.
- Fang H, Tong W, Shi LM, Blair R, Perkins R, Branham W, Hass BS, Xie Q, Dial SL, Moland CL, Sheehan DM. 2001. Structure–activity relationships for a large diverse set of natural, synthetic, and environmental estrogens. *Chem Res Toxicol* 14:280–294.
- Witorsch R. 2002. Endocrine disruptors: Can biological effects and environmental risks be predicted? *Regul Toxicol Pharmacol* 36:118–130.
- Mueller SO. 2002. Overview of in vitro tools to assess the estrogenic and antiestrogenic activity of phytoestrogens. *J Chromat B Anal Technol Biomed Life Sci* 777:155–165.
- Gaido KW, Leonard LS, Lovell S, Gould JC, Babai D, Portier CJ, McDonnell DP. 1997. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol Appl Pharmacol* 143:205–212.
- García-Reyero N, Grau E, Castillo M, López de Alda M, Barceló D, Piña B. 2001. Monitoring of endocrine disruptors in surface waters by the yeast recombinant assay. *Environ Toxicol Chem* 20:1152–1158.
- Rehmann K, Schramm K-W, Krettrup AA. 1999. Applicability of a yeast estrogen screen for the detection of estrogen-like activities in environmental samples. *Chemosphere* 38:3303–3312.
- European Communities. 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000. Brussels, Belgium.
- Céspedes R, Petrovic M, Raldúa D, Saura U, Piña B, Lacorte S, Viana P, Barceló D. 2004. Integrated protocol for the determination of endocrine disrupting activity in the surface waters and sediments using biological techniques by recombinant yeast assay

- and chemical analysis by LC-ESI-MS. *Anal Bioanal Chem* 378: 697–708.
14. Garcia-Reyero N, Raldúa D, Quirós L, Llaveria G, Cerdà J, Barceló D, Grimalt J, Piña B. 2004. Use of vitellogenin mRNA as a biomarker for endocrine disruption in feral and cultured fish. *Anal Bioanal Chem* 378:670–675.
 15. Lacorte S, Viana P, Guillamon M, Tauler R, Barceló D. 2001. Main findings and conclusions of the implementation of Directive 76/464/CEE concerning the monitoring of organic pollutants in surface waters (Portugal April 1999–May 2000). *J Environ Monit* 3:475–478.
 16. Sherman F. 1992. Getting started with yeast. *Methods Enzymol* 194:3–21.
 17. Petrovic M, Solé M, López de Alda MJ, Barceló D. 2002. Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: Integration of chemical analysis and biological effects on feral carps. *Environ Toxicol Chem* 21:2146–2156.
 18. Solé M, López de Alda MJ, Castillo M, Porte C, Ladegaard-Pedersen K, Barceló D. 2000. Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from the Catalanian area (NE Spain). *Environ Sci Technol* 34:5076–5083.
 19. Kim Y-S, Katase T, Sekine S, Inoue T, Makino M, Uchiyama T, Fujimoto Y, Yamashi N. 2004. Variation in estrogenic activity among fractions of a commercial nonylphenol by high performance liquid chromatography. *Chemosphere* 54:1127–1134.
 20. Tauler R, Lacorte S, Guillamón M, Céspedes RPV, Barceló D. 2004. Chemometrics modeling of main contamination sources in surface waters of Portugal. *Environ Toxicol Chem* 23:565–575.
 21. Martinez E, Llobet I, Lacorte S, Viana P, Barcelo D. 2002. Patterns and levels of halogenated volatile compounds in Portuguese surface waters. *J Environ Monit* 4:253–257.
 22. Tauler R, de Azevedo D, Lacorte S, Cespedes R, Viana P, Barcelo D. 2001. Organic pollutants in surface waters from Portugal using chemometric interpretation. *Environ Technol* 22:1043–1054.

4.3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS:

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

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

A continuación, se evalúan los dos estudios quimiométricos llevados a cabo con los datos generados en el PVA para el cumplimiento de la D. 76/464/CE:

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

La matriz de datos utilizada fue 10 plaguicidas X 46 puntos de muestreo X 6 meses, con 46 filas y 10 columnas o variables. Por tanto, en el PCA las filas corresponden al nº de muestras y las columnas corresponden al nº de componentes principales (PCs).

La suposición inicial fue que las mayores variaciones de concentraciones observadas en los compuestos detectados fueron debidas a un número reducido de fuentes de contaminación de distinto origen. Los datos experimentales fueron inicialmente autoescalados, de forma que a cada valor se le restó la mediana de la variable y se dividió por la desviación estándar; es decir, los datos fueron:

- *centrados* para eliminar las contribuciones constantes de ruido de fondo que no son de interés para la interpretación de la variación de los datos y
- *escalados*, de forma que se aumentó el peso de las variables con menores varianzas.

El diagrama de *Scores* permitió deducir la distribución geográfica y temporal de las fuentes de contaminación detectadas, mapeando las muestras y mostrando sus diferencias y similitudes.

En el estudio PCA, fueron necesarios 4 componentes principales para explicar más del 75% de la varianza de los datos, de forma que:

- PC1 explica el 27% de la varianza total y los compuestos que más contribuyeron fueron de origen agrícola (atrazina, alaclor y propanil).
- PC2 (16% de la variación de los datos autoescalados) describe la segunda fuente de contaminación, relacionada con actividades industriales (el herbicida Irgarol, TBP y PCP) con valores superiores en Portos y Ponte Moreira, en el norte de Portugal cerca de Porto.
- PC3 (13% de la varianza de los datos). Irgarol y DNP tienen diagramas de *loadings* positivos, mientras que simazina, TBA y PCP tienen *loadings* negativos. Las muestras están distribuidas en diferentes regiones de Portugal, con actividades agrícolas e industriales.
- PC4 (11% de la varianza de los datos). Registró *loadings* negativos para simazina y alacloro y *scores* negativos puntualmente en Monte da Vinha y Ponte Moreira.

Por tanto, el estudio de los datos con el PCA ha permitido una descripción superior de las principales fuentes de contaminación ambiental y de las distribuciones geográficas y temporales y las principales correlaciones entre contaminantes.

2) "Chemometric modelling of main contamination sources in surface waters of Portugal" (2004) R.Tauler, S.Lacorte, M. Guillamón, R.Céspedes, P.Viana, D.Barceló. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 23. 565-575.

Se proponen y comparan varios métodos quimiométricos de análisis de datos para el análisis, identificación e interpretación de las principales fuentes de contaminación de 19 SVOCs en aguas superficiales de Portugal en el PVA realizado entre abril 1999 y mayo 2000, así como para la resolución y modelización de las distribuciones geográficas y temporales de estas fuentes de contaminación y distinguir entre puntos de emisión y principales fuentes de contaminación difusa.

Los métodos en dos modos o direcciones PCA y MCR-ALS, asumen un modelo bilineal (a). PCA es el método más utilizado y permite reducir el número de variables y facilitar la interpretación de la matriz de datos de las principales fuentes de contaminación (Esbensen y col., 1994). Por otra parte, MCR-ALS es un método de regresión que permite la descomposición bilineal de una respuesta instrumental compleja en las contribuciones vinculada a cada uno de los n componentes puros en el sistema bajo estudio (De Juan y col., 2003).

Por otra parte, los métodos en tres modos o direcciones, es decir, en forma de cubo de datos (b), que permiten un aumento de información, pero con una mayor complejidad matemática. Los métodos PARAFAC-ALS (Bro 1997) y TUCKER3-ALS (Tucker 1966) se ha aplicado y comparado en el análisis de datos ambientales con estructuras más complejas organizadas en cubos de datos (De Juan y col., 2001; Peré-Trepat y col., 2007; Tauler y col., 2009)

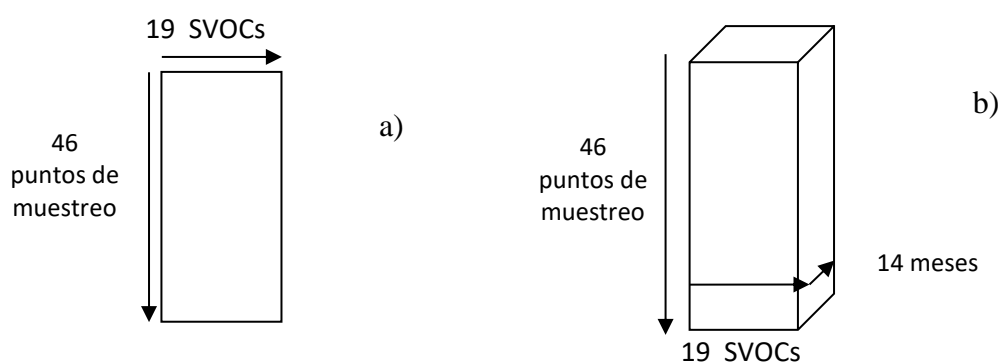


Figura 4. 4. Estructura de tablas de datos ambientales en dos (a) y tres (b) modos o direcciones respectivamente

El estudio quimiométrico se centró en determinar las principales fuentes de contaminación de estos valores más altos, así como determinar y modelizar sus distribuciones geográficas y temporales. Se han aplicado y comparado los modelos trilineales PARAFAC-ALS y TUCKER3-ALS para el análisis multivariante de los datos ambientales. En el modelo TUCKER3, se usan 3 índices para describir los componentes en los 3 modos de la matriz de datos, mientras que en el modelo PARAFAC, más restrictivo que el anterior, un único índice describe los componentes en los 3 modos de la matriz de datos. Normalmente se aplican restricciones ortogonales. Para un gran número de componentes, el modelo TUCKER3 puede ser bastante más difícil de interpretar por el gran número de posibles interacciones entre los elementos.

Se testearon y compararon varios métodos de pretratamiento de los datos, como el centrado y el autoescalado de los datos de las columnas. Se utilizaron 5 componentes principales para explicar más del 85% de la varianza de los datos:

- PC1 explica el 29.1% de la varianza total y los compuestos que más contribuyeron fueron el ácido 4-cloro-2-metil fenoxiacético (detectado en el 24.3% de las muestras a concentraciones superiores a 0,1 µg/L), el 2,4-D y el mecoprop (generalmente formulados con el anterior) y la simazina, todos ellos de origen agrícola, y el tributilfosfato (TBP), de origen industrial. Éstos últimos, ampliamente utilizados, contribuyen a la contaminación difusa.
- PC2 explica el 25% de la varianza restante. Identificó principalmente una fuente de contaminación agrícola difusa de los herbicidas atrazina y simazina. La simazina tiene una fuente de contaminación independiente de la del PC1, donde ambos compuestos estaban positivamente correlacionados. Sin embargo, tienen una correlación positiva con la atrazina, ya que ambos herbicidas se formulan juntos.
- PC3 explica el 13.9% de la varianza de los datos principalmente debido al TBP, siendo en menor grado tomado negativamente el ácido 4-cloro-2-metil fenoxiacético y el mecoprop. Este componente principal (PC3) describe una fuente de contaminación industrial con altas emisiones de TBP en la zona industrial textil del río Ave.
- PC4 explica el 8.7% de la varianza de los datos. Registró *loadings* negativos para alacloro, atrazina y metolacloro y *loadings* positivos para simazina y 2,4-D. El PC4 describe por tanto la contaminación difusa producida por los herbicidas alacloro, atrazina y metolacloro, localizada en varias áreas del centro y Sur de Portugal y España, siendo Monte da Vinha, situado en la frontera entre ambos países, el punto con mayor contribución del PC4.
- PC5 explica el 7.2% de la varianza de los datos restantes. Los compuestos con mayor contribución fueron el 2,4-D y de forma menos significativa la atrazina, la bentazona, y el 2,4,5-triclorofenoxiacético. La mayor contribución del PC5 fue detectada en las épocas de cosecha y post-cosecha. La distribución de *scores* fue difusa y extendida a través del área geográfica entera, incluyendo zonas industriales en el norte y zonas agrícolas en el sur. Por tanto, este componente principal fue relacionado con contaminación difusa de los 2 herbicidas 2,4-D y el ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético, ampliamente utilizados.

El uso de varios métodos quimiométricos aumenta la fiabilidad de los resultados obtenidos y permite realizar interpretaciones similares sobre las fuentes más importantes de contaminación (*loadings*) y sobre sus distribuciones geográficas y temporales (*scores*). La mayor flexibilidad de los modelos bilineales (PCA y MCR) permite una mejor resolución de los datos experimentales. Entre las 3 metodologías aplicadas, PARAFAC utiliza menos grados de libertad y por tanto es el modelo más simple y restrictivo. Sin embargo, PCA, utiliza más grados de libertad, es decir, el número de parámetros que se calculan es superior y por tanto puede dar lugar a modelos más flexibles y complejos. Por tanto, se considera de gran utilidad el análisis quimiométrico de los datos multivariantes generados en los PVA para determinar el potencial de los contaminantes en las regiones estudiadas. Los resultados obtenidos en este estudio intentan contribuir a evaluar cualitativamente la situación global de la contaminación en aguas superficiales de Portugal y dar apoyo a las políticas medioambientales de control para la implementación de la Directiva 76/464/CE.

4.4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS: PVA PARA EL CUMPLIMIENTO DE LA D. 2000/60/CE EN PORTUGAL

4.4.1. Niveles de EDCs en el PVA de la D. 2000/60/CE mediante LC-MS (MS)

El análisis de 186 muestras de aguas de río mediante LC-MS, evidenciaron que los EDCs más ubicuos detectados en las muestras de agua fueron los compuestos alquilfenólicos: nonifenol mono y di etoxilados (NP₁EO, NP₂EO), NP (con concentraciones entre 0.1 y 25,5 µg/L) y el DEHP. La contaminación más alta de EDCs en Portugal fue detectada principalmente en áreas industriales (Ponte Moreira (PM) y Formariz (Fz), cerca de Porto), así como en un punto de muestreo urbano (Ponte do Sacavem (PdS), cerca de Lisboa. Estos niveles permitieron identificar áreas “*hot spots*” que coincidieron con aquellas zonas observadas en un PVA anterior (Lacorte y col., 2001).

En la tabla 4.1. se muestra un resumen de los ríos, las cuencas hidrográficas, las actividades agrícolas e industriales, así como el rango de concentración de cada una de las familias de EDCs analizadas mediante LC-MS en las muestras de agua, así como la estrogenicidad determinada por RYA. A continuación, se resumen los principales resultados obtenidos para cada familia de compuestos.

Tabla.4.1. Resumen de los ríos y correspondientes cuencas hidrográficas, actividades agrícolas e industriales y concentraciones obtenidas para los EDCs estudiados.

Código	Punto de muestreo	Río (Cuenca Río)	Región hidrográfica	Urbana	Actividad		LC-MS						RYA
					Agrícola	Industrial	Conc NP (µg/L)	Conc OP (µg/L)	Conc APEOs (µg/L)	Conc BPA (µg/L)	Conc PAEs (ng/L)	Conc Estr. (ng/L)	E2 eq (ng/L)
PNB	Ponte Nova Barcelos	Cávado	RH 2	U	Maíz, trigo, vino	-	0.15-0.48	0.09-0.77	0.12-1.29	0.09-0.24	0.18-60.06	0.8-10.2 (E1)	bdl 1.202±0.053
Fz	Formariz	Ave	RH 2	U	-	textil	0.15-0.62	0.10-0.81	0.07-5.24	-	0.18-50.69	-	bdl 0.683±0.044
PM	Ponte Moreira	Leça	RH 2	U	-	textil	0.16- 12.97	0.09- 12.34	0.06- 27.75	0.09- 5.03	0.18- 102.26	-	bdl 0.238±0.035
RA	Ria Aveiro	Aveiro Novo		-	vino	papel	0.05-9.48	0.07-0.91	0.07- 11.90	0.12-0.95	0.18-53.80	-	bdl 0.054±0.010
PF	Ponte Formoselha	Mondego	RH 4	-	arroz, olivas		0.16-0.38	0.09-0.13	0.07- 11.90	0.12-0.16	0.18- 128.39	-	bdl 0.042±0.005
PRP	Ponte Ribeira Pernes	Alviela (Tajo)	RH 5	-	-	textil	0.01-0.64	0.13-1.66	0.06-1.42	0.11- 2.62	0.18-51.47	-	bdl 0.145±0.040
PC	Praia de Coruche	Tranco Sorraia (Tajo)	RH 5	-	verduras	industrial	0.11-0.29	0.10-0.85	0.07-1.20	0.90-1.36	0.18- 82.30	-	bdl 0.221±0.064
MdV	Monte da Vinha	Guadiana	RH7	-	arroz, maíz	industrial	0.14-2.69	0.09-2.22	0.07-0.92	0.09-1.08	0.18-19.92	-	bdl 0.313±0.045
PdS	Ponte do Sacavém	Tranco (Tajo)	RH 5	-	verduras	industrial	0.27- 25.53	0.09- 30.23	0.12- 18.92	0.10- 4.67	0.18-47.00	-	bdl 1.711±0.624
Es	Estero Seixal	Tajo	RH5	U	arroz	papel reciclado	0.15-1.13	0.09-2.73	0.07-2.05	0.10-0.80	0.18-41.12	0.8-10.2 (E1)	bdl 0.965±0.231

Compuestos alquilfenólicos (APs y APEOs): Se detectó NP en el 80% de las muestras a concentraciones entre 0.15 y 25.53 $\mu\text{g/L}$, siendo el punto de muestro Ponte do Sacavem, en el río Tajo, la zona con mayor concentración. Solamente en nueve muestras de ríos, las concentraciones de NP fueron superiores a 5 $\mu\text{g/L}$. Adicionalmente, se detectaron los oligómeros de cadena corta del NPEO ($n_{EO}=1$ y 2) prácticamente en todas las muestras de agua, con niveles entre 0.22 y 27.9 $\mu\text{g/L}$ y de 0.06 a 12.7 $\mu\text{g/L}$ para NP₁EO y NP₂EO respectivamente, encontrándose la mayor concentración en el punto de muestreo de Ponte Moreira, con actividad industrial. Los compuestos NP₁EO y NP₂EO fueron incluidos en el estudio por ser lipofílicos, tóxicos y persistentes en el medio acuático (Ahel y col., 1995).

Los principales usos de APEOs son en la industria textil, de piel y curtidos y en la industria papelera. En la figura 4.5., donde se indican las concentraciones promedio de los APs, los APEOs y el BPA, puede verse claramente que las 2 muestras en las que se han obtenido niveles más altos, tanto de NP y NPEOs como de BPA, han sido puntos con actividad industrial textil y de papel próximos a grandes núcleos urbanos, Ponte Moreira (PM) (en el Norte de Portugal, de origen agrícola) y Ponte de Sacavem (PdS), punto de origen industrial cerca de Lisboa, seguidos de Ria Aveiro (RA) y Fz.

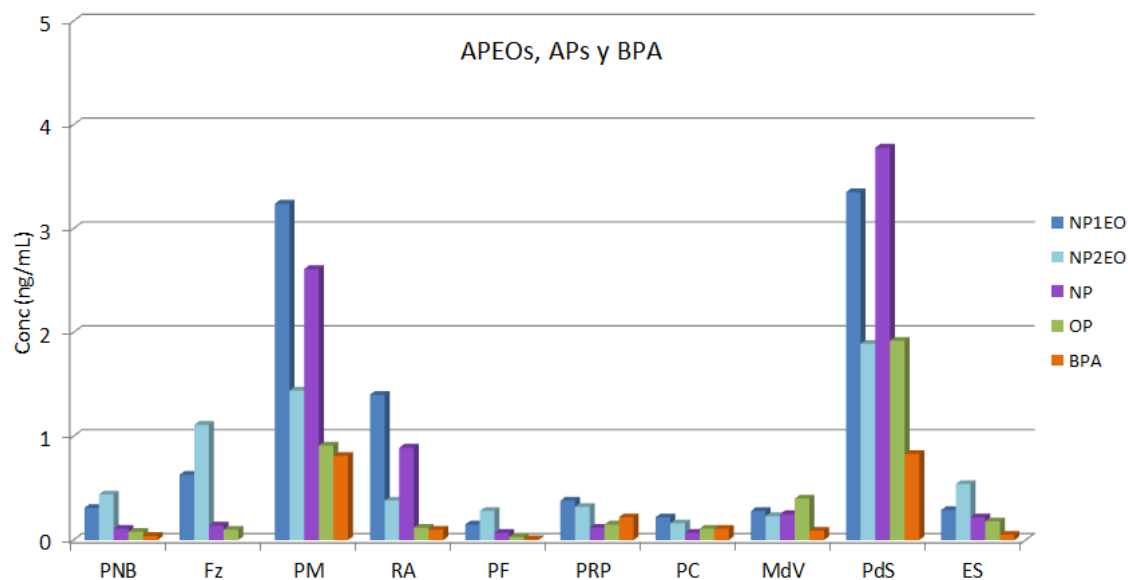


Figura 4.5. Concentraciones promedio ($\mu\text{g/L}$) de compuestos alquilfenólicos (NP₁EO, NP₂EO, NP y OP) y BPA obtenidas del análisis por LC-ESI-MS de las 186 muestras de agua (periodo de abril 2001 a diciembre 2002).

Conforme a la Directiva 2008/105/CE que establece las Normas de Calidad Ambiental (NCA), el NP y el OP tienen un valor máximo de NCA-MA (AA-EQS) de 0.30 y 0.10 $\mu\text{g/L}$ respectivamente. Tal y como puede verse en la figura 4.5., NP sobrepasó el valor 0.30 $\mu\text{g/L}$ en 3 de los 10 puntos muestreados, correspondientes a Ponte Moreira, Ponte do Sacavem y Ria Aveiro, mientras que OP excedió el valor medio de 0.1 $\mu\text{g/L}$ en 7 de los 10 puntos de muestreo. Por tanto, todos estos puntos comportarían actualmente incumplimientos.

Distribuciones geográficas para los compuestos alquilfenólicos: en las figuras 4.6. y 4.7. se muestran las concentraciones ($\mu\text{g/L}$) detectadas por LC-ESI-MS en muestras de agua superficiales obtenidas en dos puntos de muestreo. Se representan las distribuciones temporales (de abril 2001 a diciembre 2002) obtenidas para los compuestos NP, OP, NP₁EO y NP₂EO en Ponte Moreira y Ponte do Sacavem, los puntos de muestreo en los que se detectaron las concentraciones más elevadas. En algunos puntos se observa claramente la variación estacional de concentraciones. Así, en Ponte Moreira las concentraciones más altas se detectaron en los meses de verano (junio, agosto 2001 y julio, agosto 2002), probablemente debido a una disminución de las precipitaciones en este periodo y por tanto menor dilución de las aguas residuales de EDARs en las aguas receptoras de los ríos en este periodo. En Ponte do Sacavem, las muestras correspondientes a septiembre 2001, mayo y octubre 2002 registraron los niveles más altos.

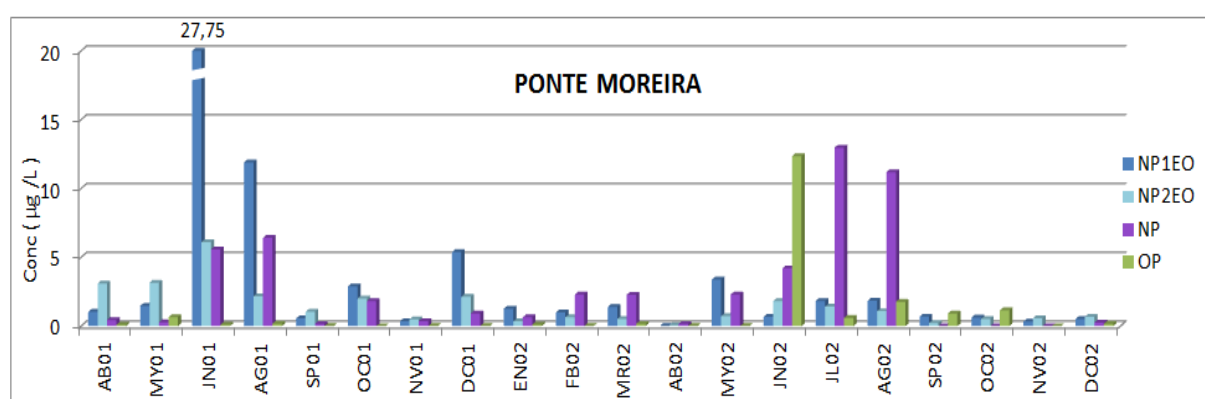


Figura 4.6. Concentraciones ($\mu\text{g/L}$) de NP₁EO, NP₂EO, NP y OP, obtenidas por LC-ESI-MS en Ponte Moreira, de abril 2001 a diciembre 2002.

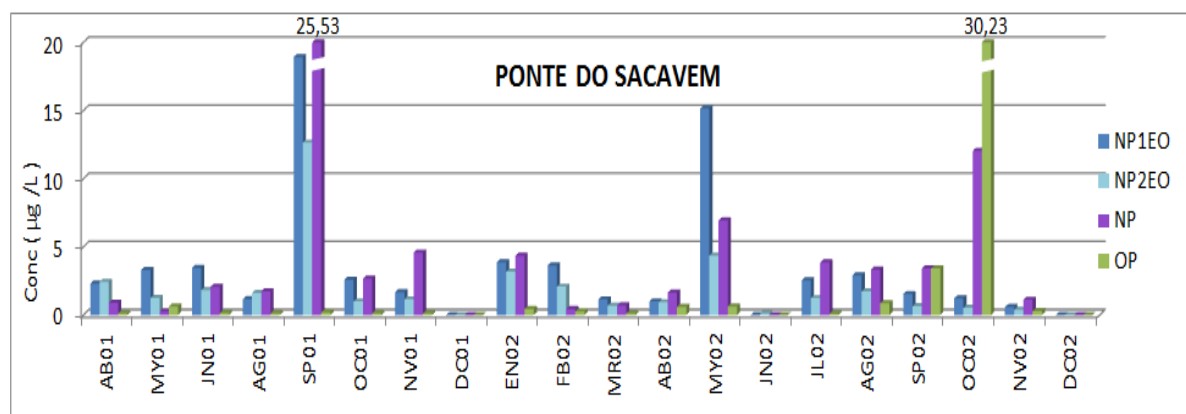


Figura 4.7. Concentraciones ($\mu\text{g/L}$) de NP₁EO, NP₂EO, NP y OP, obtenidas por LC-ESI-MS en Ponte do Sacavem, de abril 2001 a diciembre 2002. Las muestras de diciembre 2001 y 2002 no fueron incluidas en el PVA.

Aunque el origen de estos compuestos no siempre puede ser confirmado claramente en los diversos medios acuáticos estudiados, la presencia y niveles de APEOs detectados en aguas portuguesas se atribuyen a vertidos directos industriales, ya que hay presencia de varias industrias asociadas con el uso de estos

compuestos como metalurgia en el río Lima (Rocha y col., 2014b) y Sado (Caeiro y col., 2005; Rocha y col 2013b), lixiviación de plaguicidas utilizados en agricultura (Rocha y col., 2014b), vertidos directos urbanos conteniendo detergentes y otros productos domésticos (Rocha y col., 2014b), al posible uso del fango como fertilizante en Sado (Petrovic y col., 2002; Rocha y col 2013b), etc.

En Canadá, USA y Japón, entre otros, se han promovido acciones voluntarias en la industria con el propósito de disminuir la utilización de NP/NPEs. Esta política de restricción ha tomado en la Unión Europea un carácter mandatorio a través de la Directiva 2003/53/CE, que establece limitaciones para la comercialización y uso de NP y etoxilados NPEOs en concentraciones iguales o superiores al 0,1% en masa, en detergentes domésticos y para ciertos usos industriales, por su potencial disruptor endocrino en la fauna y los humanos (Safe 2000; Zoller y col., 2004; Zoller y col., 2006). Entre los sectores que han disminuido o eliminado el uso de NP y NPnEOs debido a esta restricción, se encuentra la industria de la producción de pasta de celulosa y papel, la industria textil y de curtidos y la metalúrgica. Sin embargo, se han seguido detectando NPEOs y NP a concentraciones considerables tanto en Portugal como en otros países de la UE (Céspedes y col., 2005; Céspedes y col., 2006; Mimic y col., 2009; Arditoglou y Voutsas 2010; Jonkers y col., 2010; Rocha y col., 2011; Rocha y col., 2013a; Rocha y col., 2013b; Rocha y col., 2015), demostrando que estos compuestos continúan utilizándose.

En conclusión, estas restricciones normativas junto al incremento de depuradoras y de tratamientos más avanzados en algunas EDARs, han comportado una disminución en el uso y vertido de NP y NPnEOs en el medio acuático, confirmado en algunos estudios realizados en la península Ibérica (Gorga y col., 2015). En Portugal también se observa en general una disminución en los niveles de los compuestos alquilfenólicos, tal y como puede verse en la tabla 4.2., desde las concentraciones más altas detectadas en el PVA realizado en esta tesis en 2001 para APs y APEOs (25.53 µg/L de NP, 30.23 µg/L de OP, 27.75 µg/L de NP₁EO y 12.64 µg/L de NP₂EO), a las concentraciones de estudios más recientes: 0.23 µg/L de NP y 0.90 µg/L de NP₂EO detectados en el estuario del río Sado por (Rocha y col., 2013), 0.547, 0.102 y 0.113 µg/L de NP, OP y NP₁EO respectivamente en la laguna de Ría Formosa (Rocha y col., 2013c) y 0.25, 0.102 y 0.113 µg/L de NP, OP y NP₁EO respectivamente en el río Ave (Rocha y col., 2013d).

A continuación, se relacionan los principales estudios en los que se han determinado APs y APEOs en Portugal, realizados posteriormente a esta tesis:

En 2005, se determinaron NP y OP entre otros EDCs industriales en diversos estuarios de ríos portugueses mediante SPE y análisis por HPLC-DAD y GC-MS: En el estuario del río Mondego, no se detectaron APs a niveles cuantificables (Ribeiro y col., 2009a). Se detectó 4-OP (pero no 4-NP) en el estuario del río Duero con contaminación urbana, industrial y agrícola por los vertidos de efluentes de EDARs, y en una de las dos zonas estudiadas en el estuario del río Sado (Ribeiro y col., 2009c).

Posteriormente, Rocha y col., han realizado varios estudios entre 2009 y 2011 en los que han determinado APs y APEOs en distintos ríos portugueses (Duero, Aveiro, Mondego, Tajo, Sado y Formosa): En el río Duero, la contaminación antropogénica aumentó respecto a estudios anteriores en la zona (Ribeiro y col., 2009), alcanzando en 2009 0.10 $\mu\text{g/L}$ de APs total en el río, donde 4-t-OP fue el AP con mayor concentración, con 0.023 $\mu\text{g/L}$, de marzo a mayo. Los APEOs alcanzaron en total niveles de 2.35 $\mu\text{g/L}$, siendo NPEOs los más abundantes, con una concentración media de 0.40 $\mu\text{g/L}$ NP₁EO y 1.80 $\mu\text{g/L}$ de NP₂EO (Rocha y col., 2012a). En el río Leça, en un estudio en 2009 (Rocha y col., 2012b) se incluyeron NP₂EO y OP₂EO por ser más lipofílicos, tóxicos y persistentes que sus homólogos y porque se detectaron previamente en varios afluentes a niveles de $\mu\text{g/L}$ (Azevedo y col. 2001). En Ponte Moreira (PM), punto del PVA situado en el río Leça, se han detectado en esta tesis las concentraciones más altas de compuestos de origen industrial (APEOs, BPA y ftalatos), alcanzando hasta 27.75 $\mu\text{g/L}$ de APEOs, coincidiendo con estudios previos (Azevedo y col. 2001; Petrovic y col., 2002). En el estuario del río Duero y la costa de Porto, donde se detectaron el 98% de los EDC analizados entre 2009 y 2010, se obtuvieron hasta 1.1 $\mu\text{g/L}$ de contaminantes industriales (Rocha y col., 2013a). En la laguna del río Formosa, se detectaron en todos los puntos APEOs, los compuestos industriales más abundantes con valores de 0.10 $\mu\text{g/L}$ de OPEOs en primavera y verano. De los APs (4t-OP, 4-OP y 4-n-NP) determinados por zona, 4-NP fue el más abundante, alcanzando concentraciones de 0.51 $\mu\text{g/L}$ en verano. La concentración total de APs fue de 0.024 a 0.029 $\mu\text{g/L}$ (Rocha y col., 2013c). En el estuario del río Mondego se detectaron en 2010 ~ 11 $\mu\text{g/L}$ de APs y ~ 13 $\mu\text{g/L}$ de APEOs y se estimó que estos compuestos son los que contribuyen mayoritariamente a la actividad estrogénica detectada (Rocha y col., 2014a).

En 2011, en el río Lima, se obtuvo una concentración anual media de 0.26 $\mu\text{g/L}$ de APs, con el valor promedio anual más alto de 0.36 $\mu\text{g/L}$ de APs, mientras que la mayor concentración promedio anual de APEOs (0.70 $\mu\text{g/L}$) fue detectada en un punto en el norte del río, con intensa actividad industrial (Rocha y col., 2014b). En la laguna costera de Ria Aveiro, situada en la costa noroeste de Portugal, se determinaron APEOs con distribución ubicua y concentraciones muy altas en todos los puntos de muestreo, como el resto de EDCs analizados, atribuyendo los niveles a los vertidos industriales y domésticos en la laguna (Rocha y col., 2015b), confirmando los niveles detectados en Ria Aveiro en esta tesis (hasta 9.48 $\mu\text{g/L}$ de NP y 11.90 $\mu\text{g/L}$ de APEOs). En el río Mira, en principio con menor contaminación que los anteriores, se detectaron altas concentraciones de los EDCs analizados en todos los puntos, obteniendo un promedio de la suma anual de compuestos industriales y domésticos de ~ 1.36 $\mu\text{g/L}$ (Rocha y col., 2016).

Se ha confirmado la eficiencia en el proceso de eliminación de estos compuestos en las diferentes etapas del tratamiento de una EDAR en el estuario del río Tajo, en la que se detectó hasta 78 $\mu\text{g/L}$ de APs en la entrada de la EDAR y 5.2 $\mu\text{g/L}$ en el efluente (Mauricio y col., 2006). Posteriormente, en 2012, se determinaron APs y APEOs mediante SPE y UPLC-ESI-MS/MS en diversas etapas del tratamiento de una planta potabilizadora, detectando solamente en diversas muestras de la captación y del tratamiento de la potabilizadora en Lisboa, NP pero a concentraciones inferiores a 0,1 $\mu\text{g/L}$ y OP por debajo del LOQ (Carvalho y col, 2015).

Octilfenol: se detectaron concentraciones de OP superiores a 1 µg/L solamente en 12 muestras de agua del total analizadas (186), correspondientes a Ponte Moreira, Ponte do Sacavem y Monte da Vinha. Las mayores concentraciones detectadas corresponden a los mismos puntos en los que se han detectado altas concentraciones de NP: Ponte do Sacavem en junio 2002 (30.23 µg/L) y Ponte Moreira en octubre 2002 (12.34 µg/L).

La Directiva 2008/455/EC no establece un valor máximo de concentración para el OP (NCA-MAC), pero si establece el valor límite de 0.1 µg/L concentración media (NCA-MC), que es superada en 7 de los 10 puntos de muestreo estudiados.

Tal y como puede verse en la Tabla 4.2, en estudios posteriores llevados a cabo en distintos ríos y estuarios de Portugal, se detectó 4-OP, pero las concentraciones fueron siempre bajas (en el estuario del río Duero (Ribeiro y col., 2009b) con contaminación urbana, industrial y agrícola por los vertidos de efluentes de EDARs, y en una de las dos zonas estudiadas en el estuario del río Sado (Ribeiro y col., 2009c), o incluso en algunos casos no fue detectado, como es el caso del río Mondego (Ribeiro y col., 2009). Un caso excepcional fue el estudio realizado por Jonkers y col., en el que se registraron niveles de hasta 25.53 µg/L en agua superficial en Ria Aveiro, pero no es representativo, ya que corresponden a muestras del 2005, en el que se produjo una situación anómala debido a la gran sequía que tuvo lugar en Portugal ese año (Jonkers y col. 2010).

Posteriormente, Rocha y col., realizaron varios estudios en los que determinaron OP, encontrando en el río Duero concentraciones más altas de 0.023 µg/L (Rocha y col., 2012a) y la presencia de OP y OPEOs en la laguna del río Formosa, siendo más abundantes los OPEOs, con valores de 0.10 µg/L en primavera y verano (Rocha y col., 2013c). Los niveles detectados se encuentran en el rango inferior de las concentraciones del PVA realizado en esta tesis.

Bisfenol A: El BPA fue detectado a concentraciones superiores a 1 µg/L en doce muestras de agua. Sin embargo, solamente en cinco de ellas se encontró a niveles superiores a 2 µg/L, nivel a partir del cual se consideraba que causa efectos estrogénicos en los peces (Khrisnan y col., 1993; Berset y col., 2001) en el momento en que se llevó a cabo este estudio. No obstante, tal y como se comentó en la introducción, estudios posteriores han desvelado la sospecha de que el BPA puede causar efectos estrogénicos a niveles inferiores (Vom Saal y col., 2007), creando una gran controversia (Vandenberg y col., 2009), por lo cual, siguiendo el principio de precaución, deberían tenerse en cuenta todos los puntos de muestro en los que se detecte BPA, aunque sea a niveles inferiores a 2 µg/L.

En la figura 4.8. se muestran las concentraciones (µg/L) de BPA obtenidas mediante LC-ESI-MS mensualmente durante el PVA realizado.

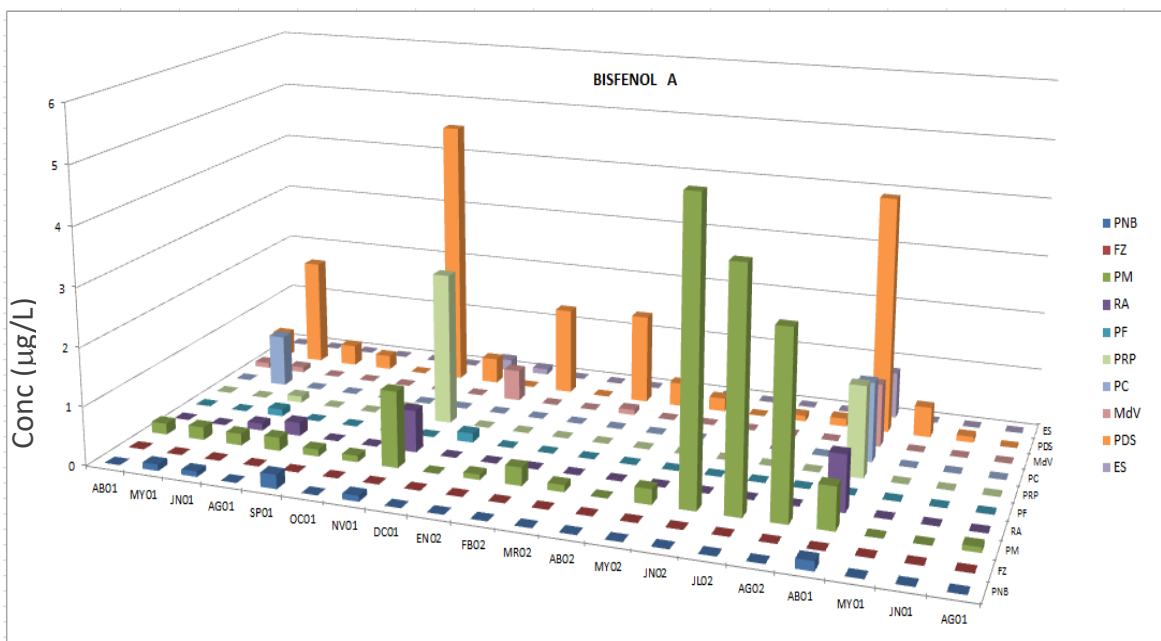


Figura 4.8. Concentraciones ($\mu\text{g/L}$) de BPA obtenidas mediante LC-ESI-MS en las muestras de agua de Portugal desde abril 2001 a diciembre 2002.

Las concentraciones de BPA detectadas en aguas de los ríos de Portugal, incluyendo los costeros, oscilaron entre valores por debajo de los límites de detección, a $5.03 \mu\text{g/L}$. La concentración más alta fue detectada en Ponte do Sacavem (octubre 2001) y con solamente un punto de muestreo del río (Praia de Coruche) con una concentración alrededor de $2 \mu\text{g/L}$ (septiembre 2002) y en Ponte Moreira (junio y julio 2002), que fue la única muestra con una concentración superior a $1 \mu\text{g/L}$. BPA fue ocasionalmente detectado en Ría Aveiro, Ponte Nova Barcelós, Praia Coruche, Monte da Vinha y Ponte Ribeira Pernes a concentraciones más bajas, entre 0.09 y $0.90 \mu\text{g/L}$. Estos niveles son similares a los citados en el anterior PVA, llevado a cabo de 1999 a 2001 (Lacorte y col., 2001; Céspedes, Máster, 2001).

Respecto a los niveles de BPA publicados en estudios posteriores realizados en Portugal, tal y como puede verse en la tabla 4.2., BPA es un contaminante ubicuo que ha sido detectado en diversos ríos portugueses: En 2005, se detectaron concentraciones hasta $0.88 \mu\text{g/L}$ en los puntos más cercanos a núcleos urbanos e industriales en el estuario del río Mondego (Ribeiro y col., 2009a) y alcanzando $10.7 \mu\text{g/L}$ en el estuario del río Duero (Ribeiro y col., 2009b), niveles anormalmente altos de BPA, atribuidos a una situación anómala y puntual, por la sequía más severa de las últimas 6 décadas en Portugal, producida en 2005. Los niveles de EDCs disminuyeron posteriormente, siendo similares a los niveles obtenidos en el PVA realizado en esta tesis en Portugal (Quirós y col., 2005), en el estudio anterior (Azevedo y col., 2001) y en el PVA en el río Llobregat (Céspedes y col., 2005). En el estuario del río Sado, se detectó BPA en algunos puntos a concentraciones $\sim 0.22 \mu\text{g/L}$ (Ribeiro y col., 2009c), más bajas que en los anteriores estudios.

En el PVA llevado a cabo en esta tesis, se tomaron muestras en el río Vouga, cerca de la entrada a la laguna (correspondiente al punto de muestreo Ría Aveiro), y se obtuvieron valores de BPA en el rango 0.12-0.95 $\mu\text{g/L}$. En 2005, en un estudio en los ríos y la laguna de Ria Aveiro, se detectaron niveles de BPA más altos en los ríos, hasta 0.7 $\mu\text{g/L}$, con concentraciones bastante superiores en el río Caster (Jonkers y col., 2010), comparables a las de otros estudios realizados en ríos del Norte de Europa (Heemken y col., 2001; Jonkers y col., 2003; Voutsas y col. 2006) e inferiores a las obtenidas en 2001-2004 en el marco de esta tesis en los PVA llevados a cabo en el río Llobregat (Céspedes y col., 2005) y en Portugal, en las zonas de Porto y Lisboa (Quirós y col., 2005). También se detectó BPA en depuradoras con los niveles más altos en efluentes industriales (Sousa y col., 2010). En 2011 se determinó la presencia ubicua de BPA en todos los puntos analizados en el estuario de Ría Aveiro (Rocha y col., 2015b) a concentraciones (~ 68 ng/L) superiores a las de otras aguas superficiales.

En 2010 Rocha y col., determinaron BPA y otros EDCs en 14 ríos del Norte de Portugal (Rocha y col., 2013a), detectando una amplia contaminación de BPA, especialmente en los ríos Ave, Cávado, Douro, Ferro, Sousa y Vizela, con niveles superiores a 0.039 $\mu\text{g/L}$, alcanzando la concentración de 0.098 $\mu\text{g/L}$. Se detectó BPA en todas las muestras, en la laguna de río Formosa (incluyendo el parque natural) (Rocha y col., 2013c) y en el estuario del río Mondego a concentraciones (~ 0.07 $\mu\text{g/L}$) superiores a las referidas en otros estudios en Portugal (Urbatzka y col., 2012), España (Céspedes y col., 2005) y en concordancia con episodios de disrupción endocrina de ovotestis reportados en la zona y demostrando que el estuario del río Mondego tiene un alto impacto de los vertidos de aguas residuales industriales y domésticas (Rocha y col., 2014a). También se determinó BPA en el río Mira y su estuario, incluyendo las áreas naturales protegidas (Rocha y col., 2016). Por otra parte, en el estudio en 2012 de 10 EDCs en diferentes puntos del tratamiento de una EDAR ubicada en el río Tajo cerca a Lisboa, Carvalho y col., observaron la eliminación casi completa ($\sim 98\%$) de BPA (Carvalho y col., 2016), demostrando la eficacia del tratamiento de la EDAR.

Ftalatos: DEHP fue el éster de ftalato más ubicuo y detectado a concentraciones más elevadas entre 1 y 9.4 $\mu\text{g/L}$, mientras que otros ftalatos fueron detectados ocasionalmente a concentraciones inferiores. Se obtuvieron concentraciones más altas de ftalatos en Ponte do Sacavem y Monte da Vinha. A las concentraciones inicialmente obtenidas en la tabla, se les restaron blancos para obtener las concentraciones finales.

Desde nuestro conocimiento, éste es el primer estudio que determina la contaminación por ftalatos en ríos de Portugal. Tampoco tenemos constancia de estudios posteriores, ya que, tal y como puede verse en la tabla 4.2., los EDCs estudiados en Portugal han sido principalmente APs, APEOs, BPA, estrógenos y fitoestrógenos.

Respecto a la normativa, el ftalato DEHP está legislado en la Lista II, con una concentración máxima permitida en descargas de 1.4 $\mu\text{g/L}$, la cual es claramente excedida en varios puntos de Portugal. Las Normas de Calidad Ambiental establecidas por la Directiva 2008/105/CE marcan un valor máximo de NCA-MA de 1.3 $\mu\text{g/L}$ para DEHP, superada en varios puntos de muestreo. También ha sido incluido en la lista de sustancias altamente peligrosas (SVHC, *Substances of Very High Concern*), del Reglamento REACH y en 2017 se añadieron

las propiedades de alteración endocrina que causan efectos adversos en el medio ambiente del BBP, DEHP, DBP y DIBP en esta lista, de igual forma que para el BPA (<https://echa.europa.eu/es/candidate-list-table>).

Estrógenos: dada la relevancia por la estrogenicidad que presentan a niveles bajos (ng/L), se realizó el análisis confirmatorio mediante LC-MS/MS, identificando E1 en Ponte Nova Barcelós y Estero Seixal.

Estudios previos han citado la presencia de estrógenos en Portugal (Quevauviller y col., 1989; Azevedo y col., 2001; Ferreira y Vale 2001). Los niveles de E1 y E2 detectados puntualmente (10.3 ng/L de E1) fueron similares a los citados en estudios previos en aguas superficiales de ríos y zonas costeras de Bélgica, Italia y Francia (Baronti y col., 2000; Belfroid y col., 1999; Cargouet y col., 2004; Noppe y col., 2007), mientras que los niveles de EE2 detectados fueron generalmente superiores a los citados en otros ríos europeos, pero similares a los observados en algunos estudios en Francia (Cargouet y col., 2004) y Portugal (Rocha y col., 2011a,c).

En estudios posteriores a esta tesis, los estrógenos determinados principalmente en Portugal fueron E1, E2 y E3:

Rocha y col., determinaron E1, E2 y EE2 en el 81% de las muestras en 14 ríos del Norte de Portugal, mediante análisis por SPE y GC-MS, confirmando los estrógenos detectados mediante GC-MS/MS. Únicamente obtuvieron niveles cuantificables de E1 y E2, 26.9 ng/L de E1 en el río Águeda (afluente del río Vouga) y niveles más altos que los detectados en este PVA, de 8.9 ng/L, 9.5 ng/L, y 11.5 ng/L de E2 en los ríos Ave (en el que se ubica el punto de muestreo Formariz), Támeiga y Lima, valores más altos que los detectados en este estudio, mientras que EE2 fue solamente detectado por debajo del límite de cuantificación (Rocha y col., 2013).

En el río Leça, uno de los de mayor contaminación en Portugal, en el que se sitúa Ponte Moreira, punto del PVA que ha registrado mayor concentración de EDCs de origen industrial (NP, NPEnO, BPP y DEHP) en el PVA descrito en este capítulo, no se han detectado estrógenos, confirmando los resultados obtenidos en el PVA. Sin embargo, posteriormente en 2009, se detectaron altos niveles de estrógenos MISMO NIVEL PVA (hasta 10 ng/L de E1), con diferencias estacionales (Rocha y col., 2012b).

De igual forma que hemos visto con otros contaminantes, los altos niveles de estrógenos detectados en el río Duero (hasta 112.9 ng/L de E1 y 101.9 ng/L de EE2), son atribuidos a la severa sequía sucedida en Portugal en el 2005 y por tanto no son representativos. (Ribeiro y col., 2009).

La concentración de estrógenos más elevada determinada en esta tesis, confirmada mediante LC-MS/MS, corresponde a 10,2 ng/L de E1 detectada en Estero Seixal, cerca de la desembocadura del Tajo y del núcleo urbano de Lisboa. En estudios posteriores llevados a cabo en el estuario del Río Tajo, se identificaron estrógenos a bajas concentraciones: E1, E2 y EE2, alcanzando 20ng/L de E2 y 4 ng/L de E1, con una carga estrogénica total de 13 ng/L EE2equiv., asociada a los estrógenos. (Rocha y col., 2015a). Por otra parte, en estudios realizados mediante SPE y UPLC-ESI-MS/MS en los procesos de tratamiento de agua en una EDAR y una ETAP en la cuenca del río Tajo, se detectó E3 en ambas plantas, en varias muestras del tratamiento de la ETAP a concentración inferior a 0,1 µg/L (Carvalho y col., 2015), en la EDAR obtuvieron una eficacia del ~98% en la eliminación del E3

a lo largo del tratamiento y detectaron E2 puntualmente (Carvalho y col., 2016), concluyendo la eficacia de los tratamientos de las plantas en la eliminación de los estrógenos.

En la zona del estuario del río Aveiro, con presencia de industrias y actividades agrícolas y aumento de población alrededor de la laguna, en 2005, se detectaron los niveles más altos en una EDAR urbana sin tratamiento secundario y se identificó la E1, estrógeno más frecuentemente detectado, como compuesto responsable de la estrogenicidad de las muestras mediante los bioensayos *in vitro* YES y YAS. Se detectaron estrógenos a 0.5-85 ng/L, LOD 92 ng/L de E2, con variaciones estacionales y niveles similares a los obtenidos en otros estudios en Europa y Canadá (Ternes y col. 1999; Aerni y col. 2003; Johnson y col. 2005; Pojana y col. 2007), Australia (Tan y col. 2007) y Japón (Isobe y col. 2003) pero inferiores a los estudios realizados previamente en ríos en Portugal en los PVA para el cumplimiento de las Directivas 76/464/CE y 2000/60/CE (Azevedo y col. 2001; Céspedes y col. 2004; Quirós y col. 2005). En otro estudio se detectaron estrógenos en todas las muestras a altas concentraciones, con las de EE2 (~24 ng/L) superiores a las de E2 y E1 (~14 ng/L y ~8 ng/L respectivamente), presencia confirmada en estudios anteriores, donde se detectó EE2 en 2 EDARs con mayor concentración (Rocha y col., 2015) a niveles similares de estrógenos en otros sitios del mundo (Cargouet y col., 2004; Laganà y col., 2004; Brossa y col., 2005; Pojana y col., 2007; Rocha y col., 2015), con efectos estrogénicos en la fauna acuática (Chichester y col., 2005), pudiendo incluso afectar a las personas (Safe y col., 2000). Las concentraciones medias anuales de estrógenos fueron ~46 ng/L y la carga estrogénica en esta laguna alcanzó ~50 ng/L EE_{2eq}.

En estudios posteriores llevados a cabo en la cuenca del río Mondego en 2005, no se detectaron los estrógenos E1 y E2 ni EE2 en ningún punto (Ribeiro y col., 2009a). Sin embargo, en 2010 se encontraron estrógenos en todas las muestras, con concentraciones E2 > E1 y > EE2 y con niveles más altos (~26 ng/L) en verano, periodo en el que se produce un aumento importante de población y en invierno (Rocha y col., 2013a). La media anual registrada en el río y estuario de Mondego fue para E1 y E2, entre 1.5 y 2 veces superior a la determinada en los estuarios de los ríos Ave y Duero respectivamente (Rocha y col., 2013b; Rocha y col., 2013c), donde los tratamientos de las EDARs son más eficientes.

En conclusión, se han detectado E1, E2 y E3 EE2 con técnicas de análisis más avanzadas para su determinación y/o confirmación (LC-MS/MS y GC-MS/MS). En la mayoría de estudios se han obtenido niveles de estrógenos más elevados en verano, asociados al incremento de población por los turistas y su origen se atribuye principalmente a los efluentes de EDARs y a vertidos de efluentes industriales y domésticos directos en los ríos.

En las Figuras 4.9. (a) y (b), se observa respectivamente una distribución de las actividades industriales y agrícolas en Portugal que complementan los datos de la tabla 4.1. (que contiene los ríos, las cuencas hidrográficas, las actividades agrícolas e industriales, el rango de concentración de cada una de las familias de EDCs analizadas y la estrogenicidad por RYA).

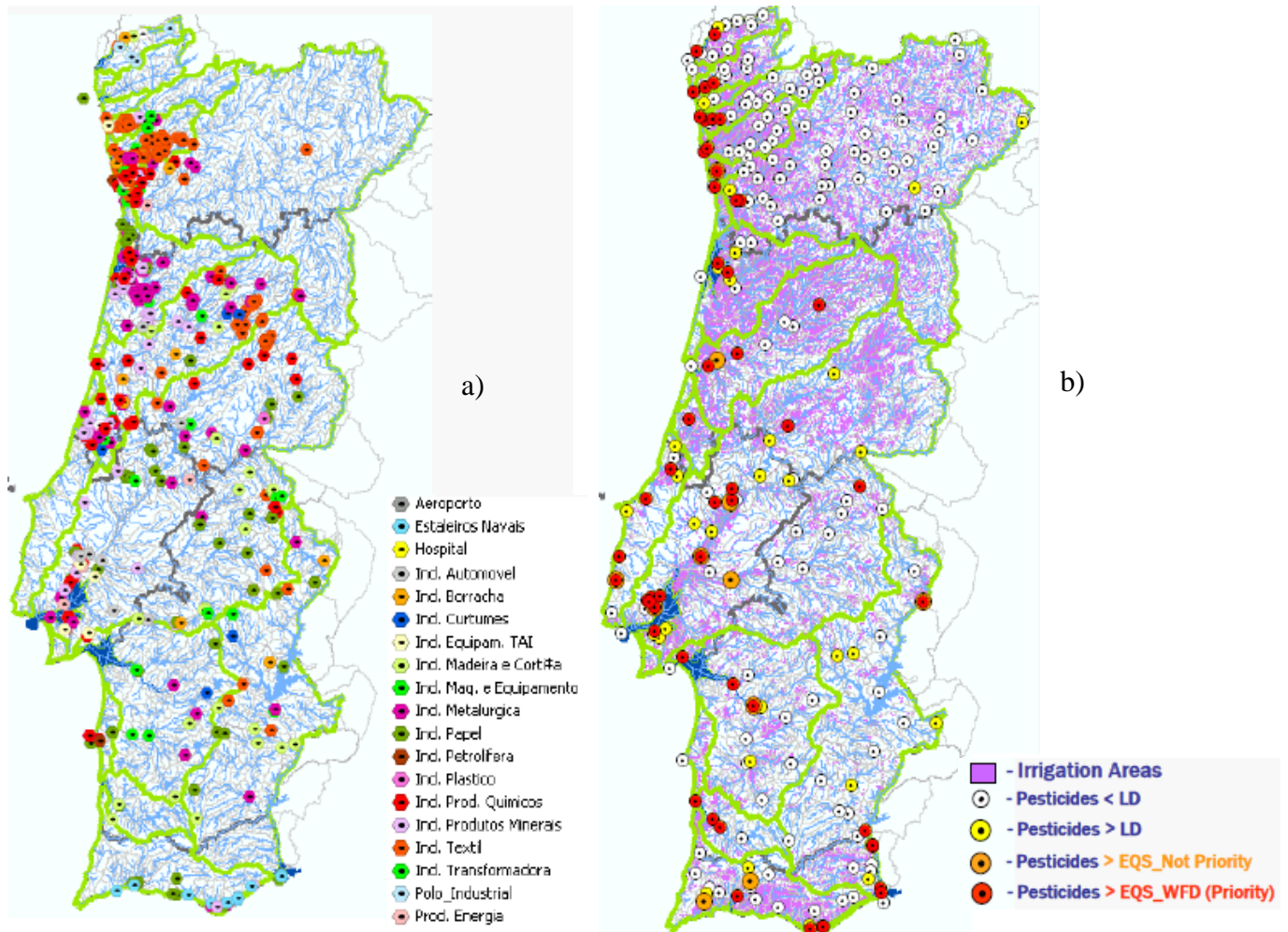


Figura 4.9. Ubicación de industrias (a) y actividades agrícolas (b) en Portugal (Fuente *SNIRH, Portugal*: <http://snirh.apambiente.pt>)

Se muestra la distribución en Portugal de:

(a) Actividades industriales: se observa una concentración en el NE de Portugal, especialmente industrias textiles y de productos químicos, cerca de Porto, en Ponte Moreira, uno de los puntos de muestreo que ha registrado concentraciones más elevadas de compuestos alquilfenólicos en esta tesis.

(b) Las concentraciones de plaguicidas en función de la actividad agrícola registrada en esos puntos. Se observa como los puntos Ponte do Sacavem cerca de Lisboa y Monte da Vinha en la frontera con España, registran niveles de plaguicidas superior a los niveles de NCA (EQS) establecidos por la D. 2000/60/CE. En el PVA realizado previamente con muestras tomadas durante 1999 y 2000, se observaron concentraciones más elevadas de plaguicidas totales y de plaguicidas estrogénicos (ej: atrazina, simazina, etc)

4.4.2. Evolución de los niveles de EDCs estudiados en Portugal (período 2000 – 2017)

En la tabla 4.2. se resumen los niveles de las familias de compuestos disruptores endocrinos estudiados en esta tesis, detectados en la geografía portuguesa que han sido publicados en el periodo 2000-2017. Se incluyen las concentraciones detectadas en:

- PVA llevado a cabo anteriormente a esta tesis por el mismo grupo de investigación para el cumplimiento de la D. 76/464/CE en el que se determinaron los plaguicidas especificados en la lista del aptdo. 4.1. y los EDCs NP y BPA (Azevedo y col., 2001), (Céspedes, Máster, 2001) (marcado en lila claro). Desde nuestro conocimiento, no se han publicado valores de estas familias de EDCs (APs, APEOs, BPA, ftalatos y hormonas esteroideas) en Portugal previamente.
- PVA llevado a cabo para el cumplimiento de la D. 2000/60/CE en el que se determinaron, en el marco de esta tesis, los compuestos APs, APEOs, BPA, ftalatos, estrógenos y benzotiazoles en aguas: se incluyen las concentraciones de EDCs determinadas mediante LC-MS: APs, APEOs y BPA publicadas junto a los valores de estrogenicidad total de la muestra (E2 eq) (Quirós y col., 2005) y los valores de ftalatos y estrógenos obtenidos en el PVA, no publicados, ambos marcados en lila. Adicionalmente, se incluyen los valores de APs, APEOs, APECs y estrógenos determinados en los sedimentos de los ríos y en fangos por Petrovic y col., (Petrovic y col., 2002) complementando el mismo PVA en Portugal.
- Estudios publicados posteriormente (periodo 2005-2017), en los que se han determinado los EDCs de las mismas familias (APs, APEOs, BPA y hormonas esteroideas) en aguas de Portugal. En general se han determinado los mismos EDCs seleccionados y estudiados en esta tesis doctoral, dada su relevancia a nivel estrogénico y ubicuidad en el medio, algunos de los cuales han sido incluso posteriormente incluidos en normativas europeas (D. 2003/53/CE, D. 2008/105/CE y D. 2015/495/CE) o listas de la EPA (CCL 4).

Tabla 4.2. Niveles de EDCs en Portugal desde el año 2000 hasta el 2017.

Río Estuario	Matrices (Portugal)	Año muestreo	Extracción	Técnica Analítica/Bioensayo	Compuestos EDCs	Concentraciones en agua (µg/L) o sedimentos (µg/kg)	Referencias
Río Miño Río Lima Río Cávado Río Ave Río Leca Río Vouga Río Mondego Río Tajo Río Tajo y afluentes Río Sado Río Mira Río Guadiana	Agua superficial 45 ptos. muestreo) (n=135 m)	2001 (Ag-Oct)	SPE OASIS HLB	GC-MS	NP BPA	0.03 – 30.0 µg/L 0.07 – 4.0 µg/L	(Azevedo y col., 2001)
	Agua superficial 45 ptos. muestreo) (n=644 muestras)	2001	SPE OASIS HLB	LC-ESI-MS	NP OP BPA Estrórg Plaguic	0.03 – 30.0 µg/L 0.07 – 4.0 µg/L 0.07 – 4.0 µg/L	(Céspedes, Máster, 2001)
Sedimentos de ríos en Portugal	Sedimentos (7 ptos. muestreo)	2001	PLE - SPE LiChrolute C18	LC-MS	NP ₁ EO NP ₂ EO NP ₃₋₁₅ EO NP ₁ EC NP ₂ EC NP OP ₁ EO / OP ₂ EO OP ₃₋₁₅ EO OP ₁ EC / OP ₂ EC OP	5.9 – 78 µg/kg 13 – 86 µg/kg 51 – 260 µg/kg nd – 395 µg/kg nd – 350 µg/kg 58 – 1170 µg/kg nd nd – 11 µg/kg nd nd – 8.6 µg/kg	(Petrovic y col., 2002)
Río Cávado Río Ave Río Leca Río Vouga Río Mondego Río Tajo Río Alviela (Tajo) Río Sorraia (Tajo) Río Trancao (Tajo) Río Guadiana	Agua superficial (10 ríos) (n=184m)	Abr.2001 Dic. 2002	SPE OASIS HLB	LC-MS (RYA)	NP ₁ EO NP ₂ EO NP OP BPA	nd– 27.65µg/L nd– 12.64 µg/L nd– 25.53 µg/L nd– 30.23 µg/L nd– 5.03 µg/L	(Quirós y col, 2004)
					HOBT DMP DEP DBP BBP DEHP E1 E2, E3, EE	nd–3.68 µg/L nd– 12.6 µg/L nd– 28.37 µg/L nd– 18.48 µg/L nd– 1.26 µg/L nd–128.39 µg/L nd– 5.8 ng/L nd	(Céspedes, tesis, 2015) (no publicados)
Estuario Río Tajo	Agua residual EDAR		SPE OASIS HLB	LC-MS/MS (ELISA)	APs (NP y OP) BPA E2	nd– 78.0 µg/L jnfl nd –5.20 µg/L efl nd – LOD µg/L nd – 1.73 ng/L	(Mauricio y col, 2006)
Estuario Río Mondego	Agua superficial	2005	SPE OASIS HLB Sílica	HPLC-DAD GC-MS	4-NP y 4-OP BPA E1, E2 y EE2	nd nd – 0.880 µg/L* nd	(Ribeiro y col., 2009a)
Estuario Río Duero	Agua superficial Río y estuario				4-NP y 4-OP BPA E1 E2 EE2	nd y bdl nd – 0.880 µg/L* nd – 112.9 ng/L* nd nd – 101.9 ng/L*	(Ribeiro y col., 2009b)
Estuario Río Sado	Agua superficial Río y estuario				2006 (July / Dec)	4-NP 4-OP BPA E1, E2 y EE2	
Ria Aveiro	Agua superficial río y laguna	2005?	SPE OASIS HLB	GC-MS	NP _n EO NP _n EC 4-NP 4-OP BPA Estrog?	nd–7.300 µg/L nd – 12.64 µg/L nd – 25.53 µg/L nd – 700 ng/L	(Jonkers y col., 2010)

Cap. 4. PROGRAMA DE VIGILANCIA AMBIENTAL en PORTUGAL

Muestras Matrices (Portugal)	Río Estuario	Año muestreo	Extracción	Técnica Analítica / Bioensayo	Compuestos EDCs	Concentraciones en agua (µg/L) o sedimentos (µg/kg)	Referencias
Ría Aveiro	Efluentes EDARs	Jun 2005 Feb 2006		LC-MS-MS YES & YAS	NP BPA E1 y E2 EE	0.010-2.35 µg/L 0.010-0.897 µg/L nd- 85 y nd-92 ng/L nd ng/L	(Sousa y col., 2010)
Río Duero	Agua superficial	2009 11 EDCs	SPE OASIS HLB	GC-MS	APEOs APs BPA E1 E2 y EE	nd – 2 mg/L nd – 10 ng/L nd	(Rocha y col., 2012a)
Río Leça	Agua superficial						(Rocha y col., 2012b)
14 Ríos (Ave, Cavado, Douro, Ferro, Sousa, Vizela)	Agua superficial	May-Jul. 2010	SPE OASIS HLB	GC-MS GC-MS-MS	APEOs APs BPA E1 y E2 E3	nd nd nd-0.0984 µg/L* nd- 26.9 ng/L nd – 2.5 ng/L	(Rocha y col., 2013)
Estuario Río Douro Costa Porto	Agua superficial Río y estuario	2009 2010	SPE OASIS HLB	GC-MS	APEOs 4-NP 4-OP BPA E1 y E2 EE2	nd – 1.1 µg/L nd – 20 ng/L	(Rocha y col, 2013a)
Estuario Río Sado	Agua superficial	2010	SPE OASIS HLB	GC-MS	NP ₁ EO NP ₂ EO 4-NP 4-OP BPA E1 E2 EE2	nd – 0.1129 µg/L nd – 0.1019 µg/L nd – 0.250 µg/L nd – 0.1019 µg/L nd – 0.1129 µg/L nd – 101.9 ng/L nd – 112.9 ng/L nd – 10 ng/L	(Rocha y col, 2013b)
Laguna Ría Formosa	Agua superficial				(Rocha y col, 2013c)		
Río Ave Y costa	Agua superficial				(Rocha y col, 2013d)		
Estuario Río Mondego	Agua superficial	17 EDCs 2010	SPE OASIS HLB	GC-MS	NP ₁ EO, NP ₂ EO 4-NP, 4-OP BPA E1 E2 EE2	nd – 0.013 µg/L nd – 0.0115 µg/L 8.5-18.5 µg/L 9-36 ng/L 11-48 ng/L 2-4 ng/L	(Rocha y col, 2014a)
Río Lima	Agua superficial	2011					(Rocha y col, 2014b)
Estuario Río Tajo	Agua superficial Río y estuario			GC-MS	NP ₁ EO NP ₂ EO 4-NP 4-OP BPA	nd – 0.1129 µg/L nd – 0.1019 µg/L nd – 0.250 µg/L nd – 0.1019 µg/L nd – 0.1129 µg/L	(Rocha y col, 2015a)
Ría de Aveiro	Agua superficial	17 EDCs	SPE OASIS HLB		NP, OP NP ₁ EO, NP ₂ EO	nd – 0.1129 µg/L nd – 0.1019 µg/L	(Rocha y col, 2015b)
Río Mira Ría de Aveiro	Agua superficial	17 EDCs 2011		GC-MS	NP, OP NP ₁ EO, NP ₂ EO OP ₁ EO, OP ₂ EO E1, E2, EE2	nd – 0.1129 µg/L nd – 0.1019 µg/L nd – 0.250 µg/L nd – 0.1019 µg/L	(Rocha y col, 2016)
ETAP Cuenca río Tajo	Captación, tratamiento y sistema distribución ETAP en Portugal	10 EDCs 60 muestras Feb/April 2012 n = 5	SPE	UPLC-ESI-MS/MS	4-n-NP 4-tert-OP BPA 17 β E2 E1, E3, EE2 Prog, mestr,DES	nd – 0.1129 µg/L nd – 0.1019 µg/L nd – 0.250 µg/L nd – 0.1019 µg/L nd – 0.1129 µg/L	(Carvalho y col, 2015)
EDAR en río Tajo (Lisboa)	Agua residual EDAR en Lisboa	10 EDCs en 2012	SPE	LC-ESI-MS/MS	NP, OP BPA E1, E2 E3, EE2, DES Prog.,Mestranol	nd – 0.1129 µg/L nd – 0.1019 µg/L nd – 0.250 µg/L nd – 0.1019 µg/L nd – 0.1129 µg/L	(Carvalho y col, 2016)

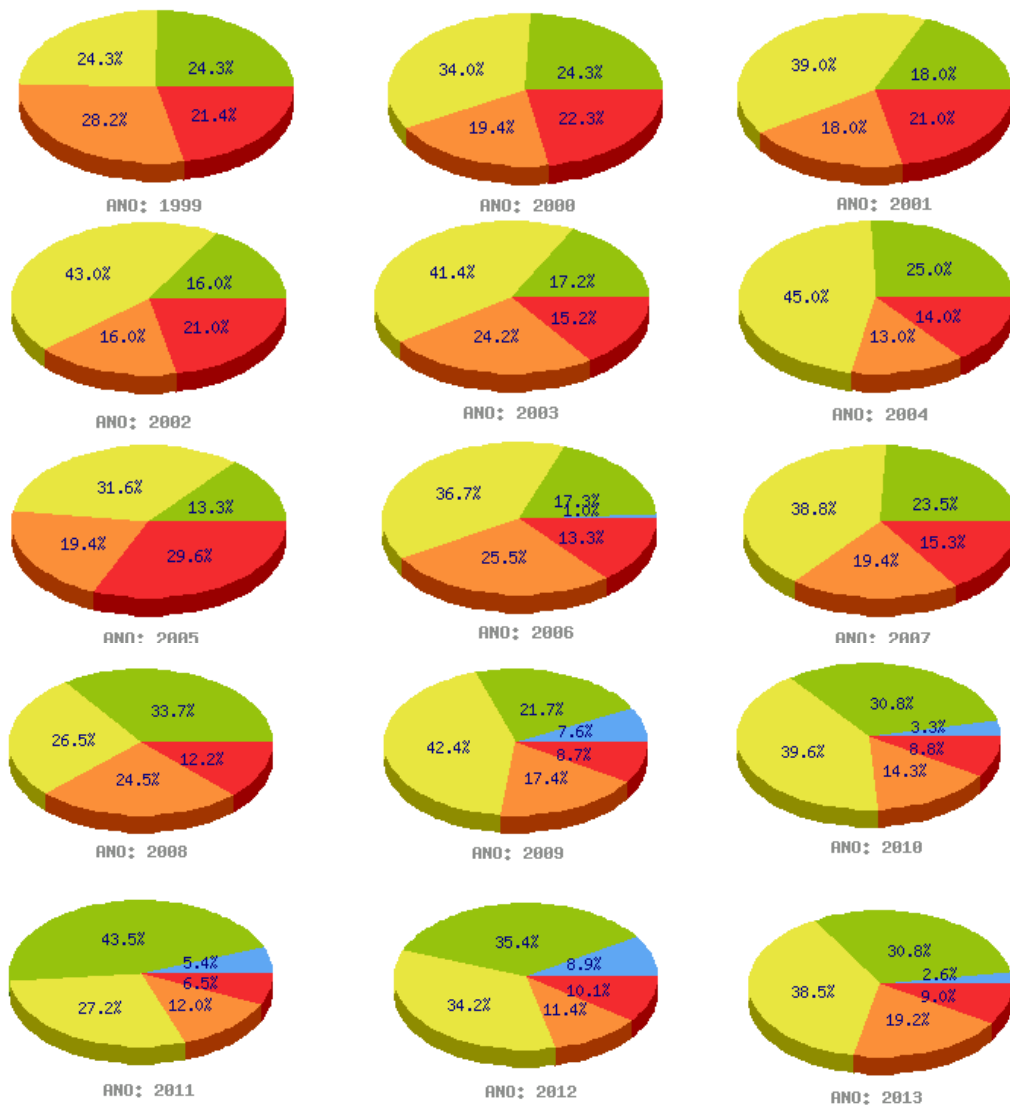
Los resultados obtenidos en los diversos estudios llevados a cabo para la determinación de EDCs en Portugal posteriormente (2005-2017) (ver tabla 4.2.), confirman la presencia de los EDCs detectados previamente en esta tesis, en muchos casos continua y ubicua, y ponen de manifiesto la necesidad de llevar a cabo *monitorings* o Programas de Vigilancia Ambiental de EDCs sistemáticamente y tomar medidas preventivas en las zonas estudiadas para asegurar el cumplimiento de la DMA, preservar el hábitat y evitar los potenciales impactos en la salud de la fauna local y las personas. Los resultados físico-químicos obtenidos en la mayoría de estudios, en general confirman la mala calidad del agua y enfatizan la necesidad de realizar PVA.

Aunque en algunos casos los niveles de EDCs detectados pueden inducir efectos endocrinos en los animales acuáticos, como por ejemplo la presencia de altas concentraciones de estrógenos en el río Leça (Rocha y col., 2012b), las cantidades toxicológicamente relevantes medidas en el río Lima (Rocha y col., 2014b), etc, en general, a los niveles de concentración detectados, es improbable que todos los EDCs estudiados causen individualmente disrupción endocrina en la fauna local. Sin embargo, bajo un escenario de exposición continua, no puede excluirse una acción aditiva y/o sinérgica de la carga de los químicos estrogénicos. El efecto cocktail que pueden alcanzar la mezcla de los diversos EDCs presentes, hace la presencia de estos contaminantes aún más preocupante que los niveles de cada compuesto individual, lo cual refuerza la necesidad de llevar a cabo PVA o *monitorings* continuos.

Por otra parte, en los ríos y en ecosistemas acuáticos que sean presuntamente menos contaminados y parezcan menos afectados por los EDCs, también se recomienda realizar PVA. Por ejemplo, en el río Mira, anunciado como uno de los ríos de menor contaminación en Portugal, se detectó inesperadamente la presencia ubicua de EDCs a altas concentraciones (Rocha y col., 2016), y por tanto pueden generar potenciales efectos en la fauna local y las personas.

Calidad del agua en Portugal:

Existe una relación entre la calidad del agua y los niveles de contaminación por EDCs. En la Fig. 4.10. se observa la evolución anual durante 15 años de la calidad del agua en Portugal, desde el 1999 (año de inicio del anterior PVA (Azevedo y col., 2001) para el cumplimiento de la D. 2000/60/CE), hasta el 2013. Se incluyen los porcentajes anuales de cada tipo de calidad del agua (a) según la clasificación oficial (A excelente, B buena, C media, D mala y E muy mala), así como la evolución desde 1999 hasta 2013 (b), se observa una clara tendencia a una mejora a lo largo de los años. Así, en el gráfico de la Fig. 4.10. (b) se observa la disminución del porcentaje de las aguas con peor calidad (E, en rojo), pasando de un 21-22% en el 2000-2001, es decir, cuando se realizó el muestreo de aguas en esta tesis, a un 9-10% en los últimos años. Por otra parte, la mejora de la calidad del agua se observa en el aumento de fracción de agua de buena calidad (B: verde), desde el 18.24% en el 2000-2001 hasta el 30-35% en 2012-2013, e incluso la obtención de una fracción del agua de calidad excelente (A: azul) desde el año 2009. En el año 2005, en el que se produjo la mayor sequía de las últimas 6 décadas en Portugal, se observa claramente el empeoramiento puntual de la calidad del agua en los picos de la Fig. 4.10. (b), coincidiendo con las concentraciones tan altas de BPA y estrógenos obtenidas en muestras de agua tomadas en el invierno del 2005 (Jonkers y col., 2010).



A Excelente **B** Boa **C** Razoável **D** Má **E** Muito Má

b)

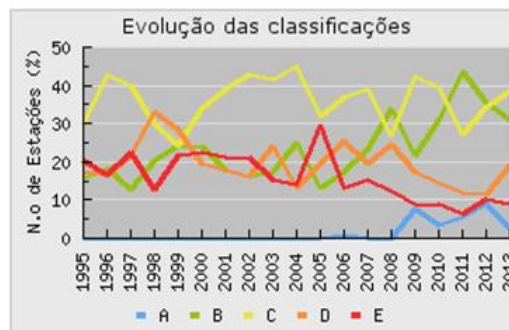


Figura 4.10. Evolução de la clasificación de la calidad del agua en Portugal desde el año 1999 hasta el 2013. Fuente: (SNIRH, Portugal: <http://snirh.apambiente.pt>).

Los parámetros físico-químicos determinados en varios estudios sobre EDCs realizados por Rocha y col., en diversos ríos portugueses (Rocha y col., 2014; Rocha y col., 2016), ponen de manifiesto generalmente la mala calidad del agua de los puntos muestreados, más acentuado en puntos cercanos a núcleos industriales y urbanos, como por ejemplo Ponte Moreira y Ponte do Sacavem, o con una gran actividad agrícola, como Monte da Vinha. La Figura 4.11. aporta datos oficiales del *Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos de Portugal* (<http://snirh.apambiente.pt>). Representa la clasificación de la calidad del agua en Portugal en 2001 y 2002, periodo en el que se realizó el PVA en esta tesis, se observa como los puntos que registraron peor calidad del agua corresponden a los puntos más industriales del norte de Portugal y a los grandes núcleos urbanos de Porto y Lisboa, coincidiendo con las mayores concentraciones de EDCs registrados en Ponte Moreira y Ponte do Sacavem en el *monitoring* realizado. También se observa mala calidad del agua en los puntos con una gran actividad agrícola, como Monte da Vinha, punto transfronterizo con España.

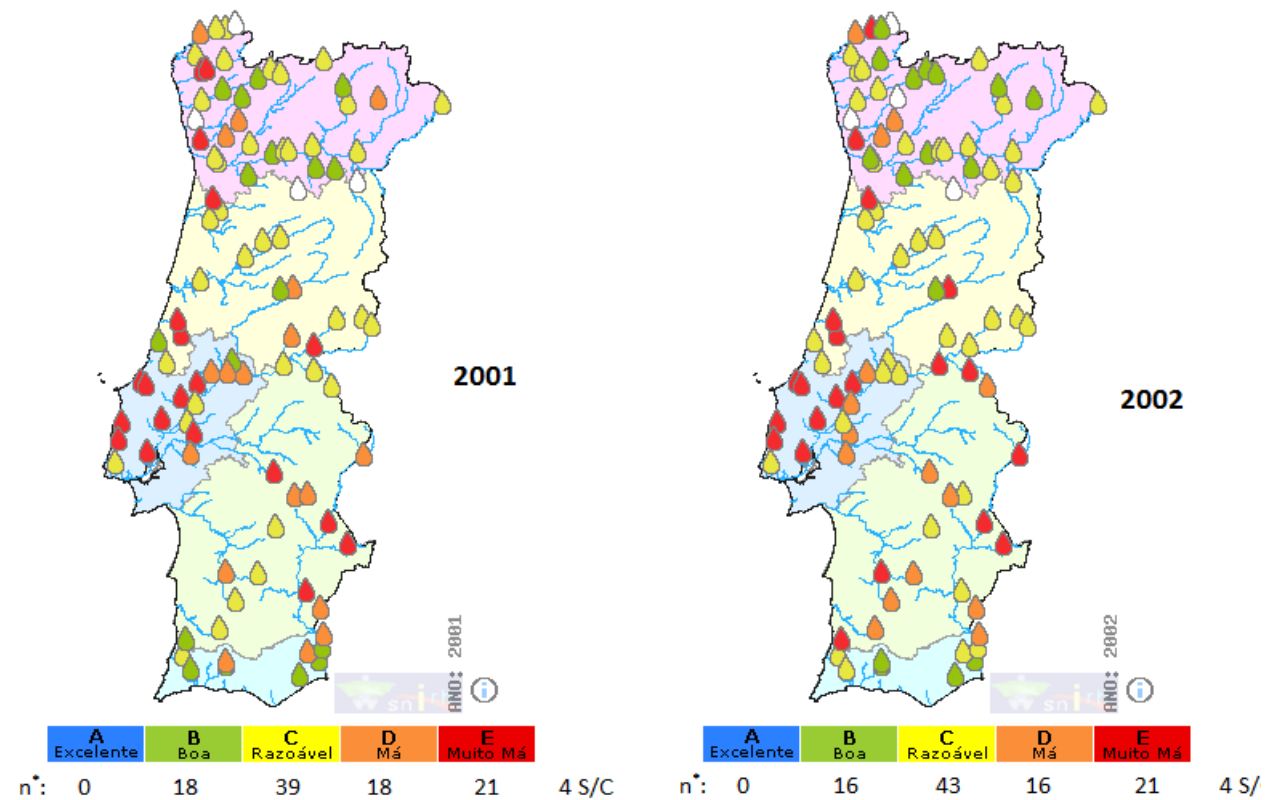


Figura 4.11. Clasificación de la calidad del agua en Portugal en 2001 y 2002 (n*: número de estaciones por clase) (SNIRH, Portugal: <http://snirh.apambiente.pt>).

Entre las características de las 5 cuencas compartidas de los ríos Portugueses-Españoles, hay una gran desigualdad interanual de precipitaciones, que causan frecuentes episodios de flujos extremos en la trayectoria del agua (largas sequías y extraordinarias riadas e inundaciones); la media de precipitaciones en las cuencas de los ríos disminuye de Norte a Sur y hay un fuerte descenso de lluvias en verano, el cual acompaña la reducida escorrentía en los cursos de agua. El 70% de la precipitación media anual total de los ríos corresponde al semestre húmedo en ambos países; no hay coincidencia temporal entre la distribución de la demanda y la disponibilidad de los recursos (Tratado de la Albufera).

4.4.3. Determinación de la estrogenicidad mediante RYA en el PVA de la D. 2000/60/CE

La metodología establecida para aplicar el ensayo de levaduras recombinantes RYA, las curvas dosis-respuesta obtenidas para cada uno de los compuestos a determinar, los valores de EC₅₀ (concentración efectiva al 50%) y el factor de estrogenicidad relativa (E2 equiv) en el artículo que incluye el procedimiento integrado de análisis mediante LC-MS y la determinación de la estrogenicidad mediante RYA (Céspedes y col., 2004).

Los datos obtenidos del análisis de las 183 muestras analizadas en el PVA de Portugal, tanto las concentraciones individuales de los compuestos alquilfenólicos y el BPA obtenidos mediante LC-MS, como los valores de las actividades estrogénicas totales de las muestras calculadas mediante el RYA, se resumen respectivamente en las tablas 3 y 2 del artículo científico adjunto (Quirós y col., 2005). A modo de ejemplo, en la Figura 4.12. se representan las curvas de dosis respuesta en unidades relativas (R.U.) para 3 muestras de agua con diferente estrogenicidad: una fuertemente estrogénica (correspondiente a PNB, abril 2001), una débilmente estrogénica (PRP, diciembre 2002) y una no estrogénica (PM, octubre 2002). Los valores representados son medias (o valores promedio) de tres determinaciones independientes. Las barras verticales indican las desviaciones estándar:

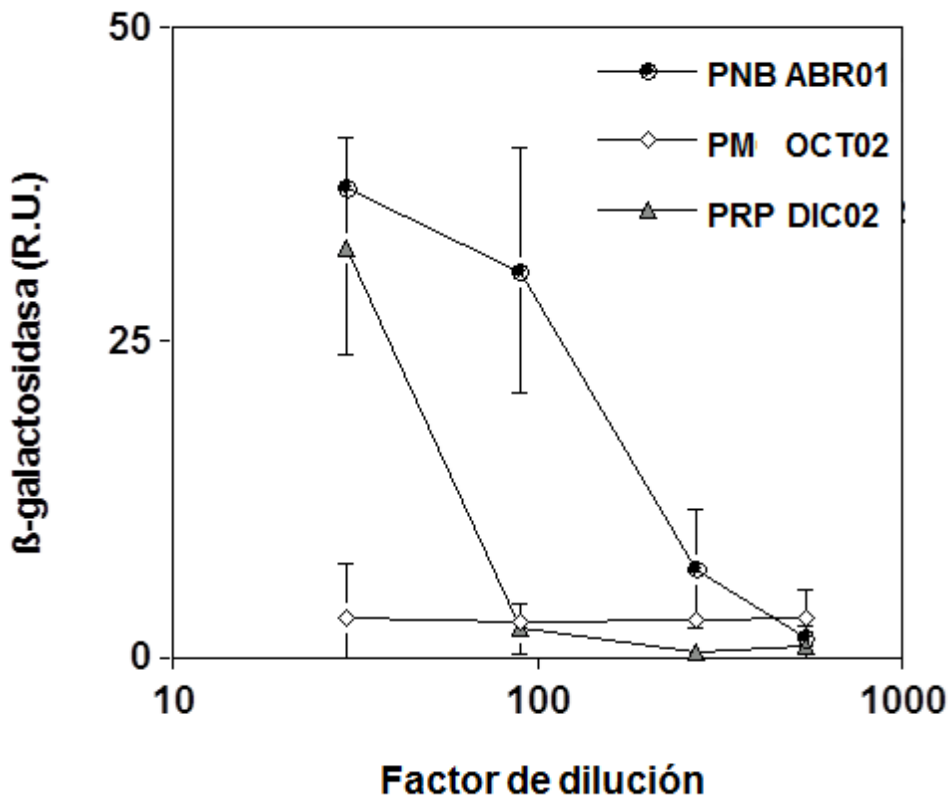


Figura.4.12. Curvas de dosis respuesta en unidades relativas (R.U.) para tres muestras de agua, correspondientes a PNB, abril 2001, PM, octubre 2002 y PRP, diciembre 2002.

En la figura 4.13. se presenta un esquema del grado de actividad estrogénica obtenida en cada muestra y a qué punto y mes de muestreo corresponde cada una de ellas:

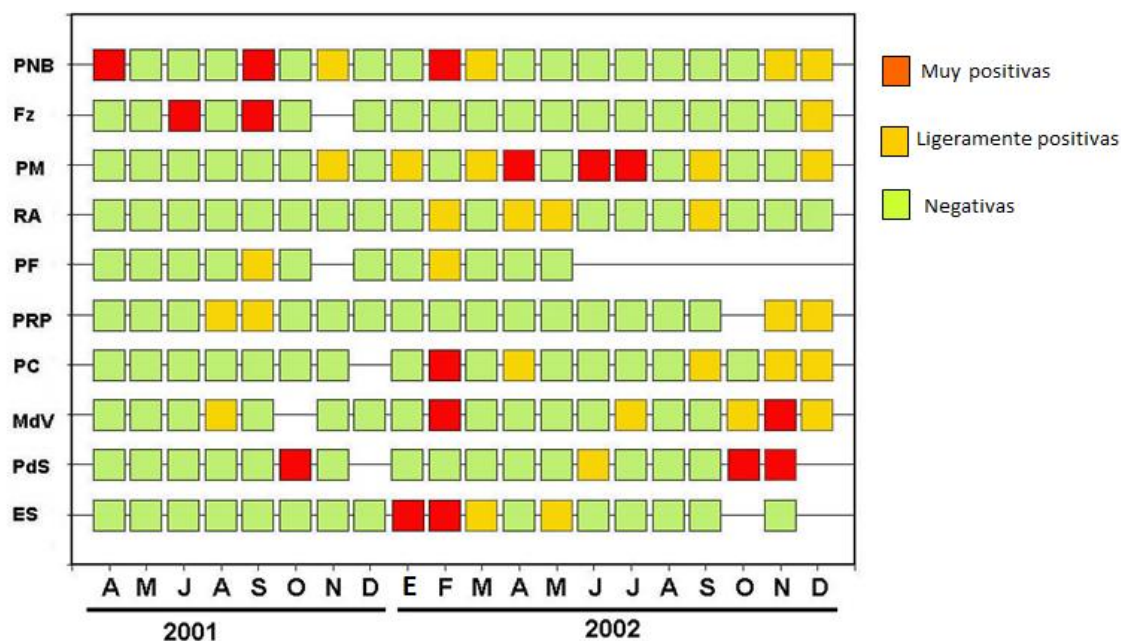


Figura 4.13. Actividades estrogénicas de todas las muestras de agua analizadas (Abril 2001-diciembre 2002).

El eje X o de abscisas representa las fechas de muestreo y el eje Y o de ordenadas indica los 10 puntos de toma de muestras. Cada cuadrado representa un punto de muestreo; los diferentes colores corresponden a diferentes grados de estrogénicidad: desde muestras no estrogénicas (verdes) hasta muestras muy estrogénicas (rojas), con valores superiores a 0.1 ng/L E2 eq. Los espacios en blanco indican que no se analizó la muestra en ese punto.

Tal y como puede verse en la figura 4.13., más del 90% de las muestras mostraron niveles de estrogénicidad bajos (inferiores a 0.1 ng/L equivalentes de estradiol o E2 eq) o no detectables (74%). El resto de muestras (el 9.3%) mostraron valores de estrogénicidad entre 0.1 y 1.7 ng/L E2 eq, de las cuales, solamente dos de ellas mostraron valores por encima de 1 ng/L E2 eq, correspondientes a Ponte Nova Barcelós Sept 2001 y Ponte do Sacavem Oct 2002, con valores de 1.711 ± 0.624 y 1.202 E2 eq respectivamente (ver Tabla 2 del artículo (Quirós y col., 2005) con los valores de estrogénicidad obtenidos para todas las muestras).

Distribuciones geográficas y temporales de las muestras estrogénicas: las figuras 4.14. y 4.15., muestran respectivamente el porcentaje de muestras dando una respuesta estrogénica (es decir, valores de β -galactosidasa superiores a 10 R.U.) a diluciones 1:30, 1:90 y 1:270 en cada punto de muestreo (figura 4.14) o para cada fecha de muestreo (temporal, figura 4.15).

Las muestras de Ponte Nova Barcelós, Formariz, Monte da Vinha, Ponte do Sacavem y Estero Seixal (figura 4.14) fueron más estrogénicas que el resto, con una respuesta estrogénica a la dilución 1:270 (incluso a 1:540). Ponte Nova Barcelós y Formariz están geográficamente cerca, en el norte de Portugal, así como Ponte do Sacavem y Estero Seixal, en la zona próxima a Lisboa. Ponte Moreira, Ría Aveiro, Ponte Formoselha, Ponte Riberiro de Pernes y Praia Coruche dieron respuesta estrogénica a bajas diluciones, y están distribuidas en algún punto entre medio. Monte da Vinha parece fuera de este patrón geográfico, pudiendo indicar influencias de aplicaciones agrícolas en la cuenca del río Guadiana en España. Por tanto:

- Los puntos de muestreo en los que se detectaron mayores actividades estrogénicas fueron en este orden: PdS > PNB > ES > Fz > MdV > PM > PdC > PRP.
- Ría Aveiro y Ponte Formosela son los dos únicos sitios geográficos en los que no se detectó actividad estrogénica superior a 0,1 ng/L E2 eq a lo largo del periodo muestreado.

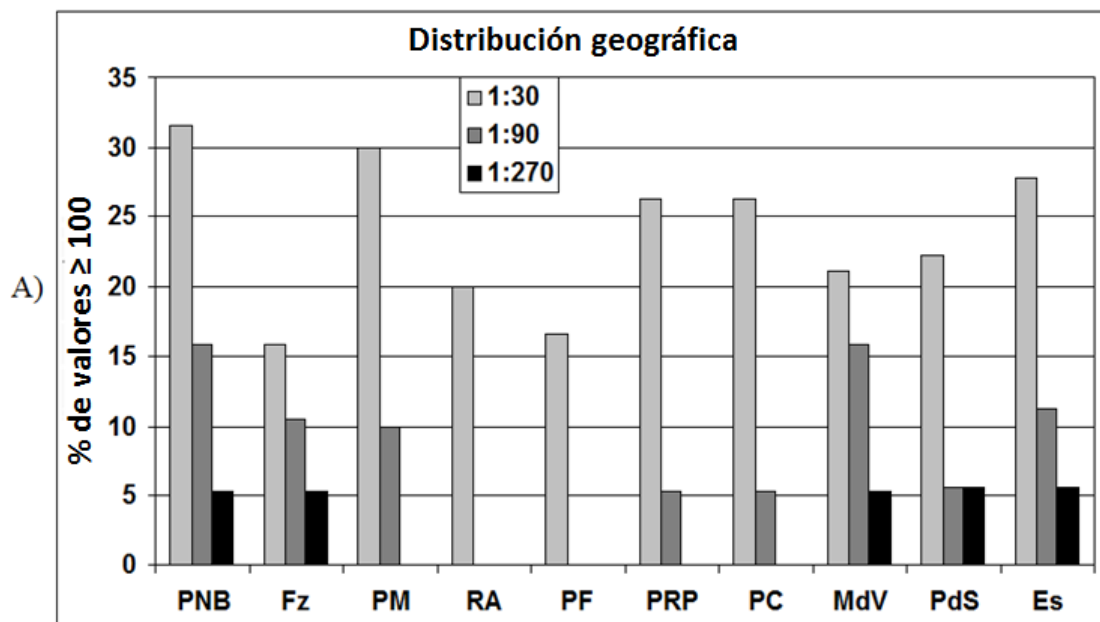


Figura 4.14. A) Porcentaje de muestras dando respuesta estrogénica positiva (es decir, por encima de 10 R.U.) para los distintos puntos de muestreo. Las barras de color gris, gris oscuro y negro indican las figuras obtenidas para las diluciones 1:30, 1:90 y 1:270 respectivamente.

En relación a la distribución temporal, la Figura 4.15. muestra la evolución de los la estrogénicidad relativa (nM) o E2 eq detectados mediante el ensayo de levaduras recombinantes (RYA) mensualmente en el periodo en el que se llevó a cabo el PVA (de abril 2001 a diciembre 2002).

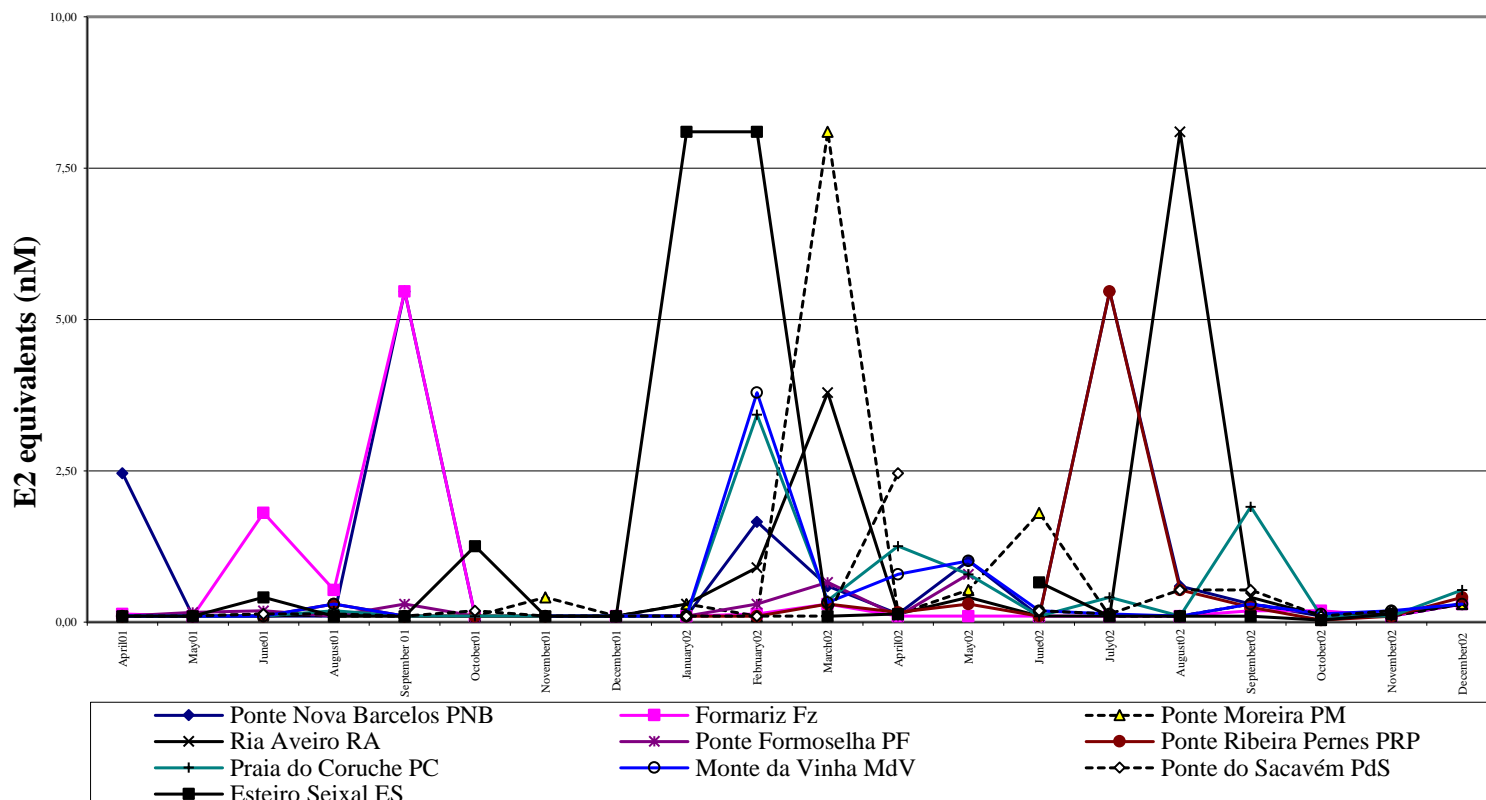


Figura 4.15. Equivalentes de β -estradiol (E2 eq) o estrogenicidad relativa (nM) detectados por RYA mensualmente para cada punto de muestreo durante el PVA realizado en Portugal.

Se observa que las muestras estrogénicas siguen un patrón sinusoidal, con tres picos correspondientes a Sept 2001, Feb-Abr 2002 y Oct-Nov-Dic 2002 respectivamente. Este patrón, aunque débil, es reconocible en la Figura 4.15., que muestra claramente la distribución aparentemente caótica de algunos picos de estrogenicidad (ej., abril 2001 en Ponte Nova Barcelos, Oct 2001 en Ponte do Sacavem, etc.). Probablemente hay un patrón que se produce 2 veces al año y otro patrón errático de las muestras estrogénicas que puede reflejar vertidos accidentales. Se observa una clara variación estacional en las concentraciones. Así, en Ponte Moreira, las concentraciones más altas fueron detectadas en verano (junio y agosto), probablemente debido a la disminución de precipitaciones en este periodo y por tanto menos dilución de aguas residuales en los ríos. Sin embargo, en otros puntos de muestreo se observó que la carga total de EDCs permaneció bastante estable entre abril y agosto en una tendencia opuesta (disminución de concentraciones de abril a agosto). Algunos estudios evidencian que la biodegradación de NPEOs es dependiente de la temperatura (Ying y col., 2006). Así, la eliminación y mineralización primaria de NPEOs disminuye a medida que la temperatura desciende.

4.4.4. Integración de análisis químico (LC-MS(MS)) y determinación de la estrogénicidad (RYA)

El procedimiento integrado de análisis mediante LC-MS para la identificación y cuantificación de los EDCs seleccionados (APs, APEOs, BPA, ftalatos y hormonas esteroideas) y la determinación de la estrogénicidad total de las muestras de agua mediante el ensayo de levaduras recombinante RYA, ha sido descrito previamente en el capítulo 2 (Céspedes y col., 2004). En la determinación de EDCs en sedimentos de los mismos puntos de muestreo realizado paralelamente al PVA en aguas en Portugal, únicamente se detectaron compuestos alquilfenólicos. En las figuras 4 y 5 del artículo (Céspedes y col., 2004) se representan las correlaciones obtenidas entre las aguas y los sedimentos, que fueron analizados en un estudio paralelo (Petrovic y col., 2003) llevado a cabo en el mismo proyecto.

Se ha obtenido una buena correlación entre las concentraciones obtenidas por LC-MS y los valores de estrogénicidad total de las muestras obtenidos por RYA (incluidas respectivamente en las tablas 3 y 2 del artículo adjunto (Quirós y col., 2005). Así, las respuestas estrogénicas más grandes obtenidas están en concordancia con las altas concentraciones de contaminantes. Sin embargo, en algunas muestras el ensayo RYA indica actividad estrogénica que no se justifica con los datos químicos. Esta discrepancia resulta seguramente de una combinación de diversos factores: Primero, la presencia de algunos compuestos débilmente estrogénicos puede tener un efecto sinérgico (Graumann y col., 1999; Berset y col., 2001), dando una respuesta mucho más elevada que aquellas predichas por la suma de componentes individuales (Silva y col., 2002). Adicionalmente, el análisis químico mediante LC-MS solo identifica y cuantifica los compuestos seleccionados que pueden presentar estrogénicidad en una muestra. Por tanto, es posible que las muestras contengan otro/s compuesto/s no caracterizado/s pero que puedan dar una respuesta estrogénica, como los fitoestrógenos (Berset y col., 2001), detectados en la mayoría de estudios realizados en Portugal posteriormente, en algunos casos a niveles altos (ver tabla 4.2). Estos compuestos no han sido incluidos en el PVA llevado a cabo en esta tesis, puesto que no fueron el objetivo de este trabajo, pero podrían ser responsables de la estrogénicidad observada. En los casos en los que se ha detectado la presencia de estrógenos mediante LC-MS/MS (E1 en Ponte Nova Barcelós y Estero Seixal), la correlación entre los datos obtenidos por RYA y el análisis químico ha mejorado, ya que la alta estrogénicidad de ese punto no podía ser justificada por los niveles de compuestos alquilfenólicos detectados mediante LC-MS, pero sí por los niveles de estrógenos detectados mediante LC-MS/MS.

Por tanto, en los puntos en los que ha sido detectada alta estrogénicidad, encontramos varios casos:

- (i) Si $EEQ (RYA) = Conc. (LC-MS)$: los puntos correlacionan con los niveles de compuestos alquilfenólicos, responsables de la estrogénicidad encontrada en la muestra.
- (ii) Si $EEQ (RYA) > Conc. (LC-MS)$: cuando la estrogénicidad detectada es mayor, puede ser debida a otros compuestos no determinados mediante LC-MS, como es el caso de los fitoestrógenos, detectados frecuentemente en los estudios posteriores realizados en Portugal (Rocha y col., 2013). También podrían deberse a pesticidas estrogénicos, detectados en el anterior monitoring llevado a cabo en Portugal

(Lacorte y col., 1999; Céspedes, Máster, 2001). En algún caso se confirmó posteriormente la presencia de estrógenos mediante LC-MS/MS.

- (iii) Si $EEQ(RYA) < Conc. (LC-MS)$: finalmente, si la estrogenicidad observada es inferior a las concentraciones determinadas por técnicas analíticas, podría haberse producido una inhibición (RYA) o un efecto antiestrogénico.

4.5. CONCLUSIONES -----

A continuación, se describen las principales conclusiones extraídas del **análisis de las muestras y del estudio quimiométrico** de los datos de los PVA en Portugal. En el capítulo 6 se incluyen las conclusiones finales del estudio:

PVA para la determinación de plaguicidas y el cumplimiento de la Directiva 76/464/CE:

Las principales conclusiones obtenidas en el estudio quimiométrico realizado en el mismo grupo de investigación, con los datos generados en el estudio llevado a cabo previamente a esta tesis (Céspedes, Máster, 2001), en el que se analizaron plaguicidas SVOCs en 644 muestras de agua correspondientes a 46 puntos de muestreo en Portugal, fueron:

- 1) La aplicación del PCA a los datos de los 19 SVOCs seleccionados en el PVA (Tauler y col., 2001) permitieron:
 - Identificar las principales fuentes de contaminación ambiental de forma más global, rápida y exhaustiva
 - Establecer las principales correlaciones entre contaminantes
 - Establecer las distribuciones geográficas y temporales: se detectaron plaguicidas a
 - Niveles más elevados en primavera y principios de verano en la zona agrícola del centro de Portugal y de abril a sept. en la zona industrial al norte cercana a Porto,
 - Niveles inferiores en agosto, debido al descenso de las actividades industriales y agrícolas
- 2) La aplicación y comparación de varios métodos quimiométricos de análisis de datos en 2 modos o direcciones (PCA y MCR-ALS) y en 3 modos o direcciones (PARAFAC y TUCKER-3) a los 19 SVOCs seleccionados en aguas superficiales de Portugal correspondientes al PVA completo, han permitido obtener con mayor fiabilidad:
 - Identificación e interpretar las principales fuentes de contaminación (*loadings*) de SVOCs) en aguas superficiales de Portugal,
 - la resolución y modelización de las distribuciones geográficas y temporales (*scores*) de estas fuentes de contaminación y distinguir entre puntos de emisión y principales fuentes de contaminación difusa
 - Identificación los diferentes orígenes de las fuentes de contaminación (agrícola (Ponte do Sacavem), industrial en el norte de Portugal Ponte Moreira), agrícolas e industriales)
 - Establecer las distribuciones temporales, con picos de contaminación en primavera e inicio del verano.
 - Una mayor fiabilidad en los resultados obtenidos mediante comparación de

PVA para la determinación de EDCs para el cumplimiento de la Directiva 2000/60/CE:

Las principales conclusiones extraídas de la determinación de EDCs mediante LC-MS y la estrogénicidad mediante RYA en el PVA para el **cumplimiento de la D. 2000/60/CE** fueron:

- ✓ Los compuestos más ubicuos fueron los alquilfenólicos (NPE₁O, NPE₂O y NP) y el DEHP, seguidos del BPA, detectados en el 97%, 89%, 81%, 89% y 72% de las muestras respectivamente.
- ✓ Se detectaron los niveles de EDCs más elevados en compuestos alquilfenólicos. Los rangos de concentraciones en aguas determinados mediante LC-MS fueron: 0.01-25.53 µg/L NP, 0.07-30.23 µg/L OP, 0.20-27.75 µg/L NPE₁O y 0.06-12.64 µg/L NPE₂ O.
- ✓ Se confirmó la presencia puntual de estrógenos en aguas mediante la técnica LC-MS/MS de mayor sensibilidad. Se detectó E1 en PdS y ES a concentraciones de 0.8 – 10.2 ng/L.
- ✓ Se identificaron los hot spots o puntos que registraron mayores concentraciones cerca de grandes núcleos urbanos (Oporto y Lisboa), generalmente en zonas industriales (Ponte Moreira), pero también en zonas con actividad agrícola (Ponte de Sacavém), y con actividad industrial y agrícola respectivamente (hasta 12.97 y 25.53 µg/L de NP, 12.34 y 30.23 µg/L de OP y 27.75 y 18.92 µg/L de NP₁₋₂EO), seguidos de Formariz y Ría Aveiro.
- ✓ De los valores incluidos en la Directiva 2008/105/EC de contaminantes prioritarios para aguas superficiales, el NP sobrepasó el valor de NCA-MAC=2 µg/L en 20 muestras de las 186 analizadas (10 en PdS, 8 en PM, y 2 en RA). Respecto a los valores medios obtenidos para cada punto de muestreo, el NP excedió el valor de NCA-MA= 0.3 µg/L en 3 puntos de 10 (PM, PdS y RA), mientras que OP excedió el valor de de NCA-MA= 0.1 µg/L en 7 de los 10 puntos. Por tanto, varias muestras incumplirían actualmente la Directiva 2008/105/EC.
- ✓ En algunos puntos de muestreo se observa una clara variación estacional de concentraciones. Así, en PM, las concentraciones más altas fueron detectadas en verano (junio y agosto), probablemente debido a la disminución de precipitaciones y por tanto menor dilución de aguas residuales en los ríos.
- ✓ El bioensayo con levaduras recombinantes (RYA) llevado a cabo con los extractos, ha permitido determinar la estrogénicidad total de la muestra, detectando tanto los estrógenos naturales como los xenoestrógenos, haciendo por tanto medidas cuantitativas de la actividad estrogénica sin tener en cuenta la identidad de los compuestos químicos responsables.
- ✓ La actividad estrogénica detectada en aguas de Portugal mediante el RYA ha sido atribuida principalmente a los compuestos nonilfenólicos, más ubicuos. Sin embargo, en los puntos en los que se han detectado estrógenos, éstos compuestos tienen mayor contribución en la estrogénicidad total de la muestra.
- ✓ El 90% de las muestras mostraron niveles bajos de estrogénicidad (inferiores a 0.1 ng/L E2 eq). Del resto de muestras (9.3%), solamente 2 (correspondientes a Ponte Nova Barcelós Sept 2001 y Ponte do Sacavem Oct 2002) mostraron elevada estrogénicidad, con valores superiores a 1 ng/L E2.
- ✓ La aplicación de la metodología integrada química-biológica desarrollada (LC-MS(MS) vs RYA, ha establecido en general buenas correlaciones entre composición química y actividad estrogénica para las muestras de aguas superficiales.

- ✓ En general se observó una buena correlación entre las concentraciones obtenidas mediante LC-MS y los valores de EEQ (ng/L) obtenidos mediante RYA.
 - (i) Cuando EEQ (RYA) = Conc. (LC-MS): APs y APEOs son los principales responsables de la estrogenicidad obtenida.
 - (ii) Cuando EEQ (RYA) > Conc. (LC-MS): la estrogenicidad puede ser debida a otros compuestos no determinados mediante LC-MS, como es el caso de ciertos pesticidas o los fitoestrógenos, detectados frecuentemente en los estudios posteriores realizados en Portugal (Rocha y col., 2013). En algún caso se confirmó posteriormente la presencia de estrógenos (E1) mediante LC-MS/MS.
 - (iii) Cuando EEQ (RYA) < Conc. (LC-MS): puede haberse producido una inhibición (RYA) o un efecto antiestrogénico.

- ✓ De la evolución de los niveles de EDCs en los ríos portugueses desde el PVA llevado a cabo en 2001 y teniendo en cuenta la bibliografía consultada hasta la actualidad (2018), se concluye que:
 - *Compuestos alquilfenólicos*: se observa una disminución en los niveles de APs y APEOs en el medio ambiente acuático en los últimos años en Portugal, tal y como sucede en España y otros países europeos. Así, los niveles de NP y OP detectados en el PVA llevado a cabo en Portugal (25-30 µg/L en 2001), han disminuido en estudios posteriores, registrando 0.25-0.55 µg/L en 2010-2012 (ver evolución en tabla 4.2.), debido a las restricciones normativas como la Decisión 2003/56/EC que prohíbe su uso en detergentes domésticos y la restricción o disminución en usos industriales y por tanto a la disminución en el uso y vertido de estos compuestos en el medio acuático, y en algunos casos al incremento de depuradoras y a los tratamientos más avanzados en las EDARs.
 - *Estrógenos*: se ha detectado estrona, puntualmente y a bajas concentraciones (0.8 – 10.2 ng/L), con niveles similares a los detectados en ríos de Europa; en 2015, se han incluido varios estrógenos en la lista de observación de la Decisión (UE) 2015/495 y en la CCL4 de la EPA (E1, E2, E3 y EE2).

Las principales conclusiones del **análisis quimiométrico** realizado con los datos obtenidos en el **PVA para el cumplimiento de la Directiva 2000/60/CE** para los EDCs APs, BPA y NP₁₋₂EO (descrito en el ANEXO 4) son:

- ✓ Existe una distribución muy asimétrica de la concentración de los EDCs analizadosen ríos de Portugal.
- ✓ Los compuestos alquilfenólicos tienen concentraciones superiores y existe una elevada correlación entre ellos (NP₁EO con NP₂EO, y ambos con su producto de degradación, el NP).
- ✓ Se han establecido los *hot spots* en las zonas próximas a los núcleos urbanos de Porto y Lisboa (en Ponte Moreiray en Ponte do Sscavem).
- ✓ La aplicación de 2 modelos de PCA ha permitido identificar el origen de la contaminación generalizada en Portugal

CAPÍTULO 5

PROGRAMA DE VIGILANCIA AMBIENTAL

EN LAS CUENCAS DE LOS RÍOS

LLOBREGAT Y TER



Antoni Ginebreda

Esta ilustración ha sido publicada en el libro "El Delta de l Ebre. Apunts de camp" (2001).
Su reproducción en esta tesis ha sido autorizada por el autor, Antoni Ginebreda

5.1. INTRODUCCIÓN

Características de los ríos Mediterráneos

Los recursos de agua están afectados directa e indirectamente por actividades antropogénicas (ej: cambios en el uso de los suelos) 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 Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático (IPCC) predice, que el Mediterráneo será particularmente sensible al cambio climático y que se producirá un descenso de las precipitaciones anuales y un incremento de las temperaturas medias, con una mayor frecuencia de eventos extremos (Falloon y col., 2010), significando que los recursos de agua serán no solo menos abundantes, sino también menos disponibles.

La cuenca mediterránea es una de las regiones más vulnerables al cambio global debido a las condiciones climáticas caracterizadas por frecuentes sequías y otras presiones en recursos de agua. Los ríos de la vertiente mediterránea están caracterizados por fluctuaciones importantes en los caudales y fuertes presiones de contaminación por las amplias actividades urbanas, industriales y agrícolas (Petrovic y col., 2011; Gorga y col., 2011). Esto se traduce en niveles de contaminación altos más frecuentemente que otros ríos en otras cuencas europeas (Petrovic y col., 2011). La gran variabilidad de los caudales a la que están sometidos estos ríos de manera natural, supone la temporalidad de muchos de sus cauces. Además, son numerosas las alteraciones que padecen: vertidos, regulación de caudales, alteración del bosque de ribera, movimiento de áridos, etc (Prat, 1993). La característica más distintiva del clima mediterráneo es su estacionalidad, caracterizada por veranos secos. Los ríos están sujetos a eventos estacionales secuenciales mostrando un régimen de caudal con alta variación (estaciones seca y húmeda), con eventos extremos como súbitas riadas y sequías severas.

Los ríos Ter y Llobregat son las principales fuentes de agua potable de la región metropolitana de Barcelona, que tiene una población de 4,4 millones de personas. Por tanto, es relevante el control de la calidad de sus aguas. Cinco embalses, tres de ellos en la cuenca del Llobregat y dos en la del Ter, satisfacen las necesidades del área de Barcelona, de manera que la gestión de los embalses depende fuertemente de las necesidades de ésta. Durante períodos secos, típico del área Mediterránea, los niveles de las reservas pueden bajar hasta niveles alarmantes, como sucedió en la fuerte sequía sufrida en el 2008.

La fuente de distribución del Llobregat, abarca el 40% del total de la distribución de agua potable en el área metropolitana, siendo la más importante en la zona sur de Barcelona. Procede de la mezcla de aguas tratadas en las estaciones de tratamiento de agua potable (ETAPs) de Abrera (10%) y Sant Joan Despí (30%), esta última asistida cuando es necesario por pozos que explotan el acuífero del río Llobregat. La explotación del río Ter, situada al norte del área metropolitana, constituye otra fuente de distribución (60% del total). El Ter también tiene un régimen y comportamiento muy irregular, pero con unas características muy diferentes, ya que proviene directamente de grandes embalses que regulan su caudal y sobre todo porque no atraviesa zonas de elevada mineralización con lo cual los parámetros de calidad organolépticos son mejores. El tercer origen corresponde al agua que proviene de la planta de tratamiento de Abrera, la cual suministra principalmente a las poblaciones situadas en su entorno como son Abrera, Martorell y Rubí (Díaz, Tesis, 2003).

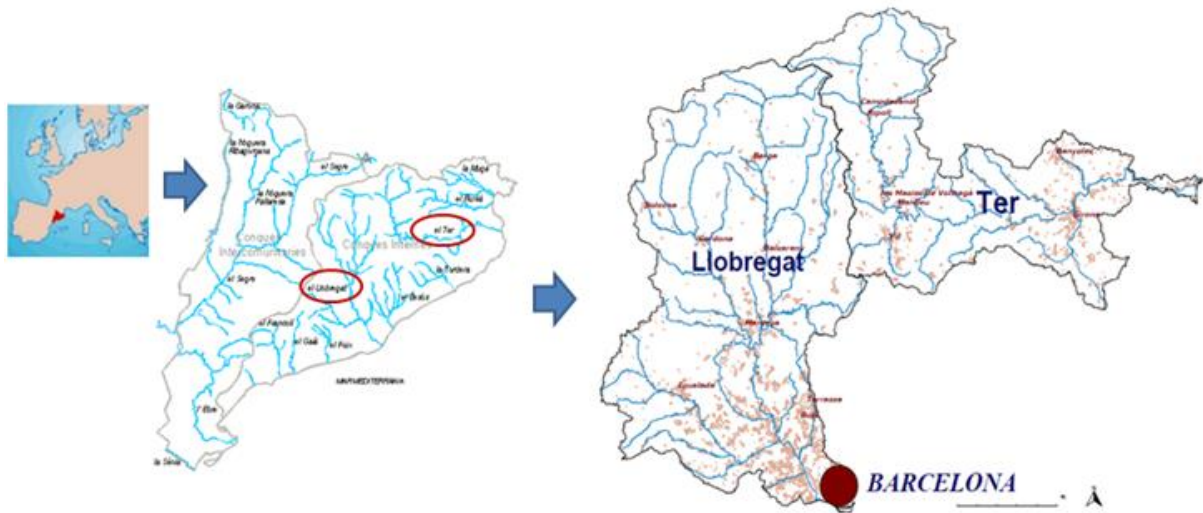


Figura 5.1. Mapa de Cataluña con las cuencas de los ríos estudiados en el PVA: Ter y Llobregat

5.1.1. DESCRIPCIÓN DE LA CUENCA DEL RÍO LLOBREGAT Y PUNTOS DE MUESTREO

La cuenca hidrográfica del Llobregat se encuentra situada en el Noroeste de la Península Ibérica, ubicada en la región de Cataluña y constituye el eje central de la provincia de Barcelona, exceptuando la cabecera del río Cardener que se encuentra en la provincia de Lérida.

El río Llobregat forma parte de la red fluvial pirenaica-mediterránea y la extensión de su cuenca es la más grande (4948 km²) con una longitud de 156 km localizada en su totalidad en Cataluña. Su nacimiento se encuentra en el extremo Norte de la provincia de Barcelona, en las Fuentes del Llobregat, en el municipio de Castellar de N´Hug (en la comarca del Berguedà) a 1295 m de altitud en la sierra del Cadí. En su curso, el Llobregat va recibiendo aguas de diversas rieras y ríos que van aumentando progresivamente su caudal. Así, en la Pobla de Lillet recibe las aguas del río Arija y en la Guardiola de Berguedà las del Bastareny, que baja de la Sierra del Cadí. En su camino hacia el sur, el agua del río alimenta el embalse de La Baells. Ya dentro de la comarca del Bages, cerca de Balsareny nace La Sèquia que fue construida para llevar el agua del Llobregat a la ciudad de Manresa. Atraviesa la cordillera Costera Catalana, alternándose el aprovechamiento industrial (en los desfiladeros) con el agrícola (en las llanuras). En esa zona se encuentran numerosas localidades agrícolas. En Castellgalí el Llobregat recibe las aguas de su afluente principal, el Cardener, que hace aumentar notablemente su caudal. Ya fuera de la comarca del Bages, el río llega a Martorell, en el Bajo Llobregat, donde recibe las aguas de otro afluente importante, el río Anoia. Finalmente, el río forma un delta pantanoso de una extensión de 97 km² al final y desemboca en el río Mediterráneo, en el término municipal del Prat de Llobregat (Baix Llobregat), al Sur de Barcelona (Rosas, Tesis, 2001).

El régimen hídrico del río Llobregat es muy irregular, de tipo Mediterráneo: caudales bajos en condiciones normales con eventos extremos de inundaciones, siendo el rango de caudal de agua extremadamente amplio, pasando de la sequedad absoluta hasta 2000 m³/S. El caudal durante el año 2004 pasó de 0,5 a 30 m³/s en el último tramo del curso fluvial. Adicionalmente, los caudales que forman su régimen hidrológico presentan una alta variabilidad estacional, como es característico de los ríos

mediterráneos, por su dependencia de las lluvias y el deshielo de los Pirineos. La media de precipitación anual en la cuenca del río Llobregat es 3330 Hm³ y tiene una descarga media anual de 693 Hm³.

En la Figura 5.2. se muestran los valores medios de los caudales del Río Llobregat obtenidos mensualmente en la ETAP De Sant Joan Despí durante el periodo 2000-2008, mostrando picos de 100 m³/s, con valores mínimos de 1 m³/s (www.gencat.cat/aca).

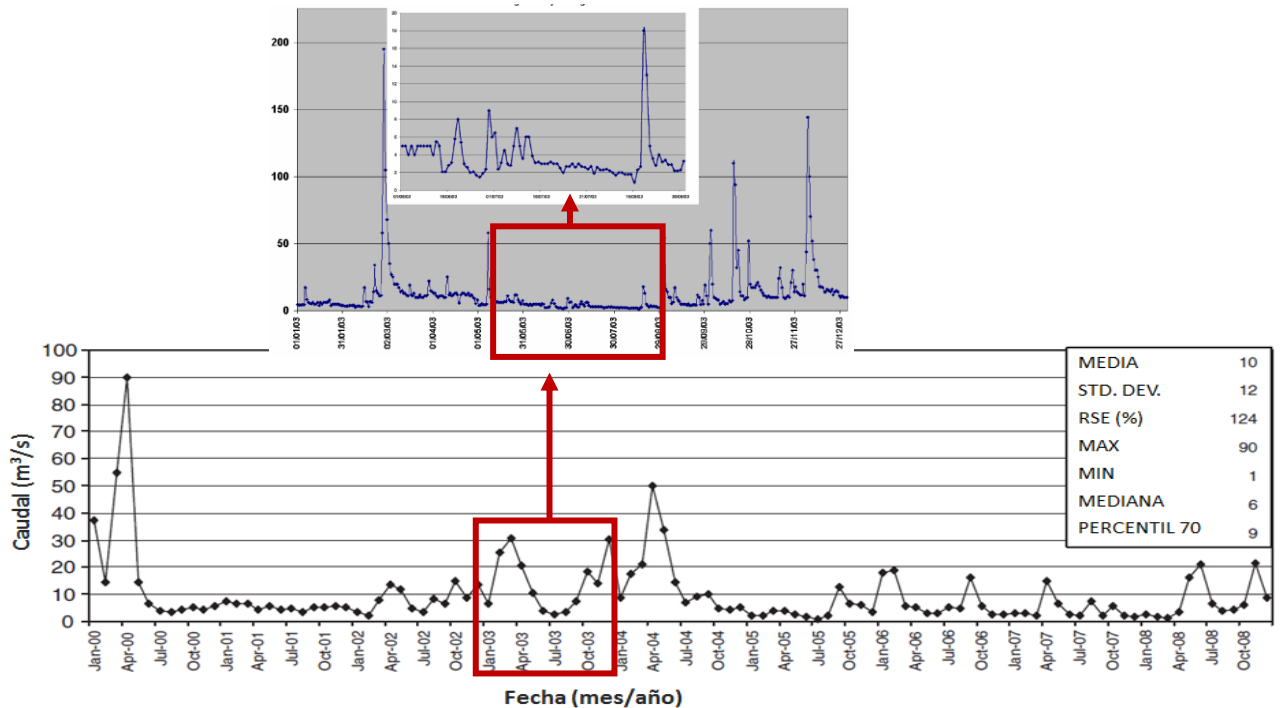


Figura 5.2. Caudal mensual (gráfico inferior) del río Llobregat en Sant Joan Despí, Barcelona, durante el periodo 2000-2008, y perfil anual del caudal correspondiente al 2003 (Fuente: [Martín y col., 2010](#), [Aguas de Barcelona](#)).

En la Figura 5.2. se observa claramente la irregularidad de caudal del Llobregat, característico de los ríos mediterráneos. En el gráfico superior se representa con mayor detalle el caudal (m³/s) del río Llobregat durante la anualidad 2003, con variación del caudal medido cada 8h, por lo que se aprecia muy claramente la irregularidad o gran variación del caudal anual del río, y ampliado, pueden verse los picos que se obtienen en el periodo estival de junio a septiembre de 2003. De acuerdo con el régimen pluviométrico, el caudal presenta dos máximos anuales, en primavera (mayo) y otoño. En algunos puntos, especialmente en periodos de sequía, los afluentes pueden constituir un alto porcentaje del caudal total del río, casi el 100% en algunos segmentos del río.

Una disminución en el caudal puede tener un efecto directo en el factor de dilución, produciendo un incremento en la concentración de contaminantes y por tanto al correspondiente aumento de riesgo para los ecosistemas acuáticos. Sin embargo, las riadas pueden promover resuspensión y transporte de sedimentos, y por tanto removilización de los contaminantes retenidos en los sedimentos. La resuspensión probablemente afecta a los contaminantes hidrofóbicos adsorbidos en los sedimentos, mientras que la dilución directa mediante flujo es de gran relevancia para los contaminantes más solubles, como por ej., aquellos liberados de las EDARs ([Petrovic y col., 2011](#)).

En la Figura 5.3. se representa la cuenca del río Llobregat estudiada en el Programa de Vigilancia Ambiental, con sus principales elementos representados:

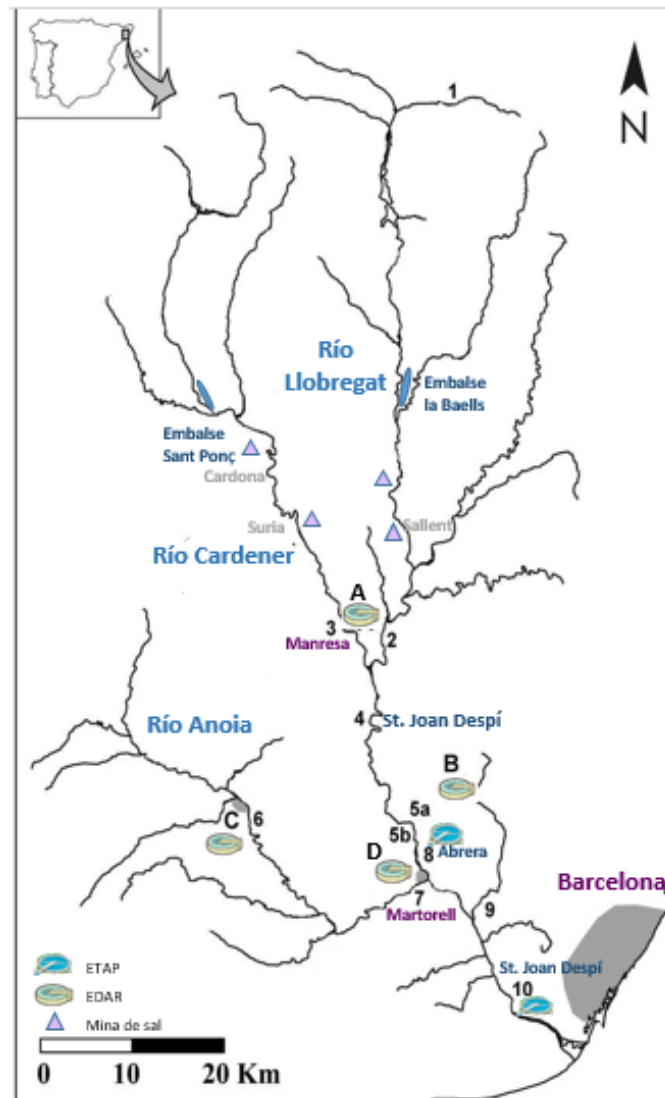


Figura 5.3. Cuenca del río Llobregat con los ríos estudiados y la ubicación de los puntos de muestreo analizados en el Programa de Vigilancia Ambiental, y la ubicación de los embalses, minas de sal y plantas potabilizadoras.

En la Figura 5.3. se indican los puntos de muestreo del Programa de Vigilancia ambiental (los 10 puntos de agua superficial (números del 1 al 10), las 4 EDARs (letras A-D correspondientes a las EDARs de Manresa, Terrasa, Igualada y Martorell). También se indica las minas de sal del Llobregat y las dos plantas potabilizadoras, Abrera y Sant Joan Despí, así como las poblaciones de Manresa, Martorell y Barcelona.

El Embalse de la Baells tiene una capacidad de 115 millones de m³. En Sallent, una de las zonas básicas de la cuenca potásica, la topografía se acentúa y el Llobregat se estrecha momentáneamente. En Sant Joan Despí hay una planta potabilizadora con un complejo tratamiento del agua del río Llobregat, que incorpora una etapa de ósmosis inversa desde 2009, que asegura que la calidad del agua obtenida satisface la legislación de agua potable (RD. 140/2003). Respecto al agua de consumo, las dos captaciones más importantes se encuentran situadas en los municipios de Abrera y Sant Joan Despí. A lo largo de la cuenca del río, el agua es succionada, utilizada y reintroducida en el río varias veces.

El río Llobregat a lo largo de su recorrido cruza zonas muy industrializadas y con una elevada densidad de población en el último tramo del curso fluvial. Además atraviesa explotaciones mineras salinas que se encuentran en el tramo medio-alto de su curso (Cardona, Súria, Sallent y Balsareny), lo que produce una elevada mineralización y confiere al agua de distribución de este origen unas propiedades organolépticas complejas (Díaz, Tesis, 2009), afectando a la calidad del agua. La construcción del colector de salmorras del Río Llobregat permitió el descenso en la salinidad del río, minimizando el problema de polución. En la Figura 5.3. se muestran las ubicaciones de las ETAPs y de las minas de sal en la cuenca del río.

El río Llobregat se caracteriza por sufrir estrés hídrico: Las características especiales de su cuenca (alta demografía, extracciones de sal, actividades industriales y su régimen hidráulico) hacen que el agua haya estado sometida a muchos problemas de contaminación, especialmente antes de la implementación del Plan de Saneamiento de Cataluña, cuando las aguas eran deficientemente depuradas. Las posibles fuentes de contaminación industrial son diversas (actividades textiles, galvánicas, papeleras, detergentes, farmacéuticas, químicas, etc), lo cual hace que el agua, por efectos de los vertidos, pueda estar sometida a grandes variaciones de su calidad, además de la alta variabilidad estacional que presenta el río. Adicionalmente este río está afectado por varias infraestructuras, como el aeropuerto de Barcelona, el puerto (donde fluye en el mar) y muchas carreteras. Como resultado, su caudal ha sido a menudo modificado. El río Llobregat y sus afluentes son intensamente aprovechados ya desde su nacimiento, tanto para usos industriales, como para riego o para el abastecimiento a poblaciones. A principios del año 2001, el río Llobregat recibía la descarga de 22 depuradoras de aguas residuales domésticas a lo largo de su cuenca y en 2015 recibía de más de 55 depuradoras. Sus principales afluentes son los ríos Cardener y el Anoia. A continuación se describen las principales características de sus cuencas:

Descripción de las cuencas de los ríos Cardener y Anoia:

El río Cardener, principal afluente del Llobregat, ocupa una superficie de 1373 km² (Atlas de Catalunya, 1993). Desde su origen hasta su confluencia con el Llobregat, el recorrido total del río es de 87 km. Su nacimiento se sitúa en el interior de la franja montañosa que constituye la Cordillera Prepirenaica, se encuentra en el extremo Este de la comarca del Alt Berguedà, entre el Alt Urgell y el Solsonès. Las fuentes afloran a unos 1050 m de altitud en el valle formado por las Sierras de Port del Comte (2332 m) y del Verd (2271m) en el término municipal de la Coma i la Pedra (1004 m), situada en la provincia de Lérida. El río Cardener presenta una fuerte pendiente, pasando de unos 1700 m de altitud en su cabecera hasta 200 m aproximadamente, en la confluencia con el río Llobregat. Al llegar a Manresa (238m), el río Cardener recibe el aporte de las aguas residuales tratadas de esta ciudad, de caudal significativo procedente del río Llobregat. En el año 2001 el río Cardener disponía en su cuenca de cinco EDARs de aguas residuales domésticas.

El río Anoia forma parte de la red hidrográfica del Llobregat y está situado en la parte Nor-Oriental de la península Ibérica. La fusión de diversas rieras y torrentes situados entre las cuencas del Llobregat y el Segre entre 600 y 800 m de altitud, forman el río Anoia, que nace en la Depresión Central Catalana, atraviesa la Cordillera Prelitoral y, en la Depresión Prelitoral desemboca en el Llobregat. El río sigue desde su nacimiento una orientación Noroeste-Sudeste hasta Sant Sadurn de Anoia, donde sufre una inflexión y prosigue en dirección Sudoeste-Noreste, perpendicular al río Llobregat, hasta su desembocadura en Martorell. La cuenca hidrográfica del río Anoia tiene una superficie de 930 km² (Atlas de Catalunya, 1993), con un recorrido de unos 65 km. El río pasa de unos 700m de altitud en la cabecera hasta los 56 m en Martorell, en su confluencia con el río Llobregat (Gallart, 1991). A unos 12 km de iniciar su recorrido, el Anoia

aumenta su caudal por su margen izquierdo. A 284 m de altitud, llega a Igualada, capital de la Comarca del Anoia. Posteriormente el río atraviesa la Cordillera Prelitoral. Poco antes de llegar a Sant Sadurn de Anoia (162m) recibe su principal afluente. Finalmente llega a Martorell, donde vierte su caudal al río Llobregat. En el año 2001, existían ocho EDARs de aguas residuales domésticas a lo largo de la cuenca del Anoia.

Puntos de muestreo: A continuación, se describen los principales puntos de muestreo situados en la cuenca del río Llobregat:

- La Pobla de Lillet (J117): punto ubicado en el cauce del río Llobregat, aguas debajo de su nacimiento, primer punto de muestreo asignado en el PVA establecido.
- El Pont de Vilomara (J031): punto situado a 80 km del origen del río, a 200 m de altitud. En este punto el río ha sufrido la influencia de las minas de Balsareny-Sallent (con el consiguiente aumento de salinización) y los vertidos domésticos e industriales de Sallent, Navarcles (ambos con depuradora), Pont de Vilomara, Avinyò y Moià, municipios sin EDAR en el 2001.
- Manresa (J002): punto en el que el río Cardener recibe el aporte significativo de las aguas residuales procedentes del Llobregat, tratadas en Manresa.
- Castellbell i el Vilar (J023): punto ubicado a unos 98 km del origen del río, a 140 m de altitud. El primer aporte de la carga contaminante viene del río Cardener, y adicionalmente recibe los vertidos procedentes de granjas y residuos domésticos de dos municipios que vierten directamente al río sin depurar.
- Abrera (J084r): en esta localidad está situada la ETAP de Abrera.
- Vilanova del Camí (río Anoia) (J084): los vertidos que se producen antes de éste punto de muestreo son fundamentalmente de origen industrial, especialmente del curtido de pieles y textiles de Igualada. Por otra parte, también se vierten los efluentes domésticos de varios municipios (Igualada, Ódena y Vilanova del Camí). En este punto puede estudiarse el impacto que generan los vertidos de dichas industrias.
- Martorell (río Anoia) (J003): punto ubicado en la población de Martorell, a 65 km del nacimiento del río, a 56 m de altitud, poco antes de su confluencia con el río Llobregat. En esta zona el río ha recogido todos los vertidos producidos en curso, tanto de origen industrial (entre los cuales cabe destacar los de textil, curtido de pieles, papeleras y agrícola), como doméstico (ya que se vierten sin depurar las aguas residuales domésticas de varios municipios). En este punto puede cuantificarse la influencia de las aguas del río Anoia a su receptor, el río Llobregat.
- Martorell (J074): las aguas del río Llobregat reciben los vertidos de distintos polígonos industriales y domésticos de diversos municipios antes de este punto de muestreo.
- El Papiol (J005): el río recibe vertidos de carácter doméstico e industrial de tipo textil, mecánico, químico y alimenticio de varios municipios, entre ellos el Papiol y Molins de Rei.
- La Riera de Rubí (J076): desemboca por el margen izquierdo del Llobregat aproximadamente a unos 3 km antes de Molins de Rei, pero debido a la elevada carga contaminante que lleva, es desviada y transportada mediante un canal (tubo del Gobernador) hasta la altura del término municipal de Sant Joan Despí, a pocos metros aguas abajo de la planta potabilizadora de Aguas de Barcelona.
- Sant Joan Despí (J049): punto de muestreo situado después del punto de la captación de aguas del río Llobregat de la ETAP para su tratamiento de potabilización para abastecer una parte del área de Barcelona, a unos 500m aguas abajo de la ETAP de Aguas de Barcelona, y a unos 200 m de la desembocadura del colector de salmueras, a unos 10m de altitud, y por tanto contiene la alta carga contaminante del vertido del tubo del Gobernador que proviene de la Riera de Rubí.

En la figura 5.4. se muestra el perfil longitudinal del principal curso del río Llobregat, resultado de los diferentes materiales que atraviesa y de la acción erosiva de sus aguas en el tiempo (Gallart, 1991), con la ubicación de los principales puntos a lo largo de su cuenca.

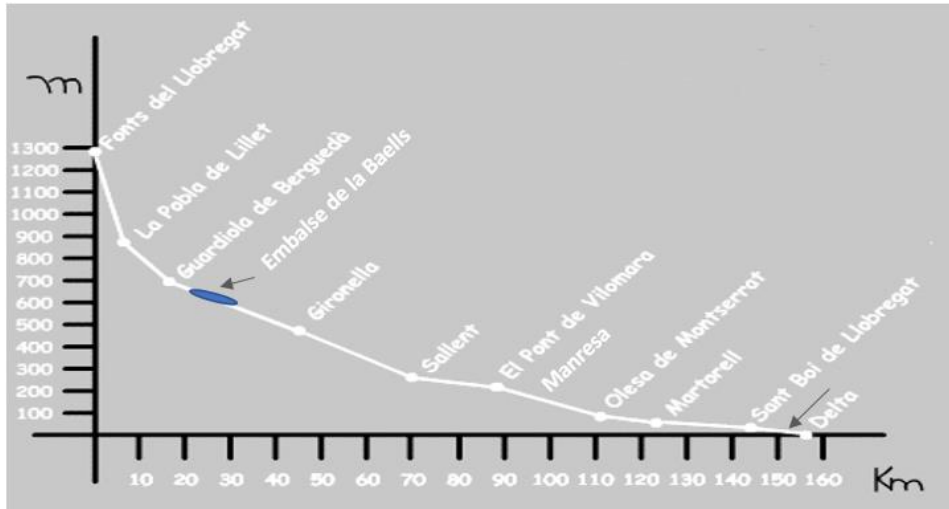


Figura 5.4. Perfil longitudinal de la cuenca del río Llobregat. Fuente: (Martín-Alonso y col., 2004)

Toma de muestras en la cuenca del río Llobregat: La toma de muestras fue realizada en marzo de 2001, siguiendo las indicaciones de las fichas descriptivas de los puntos de muestreo de la cuenca del río Llobregat, en las cuales puede verse el correspondiente código de la ACA, el municipio del punto de muestreo, la localización mediante coordenadas y un mapa, así como las indicaciones para acceder a cada punto y tomar la muestra correspondiente. A continuación, se incluye una ficha como ejemplo:


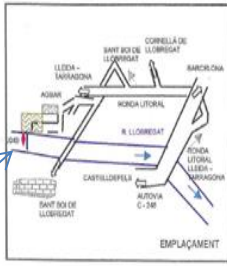
<p>Código punto de muestreo →</p> <p>Punto de muestreo y</p> <p>Coordenadas →</p>	<p>Codi punt de mostreig: J049</p> <p>Punt de mostreig - Municipi: riu Llobregat - Sant Joan Despí</p> <p>Objectiu de qualitat: C3</p> <p>Mapa comarcal de Catalunya, escala 1:50.000 (Baix Llobregat - 11)</p> <p>Coordenades UTM X: 420340 Y: 578442</p>   <p>Accés: Agafar La Ronda del Litoral en direcció Lleida-Tarragona. Just passat la sortida de Cornellà, agafar la sortida de St.Boi de Llobregat, i passada la Ronda per baix, hi ha un camí a la dreta que accedeix a la Planta Potabilitzadora d'Agbar. Seguir-lo, i en arribar a la porta d'accés, continuar el camí fins arribar al riu. Seguir el camí riu amunt, fins trobar la captació de la planta potabilitzadora. Es pren la mostra a la reixa de captació.</p>	<p>← Código objetivo de calidad</p> <p>← Mapa comarcal de la zona</p> <p>← Indicaciones de acceso al punto de</p>
---	--	---

Figura 5.5. Ficha descriptiva con los datos de los puntos de muestreo en el río Llobregat (fuente: ACA).

5.1.2. DESCRIPCIÓN DE LA CUENCA DEL RÍO TER Y PUNTOS DE MUESTREO

El río Ter, situado al norte del área metropolitana de Barcelona, es también de régimen y comportamiento muy irregular, pero con unas características muy diferentes al Llobregat, ya que proviene directamente de grandes embalses que regulan su caudal y sobretodo porque no atraviesa zonas de elevada mineralización:

El río Ter, nace en Ulldeter, en los Pirineos orientales, a 2.480 metros de altitud al pie de un circo glaciar en la comarca del Ripollés (Cataluña, España). Situado en el extremo nord-oriental de Cataluña, este río desemboca en el mar Mediterráneo, aguas abajo de Torroella de Montgrí, Estarlit, después de un recorrido de 208 km longitud. Tiene una superficie de cuenca de 3.010 km², y es junto con el río Llobregat, el río de más recorrido de la red hidrográfica Pirineo-Mediterránea, siendo los principales ríos que abastecen de agua a la ciudad de Barcelona. La cuenca del río Ter, con los 154 municipios que forman parte, tenía una población total de 419.954 habitantes en el año 2001 y una densidad media de 95 hab/km², cifra por debajo de la media catalana (199 hab/km²). Es decir, se trata de un territorio con baja densidad de población en su gran mayoría de términos municipales, y de unos pocos municipios que concentran buena parte de los habitantes que residen en la cuenca (Consortio Alba-Ter, 2004). Por tanto la distribución territorial de estos habitantes es muy desigual, y prueba de ello es que un 65% de la población se concentra en 19 municipios que están por encima de los 5.000 habitantes y un 4% en 67 municipios que no llegan a los 500 residentes. Los núcleos de población más importantes son Girona y Vic con el 18% y el 8% de la población total, respectivamente. El medio físico y biótico de la cuenca del Ter no determina la distribución territorial de la población, pero sí que la condiciona.

La cuenca del Ter se localiza en la frontera de dos dominios climáticos, el mediterráneo y el centroeuropeo, hecho que le confiere una diversidad climática más acusada, tomando características propias de un río de régimen de caudal pirenaico y mediterráneo. Pirenaico porque en el curso alto del Ter, en plenos Pirineos, obtiene los máximos en caudal de agua en la primavera, en época de deshielo. La influencia mediterránea determina el régimen pluviométrico de la mayor parte de la cuenca, caracterizado con un máximo de precipitaciones en el otoño y la primavera, y un verano con lluvias escasas e irregulares y un invierno poco lluvioso. En el curso medio y bajo, recibe fuertes influencias de sus afluentes con régimen de crecidas coincidiendo con las lluvias concentradas en el otoño. También explica las suaves temperaturas hivernales del litoral o los días de invierno cálidos de las zonas interiores y de montaña. En cambio, la influencia centroeuropea acentúa el clima seco hibernal, intensifica las lluvias de primavera y de verano y favorece las freoladas ocasionales pero intensas que aparecen irregularmente en el invierno. Así pues, el Ter se define como un río de régimen de caudal intermedio, con un volumen anual de 840 hm³ (con una media de 27 m³/s de descarga en la desembocadura), que presenta crecidas tanto en la primavera como en el otoño.

La cuenca del río Ter está regulada por el sistema de embalses Sau, Susqueda y el Pastoral, y sus aguas son tratadas en la potabilizadora de Cardedeu. La Figura 5.6. muestra la ubicación de la cuenca del río Ter en la Península Ibérica y en Cataluña, así como la localización de dichos embalses en la cuenca del Ter.

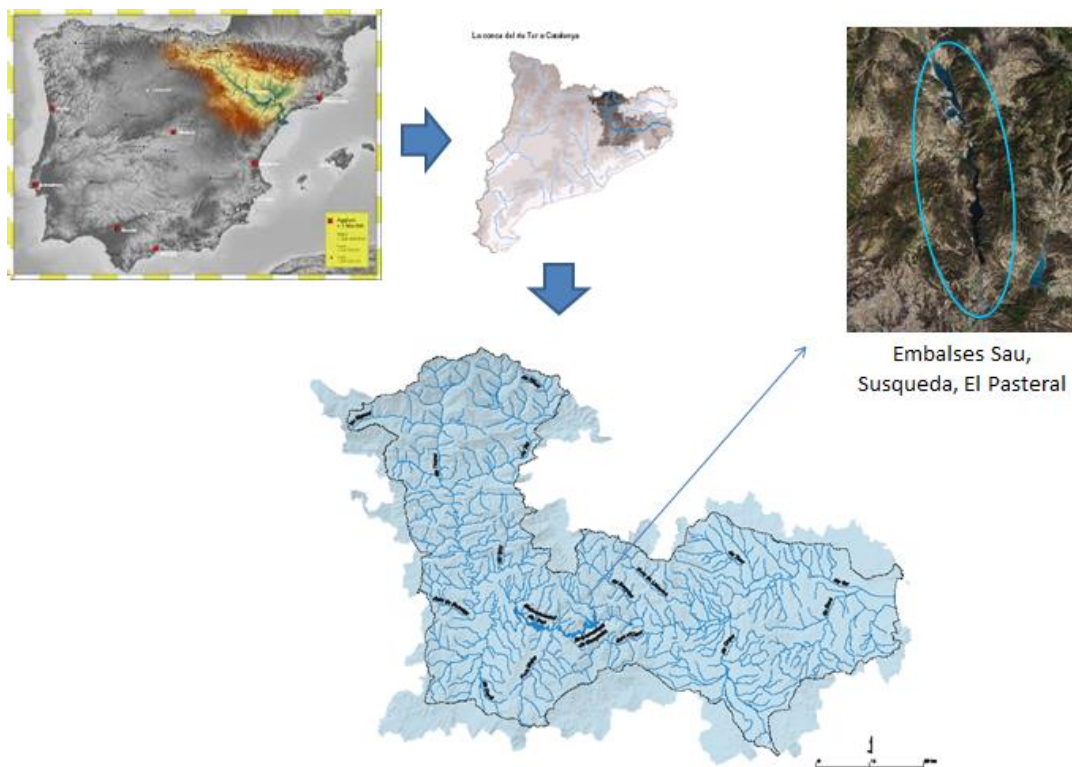


Figura 5.6. Localización de la cuenca del río Ter y de los embalses de Sau, Susqueda y el Pastoral

A pesar de ser un río con menor contaminación que el Llobregat, el río Ter sufre una sobreexplotación originada por las minicentrales situadas en el tramo alto del río, mientras que en el tramo medio el principal problema es la falta de agua y los purines de cerdo.

A su paso por Ripoll, el río Ter recibe las limpias aguas del Freser que refuerza su caudal. El Gurri es uno de los afluentes principales del Ter en la zona central antes del embalse de Sau. Es un pequeño río mediterráneo casi seco, cuyo caudal se incrementa notablemente por las aportaciones de la EDAR de Vic, que hace renacer el río, por lo que los contaminantes que se encuentren en el Gurri vendrán directamente marcados por las emisiones de los efluentes de la EDAR de Vic, que contiene una alta carga contaminante en la entrada (tal y como se refleja en los datos obtenidos en nuestro estudio), y un difícil proceso de depuración por la gran carga que recibe y falta de dilución al verter, por lo que da un resultado final decepcionante por lo que respecta a la recuperación del estado ecológico del río. Actualmente el río posee un sustrato adecuado, mientras que los índices biológicos no son buenos, lo que sin embargo era algo impensable hace algunos años, cuando la depuradora tenía solamente tratamiento físico químico.

Siguiendo el curso del río, la ganadería intensiva que se practica en la comarca de Osona conlleva un consumo espectacular de agua y genera un exceso de purines de cerdo que los suelos agrícolas no pueden absorber, siendo el principal problema de la zona el poco caudal y el deterioro de la calidad del río por los purines. El río Ges, la riera de Sorreigs y el río Gurri son los afluentes más destacados del Ter en esta zona. Entre Osona y la Selva se encuentra el sistema de embalses Sau-Susqueda-Pasteral, importante reserva acuífera que aseguran el suministro de agua a la Costa Brava, a Girona y a Barcelona (destinada a regular el caudal, la producción eléctrica y el aporte de 8m³/s hacia el área metropolitana de Barcelona para su consumo). Tras atravesar la EDAR de Girona, única de las estudiadas que no tiene etapa adicional de eliminación de nitrógeno. En su recorrido desde Girona hasta el mar, el Ter cruza Sant Julià de Ramis, Cervià de Ter, Flaçà y Torroella de Montgrí en medio de frondosos bosques de ribera. Finalmente, tras pasar por la EDAR de Banyoles, se tomaron muestras en los puntos localizados en la misma, pero en el río Terri (J028) y a su paso por la localidad de Torroella de Montgrí, tramo final del río Ter (J053) donde de nuevo se ensancha su caudal. Finalmente, el río Ter desemboca en mar mediterráneo, en el Estartit, con las islas Medas con su particular ecosistema. La figura 5.7. representa el perfil longitudinal del principal curso del río Ter, con la ubicación de las principales localidades:

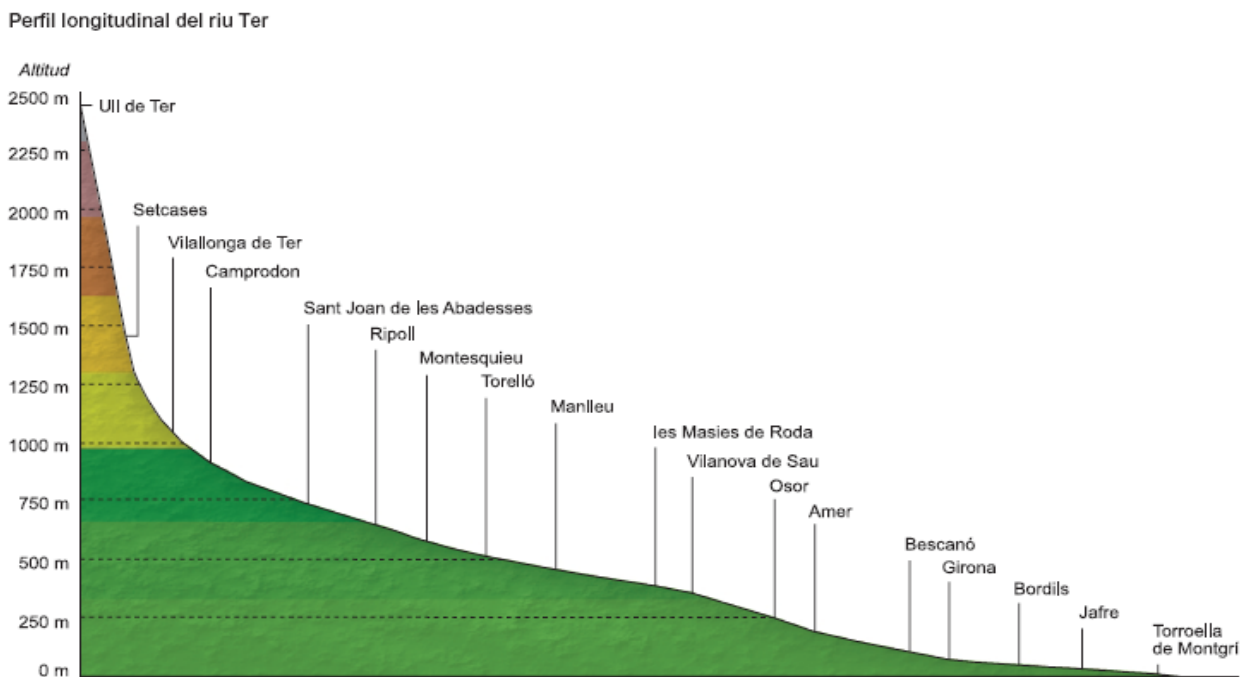


Figura 5.7. Perfil longitudinal del río Ter (Atlas del Ter)

Puntos de muestreo: A continuación, se describen brevemente los puntos de muestreo en aguas superficiales recogidas en diferentes tramos de la cuenca del río Ter, así como en EDARs a su paso. En las tablas 2 y 3 del artículo adjunto (Céspedes y col., 2008) se incluyen respectivamente los datos de los puntos de muestreo superficiales con las principales características (TOC, SPM, conductividad, pH y DO) (Tabla 2) y los tipos de tratamientos y principales características de las cinco EDARs estudiadas (Tabla 3) en la cuenca del río Ter:

- **Río Ter (J033):** El primer punto de muestreo (código J033), está localizado en el río Ter, después de la población de Ripoll, donde recibe el agua del Freser, que refuerza su caudal. A continuación, se encuentran dos depuradoras:

- **EDAR de Ripoll**, que trata aguas residuales de origen urbano (36.000 habitantes) y 30-40% de origen industrial, principalment de industrias textiles y de curtidos

- **EDAR de Torelló**, la de menor capacidad (6.000 m³ /día en 2002) y flujo (210 m³/h) de las cinco EDARs estudiadas

- **Río Ges (J091):** el siguiente punto de agua superficial, ubicado a la altura de Torelló, donde confluyen el río Ges con el río Ter,

- **Riera de Sorreig (J029):** punto de muestreo ubicado en les Masies del Voltregà.

- **EDAR de Vic:** estación depuradora con tratamiento de nutrientes que vierte sus aguas en el río Gurri, es una EDAR con agua mixta, industrial y urbana con importancia en los vertidos de las industrias de curtidos.

- **Río Gurri (J036):** tras pasar la EDAR de Vic, el siguiente punto de muestreo se ubica en uno de los principales afluentes del río Ter (Gurri) que nace en el Montseny y discurre hasta el siguiente punto muestreado,.

- **Roda de Ter (J019),** desembocadura del río Gurri, donde el Ter forma un meandro.

- **Pasteral (J060),** tras el paso del río Ter por el sistema de embalses Sau-Susqueda-Pasteral,

- **EDAR de Girona,** de las depuradoras estudiadas, es la única que no tiene etapa adicional de eliminación de nitrógeno. Posteriormente se tomaron aguas superficiales a su paso por

- **Sant Julià de Ramis (J054),** población en el camino del Ter desde Girona al Mediterráneo

- **EDAR de Banyoles,** con una capacidad media (14.000 m³/d) de las cinco EDARs estudiadas

- **Río Terri (J028),** afluente del río Ter, en el que se tomaron muestras tras su paso por la EDAR

- **Torroella de Mongrì (J053),** último punto de muestro del río Ter

Toma de muestras en la cuenca del río Ter: La toma de muestras fue realizada en marzo del 2001 por personal del ACA en diferentes puntos de la cuenca del río Ter, 9 correspondían a aguas superficiales, y los otros 10 a muestras integradas de la entrada y salida de 5 EDARs de la zona: Vic, Girona, Banyoles, Ripoll y Torelló.

5.1.3. PLAN DE VIGILANCIA AMBIENTAL EN LAS CUENCAS DEL LLOBREGAT y DEL TER

Los Programas de Vigilancia Ambiental (PVA) de la calidad del agua permiten hacer un seguimiento de los parámetros clave y son esenciales para proporcionar información acerca de la composición y la calidad del agua a estudio. La información obtenida de estos programas es fundamental para conocer la calidad del agua en los ríos y la eficacia de las EDARs eliminando contaminantes.

Dentro de un convenio de colaboración entre la Agencia Catalana del Agua (ACA) y el Departamento de Química Ambiental del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IIQAB-CSIC), en esta tesis se ha realizado un PVA de los ríos Ter y Llobregat, en el cual se ha llevado a cabo la “Determinación de Compuestos Disruptores Endocrinos (EDCs) en ríos y efluentes de EDARs de Cataluña” en la cuenca de los ríos Ter y Llobregat, que abastecen de agua a Barcelona:

OBJETIVOS:

Los principales objetivos fijados en el PVA fueron:

- (1) Determinación de compuestos disruptores endocrinos en aguas de las cuencas de los ríos Llobregat y Ter, mediante el **método** multiresiduo **integrado** desarrollado previamente (Céspedes y col., 2004):
 - **Análisis Químico:** Extracción en fase sólida (SPE) seguida de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) con interfase de electrospray (ESI) en modo de ionización positivo y negativo para la determinación de EDCs.
 - **Análisis Biológico:** Determinación de la actividad estrogénica total en las muestras analizadas mediante el ensayo de levaduras recombinantes (RYA)

- (2) Desarrollo de un **Plan de Vigilancia Ambiental** incluyendo el análisis de aguas superficiales y residuales del Ter y el Llobregat, con un total de 38 muestras de agua correspondientes a las cuencas de ambos ríos.
 - **Cuenca del Llobregat:** se analizaron 19 muestras de agua tomadas a lo largo de la cuenca del río Llobregat: 11 correspondientes al río y sus afluentes (Anoia y Cardener), y 8 muestras integradas correspondientes a la entrada y salida de cuatro EDARs de la zona: Manresa, Igualada, Terrassa y Martorell.
 - **Cuenca del Ter:** se analizaron por separado la fase disuelta y el material particulado retenido en los filtros correspondientes a 19 muestras de agua tomadas en 9 puntos de la cuenca del río Ter, así como muestras integradas correspondientes a la entrada y salida de cinco EDARs a su paso (Ripoll, Torelló, Vic, Girona, Banyoles). Adicionalmente complementando el PVA, Petrovic y col., analizaron los lodos correspondientes a las 5 EDARs (Petrovic y col., 2001).

- (3) Identificación y determinación de los EDCs más frecuentes, estableciendo los puntos donde existe una mayor contaminación por EDCs (*hot spots*), para poder aplicar futuras medidas correctoras para minimizar la contaminación debida a estos compuestos (EDCs).

5.2. RESULTADOS

A continuación, se incluyen las tres publicaciones elaboradas de los estudios realizados sobre la determinación de EDCs en las cuencas de los ríos Ter y Llobregat. Las muestras fueron caracterizadas por LC-ESI-MS para controlar la existencia y transformación de los EDCs durante el tratamiento físico-químico y biológico. La aplicación del ensayo de levaduras recombinantes (RYA) permitió la detección de actividad estrogénica en aguas superficiales y residuales y la integración de resultados con LC-MS:

Los compuestos objeto de estudio fueron: surfactantes no iónicos: alquilfenoles (APs), alquilfenoles etoxilados (AP_nEs, _{n=1,2}), alcoholes etoxilados (AEOs); plastificantes: bisfenol A y ftalatos; estrógenos y benzotiazoles. La discusión de resultados presentada en esta tesis se centra en los EDCs más relevantes desde el punto de vista de actividad estrogénica, es decir, en los estrógenos, los compuestos alquilfenólicos APs y APEOs de cadena corta (n=1 y 2), por ser los que presentan una mayor estrogénicidad, el BPA, y los ftalatos, mientras que no se incluyen en las conclusiones los alcoholes etoxilados ni los benzotiazoles, ya que aunque están incluidos en el método multiresiduo, tienen una actividad estrogénica muy baja o no tienen.

5.2.1. Estudios realizados en la cuenca del Río Llobregat

1) *Artículo científico: 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*

En este Programa de Vigilancia Ambiental se combinó el análisis mediante el ensayo de levaduras recombinante (RYA) establecido por García-Reyero y col. (García-Reyero y col. 2001) para evaluar el potencial de actividad estrogénica presente en las muestras tomadas a lo largo de la cuenca del río Llobregat, con el análisis mediante LC-MS para determinar las concentraciones presentes de cada contaminante estudiado en las muestras (10 de aguas superficiales y 8 de aguas residuales, correspondientes a las entradas y efluentes de 4 EDARs). Finalmente, se confirmaron los niveles de estrógenos mediante LC-MS/MS.

Los objetivos de este estudio fueron los siguientes:

- i) determinar la presencia y niveles de los EDCs seleccionados a lo largo de la cuenca del río Llobregat
- ii) determinar si la concentración de EDCs presente en las muestras puede explicar la estrogénicidad detectada mediante el ensayo RYA en las muestras,
- iii) determinar si las EDARs estudiadas son eficaces eliminando los EDCs estudiados
- iv) determinar el impacto de las descargas de los efluentes de las depuradoras en los ríos de la cuenca del Llobregat, tanto la carga química como la estrogénicidad total.

El objetivo final fue monitorizar las cargas de EDCs a lo largo de la cuenca entera y estimar la contribución de las EDARs en los niveles de EDCs en las aguas del Llobregat. La integración de análisis químicos y biológicos permitieron detectar la estrogénicidad de las muestras a lo largo de la cuenca del río Llobregat, así como identificar y cuantificar mediante LC-MS los principales compuestos EDs causantes de este efecto, así como los niveles de concentración para cada uno de los EDCs estudiados.

Artículo científico número 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.

Environmental Technology. Vol. 22 (2001) 1043-1054



Distribution of endocrine disruptors in the Llobregat River basin (Catalonia, NE Spain)

Raquel Céspedes^a, Sílvia Lacorte^a, Demetrio Raldúa^c, Antonio Ginebreda^b,
Damià Barceló^a, Benjamin Piña^{c,*}

^a *Department of Environmental Chemistry, IIQAB-CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Catalonia, Spain*

^b *Catalan Water Agency (Agència Catalana de l'Aigua), Provença 204, 08036 Barcelona, Catalonia, Spain*

^c *Department of Molecular Biology, IBMB-CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Catalonia, Spain*

Received 23 August 2004; received in revised form 23 February 2005; accepted 23 March 2005

Available online 12 May 2005

Abstract

The Llobregat basin is a Mediterranean fluvial system with major agricultural, urban and industrial impacts. We combined chemical quantification by liquid chromatography–mass spectrometry with electrospray interface (LC-ESI-MS) and the recombinant yeast assay (RYA) assays to estimate the loads of endocrine disrupting compounds (EDCs) along the basin. Chemical analysis revealed maximum concentrations (at $\mu\text{g l}^{-1}$ level) of alkylphenols at the lower course of the Llobregat River, which correlated with high levels of estrogenic activity detected by RYA. Analysis by RYA and LC-ESI-MS of influent and effluent waters from four sewage treatment plants (STP) discharging into the basin showed the removal of 80–95% of EDCs by STP treatment. Chemical analysis data and RYA data showed a quasi-linear correlation, demonstrating the complementarity of both methods. Our data suggest that the concentrations of the analysed compounds were enough to explain the total estrogenicity of water and STP samples from the Llobregat basin.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Endocrine disrupting compounds; Estrogenicity; Liquid chromatography–mass spectrometry; Recombinant yeast assay

1. Introduction

The Llobregat River (Catalonia, NE Spain) flows for 170 km from its source in the pre-Pyrenees mountains to the Mediterranean Sea, 10 km south of the city of Barcelona. It has important aesthetic and commercial value, as it supplies 40% crosses of Barcelona's drinking water

and flows through rural as well as highly industrialized areas.

During the last century, the Llobregat River has experienced the input of organic and inorganic compounds, which has led to multiple episodes of dead fish, bubbles, smells, etc. Llobregat River, together with its two main tributaries, Cardener River and Anoia River, constitute a good example of a Mediterranean basin, with irregular and relatively low fluxes and suffering from pollution inputs from agricultural, industrial and domestic usages. Since 1960, tannery, textile, pulp and paper industries situated along the Llobregat basin have

* Corresponding author. Tel.: +34 93 400 6157; fax: +34 93 204 5904.

E-mail address: bpcbmc@cid.csic.es (B. Piña).

discharged into the river a variety of organic chemicals, including pesticides, surfactants and plasticizers (Castillo et al., 2000; Petrovic et al., 2002a). In addition, the Llobregat basin receives effluents from more than 30 sewage treatment plants (STP). Wastewaters discharging in the Cardener River are mainly of domestic origin, whereas Anoia and Llobregat Rivers also receive significant amounts of industrial waste, 30–60% of the load coming from the tannery and textile sectors.

Among environmental pollutants detected in surface waters, endocrine disrupting chemicals (EDCs) deserve specific attention. By definition, EDCs are capable to alter the endocrine system of exposed biota by mimicking or counteracting natural hormones (Colborn et al., 1993; Colborn, 1995). There is a wide range of suspected or bona fide EDCs, including synthetic and natural hormones, plant metabolites, alkylphenols, phthalates, pesticides, herbicides, PCBs and some of their derivatives, and many aromatic compounds (Jobling et al., 1995). These substances are present in nearly all kinds of water bodies, including rivers, lakes and estuaries (Yin et al., 2002). The occurrence and concentration of non-natural EDCs is an excellent marker for human impact.

Target compounds included in this study were octylphenol (OP), nonylphenol (NP), NP mono- and di-ethoxylates (NPEO₁ and NPEO₂), bisphenol A (BPA), phthalates and synthetic and natural hormones. Alkylphenols (OP, NP, and NPEOs) are used mainly as non-ionic surfactants, whereas BPA and phthalates are used as plasticizers. Some of them, like nonylphenol, octylphenol and di(2-ethylhexylphthalate) are now included in the new Water Framework European Directive (WFD) 2000/60/CE (European Commission, 2000), and in the US EPA priority pollutant list (<http://www.epa.gov>). These compounds can be found in surface and wastewaters because of discharges from urban, chemical and pharmaceutical industries, as well as due to household applications (Purdum et al., 1994; Routledge et al., 1998; Sonnenschein and Soto, 1998).

An interesting aspect on the environmental contamination by EDCs is the contribution of STP discharges to the total loads of receiving waters. Many industries use high ethoxylated alkylphenol derivatives as non-ionic surfactants, as they are regarded as non-estrogenic and only marginally toxic. However, primary degradation of these compounds in STP or in the environment generates alkylphenol derivatives with two or less ethoxy groups attached (like OP, NP, NPEO₁ and NPEO₂), which are more persistent and toxic than the original compounds or other EDCs (Soto et al., 1991; Jobling and Sumpter, 1993; Yin et al., 2002). In vitro and in vivo experiments have demonstrated that the estrogenic effect of alkylphenols is 4–6 orders of magnitude lower than that of endogenous 17- β -estradiol (Ahel et al., 1994; Céspedes et al., 2004; Van den Belt et al., 2004). Given their ubiquity in the environment, their persistent nat-

ure, and their lipophilicity, even this relatively low intrinsic estrogenicity is enough to target them as the main EDCs in aquatic media and therefore deserving continuous monitoring (Ahel et al., 1996; this work).

In this study, we combined LC–MS analysis with the functional recombinant yeast assay (RYA) to evaluate the potential for endocrine disruption of environmental samples. RYA consists of an engineered yeast strain in which the transcription of a reporter gene depends upon the presence in the medium of compounds capable to bind to the human estrogen receptor (ER, Garcia-Reyero et al., 2001). This is a simplified version of the mechanism by which natural estrogens operate in vertebrates; the fundamental similarity of all eukaryotes ensures that it also works in yeast in a similar way.

Previous studies determined that both alkylphenolic compounds and estrogenic and anti-estrogenic activities occurred at different points of the Llobregat basin (Castillo et al., 2000; Solé et al., 2000; Garcia-Reyero et al., 2001; Petrovic et al., 2002a,b). The aim of this study is to determine whether EDC concentrations present in surface waters can explain the observed estrogenic activity and to test the efficiency of STPs to remove EDCs. In addition, we are interested on the impact of effluents from STPs discharges on receiving surface waters, both in terms of total estrogenicity and of chemical loads (Laganá et al., 2004). The final goal is to monitor EDC loads along a complete basin and to estimate the contribution of STPs to their levels in the Llobregat waters.

2. Experimental section

2.1. Chemicals and reagents

Nonylphenol monoethoxylate (NPEO₁) and nonylphenol diethoxylate (NPEO₂) were laboratory-synthesized in Agbar (Aigües de Barcelona, Barcelona, Spain). Phthalates (dimethyl phthalate (DMP), diethyl phthalate (DEP), dibutyl phthalate (DBP), butylbenzyl phthalate (BBP) and di(2-ethylhexyl phthalate)(DEHP)), 4-*tert*-octylphenol (OP), technical grade 4-nonylphenol (NP) and high purity (98%) 4-heptylphenol (which was used as the internal standard), were obtained from Aldrich (Milwaukee, WI, USA). The internal standard bis(2-ethylhexyl)phthalate (ring-D₄, high purity 98%) was purchased from Cambridge Isotope Laboratories (Cambridge, MA, USA). Estradiol, estrone, estriol, ethynylestradiol and diethylstilbestrol were from Sigma (St Louis, MO, USA).

Stock solutions of individual standards and standard mixtures were prepared at 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$ in methanol. Working standard solutions were obtained by further dilution of stock solutions with methanol. HPLC-grade solvents (water, methanol, acetonitrile, acetone and dichloromethane) were purchased from Merck

(Darmstadt, Germany). Analytical grade sodium acetate was purchased from Panreac (Barcelona, Spain).

2.2. Sample collection/sampling sites

Water samples were collected during autumn 2001 in 10 points distributed along the Llobregat basin (Catalonia, NE, Spain; Fig. 1) including Anoia and Cardener tributaries, as well as influent and effluent wastewaters of four STP. Two samples were collected in site 5, one in the channel (5a) and another in the river (5b).

The four STP plants studied were Manresa (STP A), Terrassa (STP B), Igualada, (STP C) and Martorell (STP D, Fig. 1). All of them are operated in similar conditions consisting in primary settlement followed by biological treatment. Their capacities are similar, receiving between 30000 and 180000 m³ per day at an average

flow rate of 900–1500 m³ h⁻¹. Water samples were taken in Pyrex borosilicate amber glass containers. Each bottle was rinsed with tap water and with high purity water prior to sampling. Influent and effluent waters were collected as 24 h composite samples. Samples were immediately stored at 4 °C and transported to the laboratory where SPE was performed between 24 and 48 h after sampling.

2.3. Sample preparation

Surface water was filtered through 0.45 µm membrane filter, whereas wastewaters were filtered through 1, 0.7 and 0.45 µm pore size. Solid Phase Extraction (SPE) with Lichrolut RP-18 (500 mg, 6 ml) cartridges (Merck, Darmstadt, Germany) was performed using an automated sampler processor ASPEC XL (Gilson, Villiers-le-Bel, France), fitted with a 817 switching device and an external 306 LC pump. SPE cartridges were conditioned by passing 7 ml of acetonitrile, 5 ml of methanol, and 5 ml of HPLC-grade water through the cartridge at a flow rate of 3 ml min⁻¹. 500 ml of filtered water sample were percolated through the C18 cartridge at a flow rate of 5 ml min⁻¹. After pre-concentration, the sorbent was dried for 30 min using a Baker SPE 12 g apparatus (J.T. Baker, Deventer, Netherlands) connected to a vacuum system set at -15 psi. SPE cartridges were stored at -20 °C until analysis (Petrovic and Barceló, 2000). The elution step was performed by passing (2 × 5 ml) of acetonitrile, with a 5-min delay between them. After elution, the extract was evaporated to dryness with a gentle stream of nitrogen and reconstituted with methanol to a final volume of 300 µl prior to analysis. Internal standards (4-HP) for compounds analysed in NI mode and DEHP-d₄ for PI mode, were added to the final extract at 1000 and 250 µg l⁻¹ respectively.

2.4. Liquid chromatography–mass spectrometric analysis

HPLC–MS was performed with a HP 1100 autosampler fitted with a 100-µl loop and an HP 1090 A LC binary pump from Hewlett Packard (Palo Alto, CA, USA). The analytical protocol followed is detailed in an earlier study (Céspedes et al., 2004). Briefly, it consists in an HPLC separation with a 5-µm, 250 × 4 mm i.d. C₁₈ reversed phase column (LiChrospher 100 RP-18) preceded by a guard column (4 × 4 mm i.d., 5-µm) of the same packing material from Merck (Darmstadt, Germany). The separation was performed at 1 ml min⁻¹ using methanol (A) and water (B) in PI mode, and acetonitrile (A) and water (B) in NI mode. In PI mode, gradient elution was from 30% A during 3 min, to 80% A in 10 min, to 90% A in 5 min, kept isocratic for 15 min, to 100% A in 10 min and kept isocratic for 10 min. The gradient elution for NI mode started with 30% A, to 60% A in 15 min, to 70% in 5 min, to 90% in 10 min and to

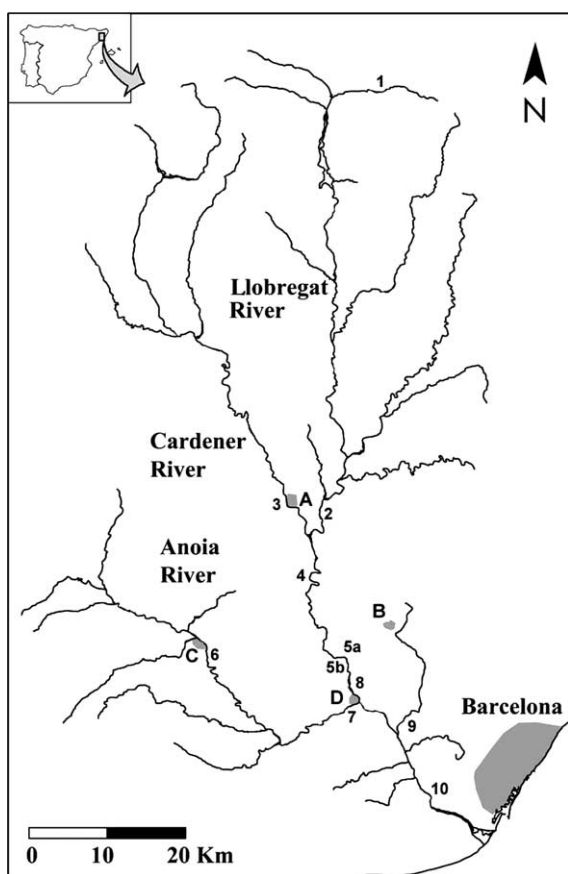


Fig. 1. Map of sampling sites in the Llobregat basin. Numbers 1 to 10 indicate sampling points for river water, letters A to D correspond to STP locations. Grey areas indicate approximate locations of cities near to these STPs: A—Manresa; B—Terrassa, C—Igualada; D—Martorell. The position of the city of Barcelona is given to facilitate localization of the area in the map.

100% in 3 min, kept isocratic for 5 min. The extraction voltage used in both, positive (PI) and negative ionization (NI) modes was 90 V. Detection was carried out using an HP 1040 M diode array UV–Vis detector coupled in series with an LC–MSD HP 1100 mass selective detector, equipped with an electrospray (ESI) interface. Acquisition was performed 50% in selected ion monitoring (SIM) and in full scan mode respectively.

2.5. Quantitation

Quantitative analysis was performed in selected ion monitoring (SIM) mode using external standard calibration. Calibration curves were generated from 50 ng ml⁻¹ to 10 µg ml⁻¹ and good fits ($r^2 > 0.990$) were obtained. Confirmation criteria involved analysis in full scan mode, and matching the retention time and the mass spectrum against a pure standard. The internal standards were used for process control, in order to check the extent of ion suppression effect in ESI-MS detection. Thus, in NI mode 4-HP was used for the analysis of alkylphenolic compounds, whereas DEHP-d₄ was used for phthalates and NPEOs in PI mode. A method blank was included in every analysis to avoid contamination from laboratory material (e.g., solvents, glassware and chemicals; Jara et al., 2000). The recoveries and overall method reproducibility were determined in a previous work (Céspedes et al., 2004) for every compound in distilled water ($n = 6$) spiked with the standard mixture to a final concentration of 10 µg l⁻¹. Estradiol, estrone, estriol, ethynylestradiol and diethylstilbestrol were analysed and quantified according to a previously described method (Céspedes et al., 2004).

2.6. Recombinant yeast assay (RYA)

Yeast strain BY4741 transformed with plasmids pH5HE0 (expressing human ER) and pVITB2x (reporter plasmid encompassing the β-galactosidase gene under control of ER) have been described elsewhere (Garcia-Reyero et al., 2001; Céspedes et al., 2004). RYA tests were performed essentially as in Garcia-Reyero et al. (2001), in 96-well polypropylene microtiter plates (NUNC, Roskilde, Denmark). Five µl of sample extract were added to 70 µl-aliquots of yeast culture and these initial inoculations were used for subsequent serial dilutions. Maximum induction and background values were measured by addition of either 10 nM estradiol in methanol or only vehicle, respectively to four wells in each plate. Plates were incubated for 4 h at 30 °C under mild shaking. Yeast cells were then lysed with Y-PER™ (PIERCE, Rockford, IL, USA) and β-galactosidase activity measured with *orto*-nitrophenyl β-D-galactopyranoside (ONPG) as described (Garcia-Reyero et al., 2001). β-Galactosidase units were calculated according to the equation:

$$\beta\text{-galactosidase units} = \frac{1000 \cdot A_{420}}{A_{600}(t_f - t_o)}$$

In which t_o and t_f represent the initial and final times of incubation of each sample with ONPG and A_{420} and A_{600} represent absorbance values at 600 and 420 nm, respectively for each well.

2.6.1. Calculation of estradiol equivalents

Estradiol equivalents (E2 eq) are defined as the concentration of estradiol required to elicit the same response as the sample in the RYA assay. To translate results from serial dilutions to E2 eq, we assumed that hormonal dose-response curves follow a sigmoidal function,

$$\frac{R - R_0}{R_{\max} - R_0} = \frac{1}{1 + \frac{K_d}{[L]}}$$

In which R_0 , R , and R_{\max} represent β-galactosidase units obtained without ligand (or extract) addition, at a given ligand concentration $[L]$, and at a saturating ligand concentration, respectively. K_d represents the dissociation constant of the ligand–hormone complex; its value coincides with EC_{50} , the ligand concentration giving 50% of the maximal response. For extract serial dilutions, plotting dilution factors versus relative response followed an inverse sigmoidal function (see Fig. 2), in which the

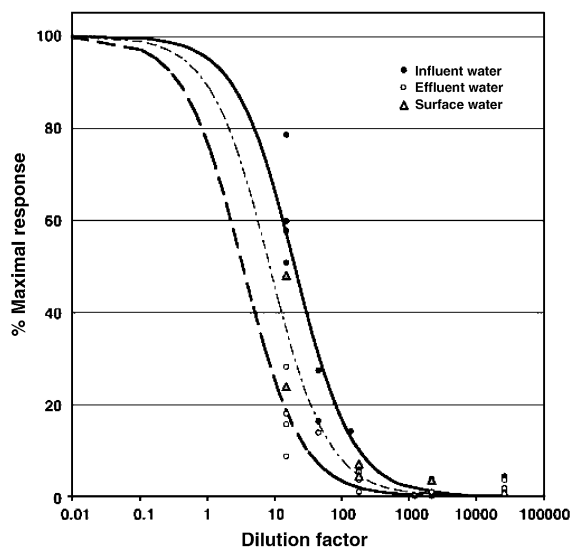


Fig. 2. Calculation of estradiol equivalents from RYA results. Black dots, empty dots and grey triangles represent relative β-galactosidase values obtained at different dilution factors for influent and effluent waters from STP Manresa and for the nearby sampling site number 3, respectively. Sigmoidal functions were calculated by non-linear regression methods. Continuous and discontinuous thick curves correspond to influent and effluent waters from STP Manresa, whereas the discontinuous thin line corresponds to the water sample in site 3.

Table 1
Concentrations in mg l^{-1} of different EDCs analysed by LC-MS

Sites	River	OP	NP	BPA	NPEO1	NPEO2	DEP	DEHP	DBP	HOBT
<i>Surface water samples</i>										
1	Llobregat	<0.09	0.22	0.09	<0.22	<0.06	1.45	<0.20	0.6	<0.02
2	Llobregat	<0.09	<0.15	0.09	<0.22	0.61	1.5	<0.20	0.34	<0.02
3	Cardener	<0.09	0.39	<0.09	3.22	2.53	6.85	<0.20	0.3	<0.02
4	Llobregat	<0.09	0.26	<0.09	1.19	1.2	0.54	<0.20	0.47	<0.02
5a	Llobregat	0.09	0.5	0.27	<0.22	0.39	1.26	0.82	1	<0.02
5b	Llobregat	<0.09	0.45	<0.09	<0.22	<0.06	2.05	3.09	1.3	<0.02
6	Anoia	<0.09	1.23	<0.09	<0.22	<0.06	0.85	0.65	<0.19	<0.02
7	Anoia	<0.09	0.53	0.12	<0.22	1.27	0.58	0.45	<0.19	<0.02
8	Llobregat	0.26	2.57	0.11	3.54	1.17	0.46	0.31	<0.19	<0.02
9	Riera de Rubí	21.9	37.3	0.85	6.87	3.17	0.4	0.77	<0.19	<0.02
10	Llobregat	2.57	13.9	2.97	<0.22	<0.06	0.22	<0.20	<0.19	<0.02
<i>SPT samples^a SPT</i>										
STP A Inf	Manresa	0.17	17.1	0.94	19.3	5.56	1.62	3.17	0.07	<0.02
STP A Eff	Manresa	<0.09	2.99	0.34	9.53	8.97	0.93	1.34	<0.19	<0.02
STP B Inf	Terrasa	0.08	29.8	<0.09	<0.22	<0.06	12.97	0.26	0.83	<0.02
STP B Eff	Terrasa	<0.09	0.8	<0.09	10.6	9.69	10.21	0.23	<0.19	0.095
STP C Inf	Igualada	0.24	44.8	6.98	2.37	5.61	3.19	0.82	8.86	1.07
STP C Eff	Igualada	<0.09	1.24	<0.09	<0.22	<0.06	2.25	1.12	<0.19	0.13
STP D Inf	Martorell	0.18	11.9	<0.09	3.8	0.82	1.06	1.9	0.35	<0.02
STP D Eff	Martorell	0.09	0.89	<0.09	<0.22	3.87	0.56	0.33	<0.19	<0.02
LOD (mg l^{-1})		0.09	0.15	0.09	0.22	0.06	0.2	0.2	0.19	0.02
Estrogenicity (E2 equivalency) ^b		2.13×10^{-4}	5.05×10^{-4}	2.43×10^{-5}	1.34×10^{-5}	bdl	5.75×10^{-6}	1.74×10^{-5}	1.01×10^{-5}	6.30×10^{-6}

^a Inf: Influent waters; Eff: effluents.

^b From Céspedes et al. (2004). bdl: Below detection levels.

apparent EC_{50} correspond to the dilution (actual or theoretical) giving 50% the response for 10 nM estradiol. Apparent EC_{50} values for each sample (a minimum of two replicates with at least four points each) were calculated using standard non-linear regression methods. These values were converted to E2 eq by assuming they correspond to the EC_{50} of estradiol, 40 ng l^{-1} in our assay (Céspedes et al., 2004).

Theoretical estrogenic activities of samples were calculated from the chemical data following the equation:

$$E2 \text{ eq} = \sum x_i \varepsilon_i.$$

In which x_i represents the concentrations for each compound calculated from LC-ESI-MS data and ε_i the corresponding relative estrogenicity factors (Table 1, data from Céspedes et al., 2004).

3. Results and discussion

3.1. EDCs in Llobregat River basin

The distribution of different endocrine disruptors along the Llobregat River waters, its tributaries, and STPs discharging into them is shown in Table 1; ion chromatograms obtained by LC-ESI-MS in SIM mode is shown in Fig. 3. All surface waters contained at least one analyte, at concentrations ranging from 0.06 to

$37.3 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$, which is in agreement with previous studies carried out in this group (Castillo et al., 2000; Eichhorn et al., 2000; Solé et al., 2000; Garcia-Reyero et al., 2001; Petrovic et al., 2002a,b). NPEO₁, NPEO₂, NP and DEHP were the compounds most frequently detected in water samples. There was a general trend of increasing analyte concentrations from the upper to the lower course of the river. This trend was more obvious for alkylphenols and BPA than for phthalates or alkylphenol ethoxylates (Table 1). It probably reflects the increasing contaminant burden of the Llobregat and Anoia Rivers as they receive significant percentage of wastewaters of industrial origin, mainly from textile industry and tanneries, but also from food, chemicals and paper processing. From all sampling points, the maximum contamination levels corresponded to sites 9 ($21.9 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ of OP and $37.3 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ of NP) and 10 (2.57 , 13.9 and $2.97 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ of OP, NP and BPA, respectively). Site 9 is located in a small stream, Riera de Rubí, to which many different industrial and domestic wastewaters discharge. The least contaminated spot corresponded to site 1, at the upper course of the Llobregat River (Table 1, Fig. 1), although at this point (just after the spring of the river) water already contained $0.22 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ of NP, $0.09 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ of BPA and $1.45 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ of DEP. In this study, we did not trace the origin of contaminants, although these findings reveal that organic compounds might already be present in the aquifer due to leaching

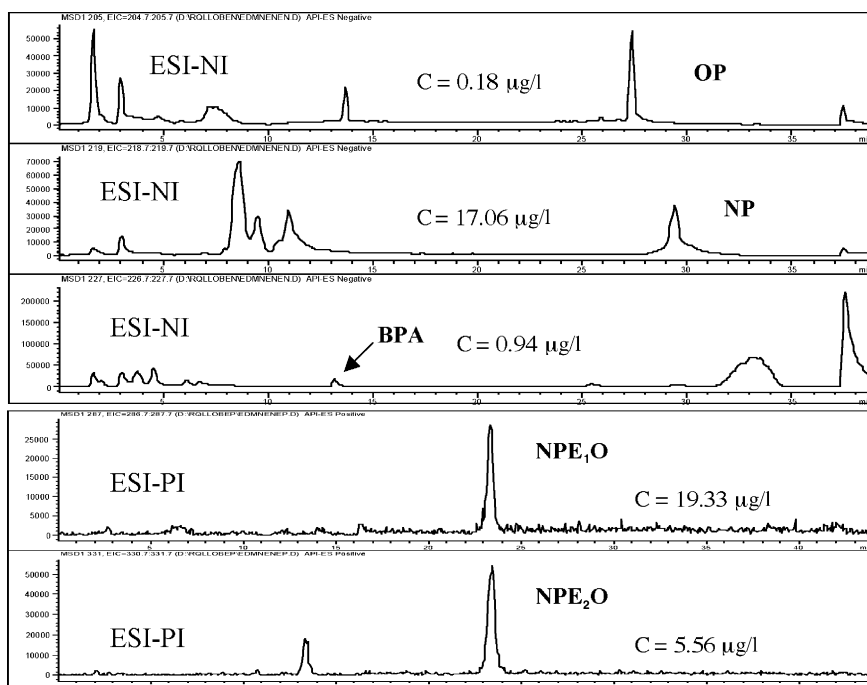


Fig. 3. Chromatograms obtained by LC-ESI-MS in mode SIM, corresponding to OP, BPA, NP, NPEO₁ and NPEO₂ detected in the influent of Manresa STP.

(Latorre et al., 2002). Levels of natural estrogens (estradiol, estrone and estriol) and of estrogenic pharmaceuticals (ethynylestradiol and diethylstilbestrol) were below detection limits in all samples analysed (data not shown).

3.2. Inputs and fate of EDCs in STPs

The main compound detected in influent waters of the 4 studied STPs was NP, detected at levels from 11.9 to 44.8 $\mu\text{g l}^{-1}$ followed by NPEO₁, NPEO₂, BPA and DEP, whereas the levels of OP did not exceed the 0.5 $\mu\text{g l}^{-1}$ in any STP sample (Table 1). The levels of NP in STP influents are approximately 3–10 times higher than those found for NP in surface waters. NP loads were effectively reduced (83% and 97% removal) in effluent waters from all analysed SPTs. OP was found in low concentrations in the influents (0.09–0.24 $\mu\text{g l}^{-1}$), in line with its less consumption. Its levels were below detection in all analysed SPTs.

On the other hand, alkylphenols ethoxylates (NPEO₁ and NPEO₂) were detected in STPs influents at 0.82–19.3 $\mu\text{g l}^{-1}$, levels similar to those detected in the period 1999–2002 in STPs located along the Llobregat River (Castillo et al., 2000; Petrovic et al., 2002a,b). Unlike NP and OP, NPEO₁ and NPEO₂ concentrations were higher in effluents than in influent waters in many cases (Table 2). This phenomenon, particularly noticeable in SPT B (Manresa), was probably related to incomplete degradation of highly ethoxylated NPs by SPT treatment.

BPA is a polar monomer of polycarbonate plastic, used in canned foods, as well as in epoxy resins, flame retardants and many other products. According to Krishnan et al. (1993), BPA is considered with estrogenic activity from 2 $\mu\text{g l}^{-1}$. In STPs influent waters, BPA levels exceeded this value only in STP C and were only marginal, if detected, in effluent waters.

DEHP and DEP constituted the most frequently found phthalates found in wastewaters, coinciding with their widespread use (Jara et al., 2000). The higher levels were detected in STP C influents (8.86 $\mu\text{g l}^{-1}$ of DBP) and in STP B (12.9 and 10.2 $\mu\text{g l}^{-1}$ of DEP). Whereas DBP was eliminated during STP treatment, DEP and DEHP were apparently unaffected by STP processing (Table 1). Concentrations of two other phthalates,

DMP and BPP, were below detection limits in all analysed samples (data not shown).

3.3. Estrogenicity levels in surface waters and STP water samples

Surface water samples analysed by RYA showed very weak estrogenic activity (less than 0.5 ng l^{-1} E2 eq) in all sampling sites, except for sites 9 and 10, which showed estrogenicity values above 1 ng l^{-1} E2 eq (Fig. 4). This pattern of accumulation of estrogenic activity at the lower course of the Llobregat River (Fig. 1) agrees with the high NP and OP concentrations found in the same area (Table 1); the correlation between chemical data and RYA data will be discussed below. The RYA also showed high estrogenic values (0.8–4.2 ng l^{-1} E2 eq) in STP influent water samples (Fig. 4, Table 2). Most (70–90%) estrogenic activity appeared to be removed by STP treatment (Table 2). Comparing the residual levels of estrogenic activity in effluents to the values obtained for surface water samples from nearby sites, we concluded that the contribution of STP effluents to the total estrogenicity of river samples were relatively low or nil.

Estrogenic activity of complex samples could be regarded as the sum of the individual contributions of the compounds present in them. Under this point of view, total estrogenicity of a given sample could be predicted from a linear combination of the concentrations of the different EDCs, being the weight for each compound its intrinsic estrogenic activity, as calculated in Céspedes et al. (2004). The results of such a calculation compared to the actual RYA values are shown in Fig. 4 (two lower panels) and Fig. 5. From these figures, it is evident that the predicted and actual estrogenicity values followed very similar patterns, both in respect to the increasing estrogenic activity at the lower course of the Llobregat River and in the rates of removal of estrogenic compounds in STPs. The latter could be observed in Table 2, in which total estrogenicity (both calculated and predicted) from influent and effluent samples are compared.

Data in Fig. 4 and Table 2 show that total estrogenicity calculated from chemical composition of the samples overestimated the actual RYA values by a factor of approximately three, on average. This correlation is

Table 2
Endocrine disruptor loads in ng l^{-1} estradiol equivalents in SPT influent and effluent waters

EDAR	From RYA			From LC-ESI-MS		
	Influent	Effluent	% in effluent	Influent	Effluent	% in effluent
Manresa (A)	2.39 ± 0.31	0.20 ± 0.03	8.49	8.96	1.66	18.57
Terrassa (B)	0.89 ± 0.09	0.25 ± 0.04	27.52	14.99	0.61	4.09
Igualada (C)	1.58 ± 0.46	0.19 ± 0.03	12.12	22.78	0.65	2.87
Martorell (D)	4.43 ± 1.34	0.29 ± 0.04	6.64	6.10	0.47	7.63

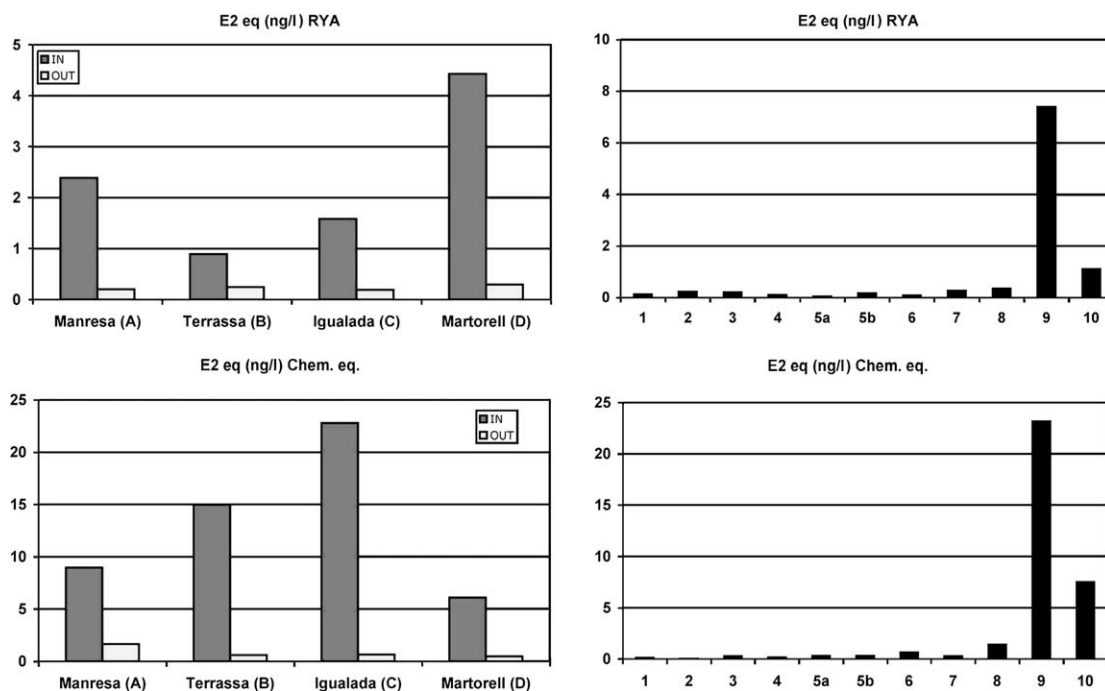


Fig. 4. Total estrogenicity values in estradiol equivalents for STP (left) and river water (right) samples. The two top panels correspond to actual values from RYA; bottom panel correspond to estrogenicity values calculated from LC-ESI-MS analysis. In the two left panes, dark and light grey bars correspond to influent and effluent waters for each STP, respectively.

better observed in Fig. 5, which shows the quasi-linear correlation ($y = 3.17x^{1.16}$, $r^2 = 0.62$) between the E2 eq values calculated from RYA and the values predicted from the chemical composition of the samples. It also shows a similar factor (3.17) between the two sets of data. A suitable explanation for this overestimation of the predicted estrogenicity values is that estradiol equivalents were obtained for the most estrogenic alkylphenol isomers, the para- isomers (Céspedes et al., 2004). However, actual samples contained most probably technical mixtures of alkylphenol isomers, which are undistinguishable by LC-ESI-MS. Due to its abundance

(Fig. 3, Table 1) and to its relatively strong intrinsic estrogenicity (Table 1; Céspedes et al., 2004), NP contributes to more than 90% to the predicted estrogenicity levels in most analysed samples. This was especially significant in samples with high estrogenicity loads (data not shown). Therefore, the presence of non-active isomers would result in an overestimation of the total estrogenicity of the sample.

4. General discussion

The integration of chemical and biological analysis permitted to detect the estrogenicity of the samples collected along the Llobregat River, and to identify and to quantify major compounds causing this effect. The estrogenic activity observed in waters was mainly attributed to the presence of NP, with a minor contribution of BPA and NPEO₁. The alkylphenolic compounds were detected at 0.1–37.3 $\mu\text{g l}^{-1}$ in surface waters and to 44.8 $\mu\text{g l}^{-1}$ in wastewaters. The highest levels of nonylphenolic compounds were generally found in STP and in the lower course of the river, especially in the Riera de Rubí, the most contaminated site (site 9).

As a first approach to compare chemical analysis with estrogenicity tests, the analytical method used in this work excluded the analysis of estrogenic compounds

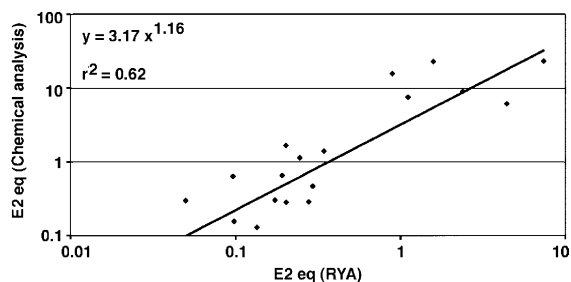


Fig. 5. Correlation between total estrogenicity values (in E2 eq) obtained from RYA (X-axis) and predicted from the chemical composition of the samples (Y-axis). Note the logarithmic scales and the power regression.

associated to the particulate fraction. However, future works will include the particulate fraction of the sample when a significant fraction of estrogenic compounds is suspected to adsorb to it, such as chlorinated compounds with high octanol–water partition coefficients.

The results shown in this paper indicated that the 4 STPs situated in the river efficiently control urban discharges, eliminating the main load of organic compounds, and that their contribution to the total estrogenicity values of river samples was relatively low. It is revealing that river samples near STPs showed total estrogenicity values that equal or surpassed the values from the discharges of the STP—i.e. the estrogenic activity in the effluent is similar to or lower than the values observed in the receiving surface waters. This underscores the importance of well-managed STPs in the control of the water quality of rivers with very high anthropogenic impact.

Acknowledgements

This work was supported by the Catalan Water Agency contract and by the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain) project BQU2002-10315-E, BMC2001-0246, PPQ2002-04573-C04-03 and SAF2002-00371. Roser Chaler and Dorí Fanjul are thanked for their valuable technical assistance and Jordi Bonet for the work carried out. STP personnel are thanked kindly for collecting the samples. Merck is acknowledged for the gift of the LC columns and the SPE cartridges used in the study.

References

- Ahel, M., Giger, W., Koch, M., 1994. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment—I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Res.* 28, 1131–1142.
- Ahel, M., Schaffner, C., Giger, W., 1996. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment—III. Occurrence and elimination of their persistent metabolites during infiltration of river water to groundwater. *Water Res.* 30, 37–46.
- Castillo, M., Martínez, E., Ginebreda, A., Tirapu, L., Barceló, D., 2000. Determination of non-ionic surfactants and polar degradation products in influent and effluent water samples and sludges of sewage treatment plants by a generic solid-phase extraction protocol. *Analyst* 125, 1733–1739.
- Céspedes, R., Petrovic, M., Raldúa, D., Saura, U., Piña, B., Lacorte, S., Viana, P., Barceló, D., 2004. Integrated protocol for the determination of endocrine disrupting activity in the surface waters and sediments using biological techniques by recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 697–708.
- Colborn, T., 1995. Environmental estrogens: health implications for humans and wildlife. *Environ. Health Perspect.* 103 (Suppl. 7), 135–136.
- Colborn, T., vom Saal, F.S., Soto, A.M., 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 101, 378–384.
- Eichhorn, P., Petrovic, M., Barceló, D., Knepper, T., 2000. Fate of surfactants and their metabolites in waste water treatment plants. *Vom Wasser* 95, 245–268.
- European Commission, 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000. Commission of the European Communities, Brussels.
- García-Reyero, N., Grau, E., Castillo, M., López de Alda, M., Barceló, D., Piña, B., 2001. Monitoring of endocrine disruptors in surface waters by the yeast recombinant assay. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1152–1158.
- Jara, S., Lysebo, C., Greibrokk, T., Lundanes, E., 2000. Determination of phthalates in water samples using polystyrene solid-phase extraction and liquid chromatography quantification. *Anal. Chim. Acta* 407, 165–171.
- Jobling, S., Sumpter, J., 1993. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic on fish: an in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* 27, 361–372.
- Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M., Sumpter, J., 1995. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ. Health Perspect.* 103, 582–587.
- Krishnan, A.V., Stathis, P., Permuth, S.F., Tokes, L., Feldman, D., 1993. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132, 2279–2286.
- Laganá, A., Bacaloni, A., De Leva, I., Faberi, A., Fago, G., Marino, A., 2004. Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Anal. Chim. Acta* 501, 79–88.
- Latorre, A., Lacorte, S., Barceló, D., 2002. Presence of nonylphenol, octylphenol and bisphenol a in two aquifers close to agricultural, industrial and urban areas. *Chromatographia* 57, 111–116.
- Petrovic, M., Barceló, D., 2000. The stability of non-ionic surfactants and linear alkylbenzene sulfonates in a water matrix and on solid-phase extraction cartridges. *Fresenius J. Anal. Chem.* 368, 676–683.
- Petrovic, M., Solé, M., López de Alda, M., Barceló, D., 2002a. Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters and sediments: integration of chemical analysis and biological effects in feral carp. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2146–2156.
- Petrovic, M., Rodríguez Fernández-Alba, A., Borull, F., Marce, R., González Mazo, E., Barceló, D., 2002b. Occurrence and distribution of nonionic surfactants, their degradation products, and linear alkylbenzene sulfonates in coastal waters and sediments in Spain. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 37–46.
- Purdum, C.E., Hardiman, P.A., Bye, V.J., Eno, N.C., Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.* 8, 275–285.
- Routledge, E.J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G.C., Waldock, M., Sumpter, J.P., 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1559–1565.

- Solé, M., López de Alda, M.J., Castillo, M., Porte, C., Ladegaard-Pedersen, K., Barceló, D., 2000. Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from the Catalonian area (NE Spain). *Environ. Sci. Technol.* 34, 5076–5083.
- Sonnenschein, C., Soto, A.M., 1998. An update review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 65, 143–150.
- Soto, A.M., Justicia, H., Wray, J.W., Sonnenschein, C., 1991. *p*-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from “modified” polystyrene. *Environ. Health Perspect.* 92, 167–173.
- Van den Belt, K., Berckmans, P., Vangenechten, C., Verheyen, R., Witters, H., 2004. Comparative study on the in vitro/in vivo estrogenic potencies of 17beta-estradiol, estrone, 17alpha-ethynylestradiol and nonylphenol. *Aquat. Toxicol.* 66, 183–195.
- Yin, G.G., Kookana, R.S., Ru, Y.J., 2002. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environ. Int.* 28, 545–551.

5.2.2. Estudios realizados en la cuenca del Río Ter

En el Programa de vigilancia ambiental de la cuenca del río Ter, se realizaron dos estudios:

2) Artículo científico: “*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.

Este estudio se combinó el análisis mediante LC-MS para determinar las concentraciones presentes de cada contaminante estudiado en las muestras y el ensayo RYA descrito en el capítulo 2 de la memoria (artículo Céspedes y col., 2004) para evaluar el potencial de actividad estrogénica presente en las muestras tomadas a lo largo de la cuenca del río Ter. Se estudiaron 9 puntos de aguas superficiales y 8 de aguas residuales, correspondientes a los influentes y efluentes de 4 EDARs).

Los objetivos de este estudio fueron los siguientes:

- i) determinar la presencia y niveles de los EDCs seleccionados a lo largo de la cuenca del río Ter
- ii) evaluar la distribución, transporte y comportamiento de estos contaminantes en el río
- iii) determinar si la concentración de EDCs presente en las muestras puede explicar la estrogénicidad detectada mediante el ensayo RYA en las muestras,
- iv) determinar si las EDARs estudiadas son eficaces eliminando los EDCs estudiados.

3) Artículo científico: “*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.

Se llevó a cabo el estudio de la presencia y distribución de compuestos alquilfenólicos entre la fase disuelta (agua) y la fracción particulada (filtros) en depuradoras y aguas superficiales de la cuenca del río Ter, se analizaron las muestras de agua correspondientes a las aguas superficiales de la cuenca del río Ter, los afluentes y efluentes de 4 EDARs en su cuenca.

Los objetivos de este estudio fueron los siguientes

- i) establecer un método adaptado a la determinación de los compuestos alquilfenólicos APs, APEOs de cadena corta (NPE₁O, NPE₂O) y cadena larga(NPE₃₋₁₅O).
- ii) estudiar la distribución de los 5 EDCs objeto de estudio (APs y APEOs) entre la fase disuelta y la particulada, incluyendo las entradas y efluentes de las EDARs
- iii) evaluar la eficacia de las EDARs estudiadas en la eliminación de estos compuestos y estimar la acumulación de estos compuestos en fangos.

La integración de análisis químico y biológico y la determinación de la concentración total de las muestras mediante el análisis de la fracción disuelta y particulada en la cuenca del río Ter permite llevar a cabo un estudio más completo del comportamiento y niveles de los compuestos alquilfenólicos.

Artículo científico número 8:

“Chemical monitoring and occurrence of alkyl phenols, alkylphenol ethoxylates, alcohol ethoxylates, phthalates and benzothiazoles in sewage treatment plants and receiving waters along the Ter River basin (Catalonia, N.E. Spain)”.

R. Céspedes, S. Lacorte, A. Ginebreda, D. Barceló

Analytical and Bioanalytical Chemistry. Vol. 385(2006) 992-1000.

Raquel Céspedes · Sílvia Lacorte · Antonio Ginebreda ·
Damià Barceló

Chemical monitoring and occurrence of alkylphenols, alkylphenol ethoxylates, alcohol ethoxylates, phthalates and benzothiazoles in sewage treatment plants and receiving waters along the Ter River basin (Catalonia, N. E. Spain)

Received: 2 January 2006 / Revised: 24 March 2006 / Accepted: 27 March 2006 / Published online: 21 June 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract This study presents a quantitative estimation of the analysis and fate of several emerging pollutants, some of them endocrine-disrupting compounds, in surface water samples collected at several locations along the Ter River and two of its tributaries. Influent and effluent waters and particulate matter from five sewage treatment plants (STP) that discharge into these rivers were also studied. The target compounds analyzed were: nonylphenol ethoxylates (NPEO), nonylphenol (NP), octylphenol (OP), bisphenol A (BPA), phthalates, alcohol ethoxylates (AEO) and benzothiazoles. Chemical analysis by liquid chromatography–mass spectrometry using an electrospray interface (LC–ESI–MS) revealed the presence of low amounts (between 0.06 and 17.5 $\mu\text{g L}^{-1}$) of the target compounds NPE₁₊₂O and NP, which were detected in 100% and 84% of the samples respectively. Maximum concentrations occurred in the STPs associated with the municipalities of Vic and Girona. From the fate and behavior data obtained for the various compounds analyzed in the STP influent and effluent, we can conclude that the STPs are effective at removing large amounts (more than 70%) of the compounds studied from the water.

Keywords Liquid chromatography–mass spectrometry · Surface water · Waste water · Endocrine-disrupting compounds

R. Céspedes · S. Lacorte (✉) · D. Barceló
Department of Environmental Chemistry, IIQAB-CSIC,
Jordi Girona 18-26,
08034 Barcelona, Catalonia, Spain
e-mail: slbqam@cid.csic.es

A. Ginebreda
Catalan Water Agency (Agència Catalana de l'Aigua),
Department of Environmental Affairs,
Generalitat de Catalunya,
Provença 204,
08036 Barcelona, Catalonia, Spain

Introduction

The Ter River is 208 km long, with a 3010 km² of basin surface. It originates in the middle of the Catalan Pyrenees, at an altitude of 2400 m in an ancient glacier area, passes through Girona, and empties into the Mediterranean Sea. The Ter is a river of medium flow (annual medium flow 840 m³ h⁻¹). The Mediterranean influence determines the rain pattern over most of the basin, which is characterized by maximum rainfall in the fall and spring [1], which results in maximum water flow in the spring (during the thaw period). However, in the middle and low courses, the river is influenced by its tributaries [1]. The Ter river basin is characterized by a low population density, with a total of 419,954 inhabitants in 2001 [1]; Girona and Vic are the most populous of the sites analyzed. This river supplies 55% of the raw water used for drinking purposes in Barcelona and surroundings [2]. In terms of the use of the river water, 53% of the total water is assigned to agricultural irrigation and golf courses, 24% to domestic use, and the rest is for industrial (17%) and livestock farmer (7%) use [1]. Besides being a predominantly agricultural basin [3], the Ter River receives discharges from the metallurgic, pulp mill, textile and tannery industries. As a result of the discharge of urban and industrial waters and agricultural runoff, alkylphenols, alkylphenol ethoxylates, aliphatic and aromatic hydrocarbons, fatty acids, plasticizers, alkylbenzenes and pesticides have been detected in the river water [2, 3]. To reduce the input of contaminants to rivers and to improve the quality of the water, STPs have been installed in cities of more than 15,000 IE (inhabitant equivalent). However, despite this, alkylphenolic compounds still occur widely in Catalan (NE Spain) rivers, at levels from 0.01 to 80 $\mu\text{g L}^{-1}$ for NP and at up to 843 for NPEOs in STPs [4–8].

To evaluate the role of the STPs in terms of its impact on receiving waters, the following compounds have been studied: non_ionic surfactants (alkylphenol ethoxylates) and their degradation products (alkylphenols); alcohol ethoxylates (AEOs), used as adjuvants in pesticide

formulations and often used as an alternative to APEOs; plasticizers like bisphenol A (BPA), polycarbonate monomer, phthalates, used mainly as plasticizers; and benzothiazoles (BT), ascribed to the tire and rubber manufacturing industry. All of these compounds are discharged into surface waters from industrial and urban processes. Aside from benzothiazoles, DMP, DEP and AEOs, these compounds are considered endocrine-disrupting compounds (EDCs) [9–12], and when present at a certain concentration they may affect aquatic biota by mimicking or counteracting natural hormones [13–16]. Thus, the occurrence and concentration of non-natural EDCs is an excellent marker of human impact and a good indicator of water quality, as indicated by regulatory agencies (EU and US EPA) [17]. In addition, since the quality of surface water is directly influenced by STP effluents, effort is being expended to determine the organic pollutants in STP influents and effluents and downstream waters. In this respect, the Urban Waste Water Treatment Directive 91/271/EC [18] indicates that all EU wastewater will

have to be properly collected and subjected to secondary treatment (biological, with secondary settlement) before being discharged into the environment to eliminate the input of potentially active estrogenic compounds [18].

Previous studies have indicated that sewage treatment plant effluents appear to be one of the major routes by which EDCs are released into natural waters [19, 20]. The presence of EDCs in surface waters and sediments has been primarily attributed to their incomplete removal in the sewage treatment process [20, 21] and to the degradation products generated from the APEOs, such as alkylphenols and short-chain APEOs [10]. Therefore, it is necessary to determine whether the EDCs are brought into the aquatic environment via wastewater at levels that could be harmful to aquatic life, and to assess STP efficiency at removing EDCs from wastewater effluent.

Some of the compounds studied, like NP and OP, are included in the priority list of 32 substances of the European Water Framework Directive (WFD) 2000/60/EC [22], whose main objective is to prevent and avoid water

Table 1 Compounds analyzed, with their corresponding molecular weight (M_w) values, ionization modes, main m/z values, recoveries, detection limits of the method (LOD, $\mu\text{g L}^{-1}$) and the instrument (IDL, ng) and quantification limits (IQL, ng)

Compound	M_w	Ionization mode	m/z ion	Recovery ($n=6$)	% RSD	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	IDL (ng)	IQL (ng)
Alkylphenolic compounds								
NPE _n O-nonylphenol ethoxylates	264	PI	287 [M+Na] ⁺ , $n_{\text{EO}}=1$	78	6	0.12	0.39	0.66
NP-nonylphenol	308	PI	331 [M+Na] ⁺ , $n_{\text{EO}}=2$	102	12	0.06	0.25	0.42
OP-octylphenol	220	NI	219 [M-H] ⁻	91	4	0.07	1.46	4.73
	206	NI	205 [M-H] ⁻	86	2.1	0.06	0.45	3.61
Biphenolic compounds								
BPA-bisphenol A	228	NI	227 [M-H] ⁻	90	7	0.05	0.82	1.37
Alcohol ethoxylates								
AEO-alcohol ethoxylates	230	PI	253 ($\Delta 44$)* [M+Na] ⁺ , C ₁₂ EO	89	5	0.04	5.02	8.37
	258	PI	281 ($\Delta 44$)* [M+Na] ⁺ , C ₁₄ EO	84	4	0.05	7.42	12.37
	287	PI	310 ($\Delta 44$)* [M+Na] ⁺ , C ₁₆ EO	78	11	0.09	4.59	7.66
Benzothiazoles								
BT-benzothiazole	135	PI	293 [2M+Na] ⁺	62	14	0.1	3.92	6.53
OHBT-2-hydroxybenzothiazole	151	NI	150 [M-H] ⁻	81	6	0.01	0.25	0.42
MTBT-2-methylthiobenzothiazole	181	PI	182 [M+H] ⁺	64	13	0.01	0.07	0.12
Phthalates								
DMP-dimethylphthalate	194	PI	217 [M+Na] ⁺ , 411 [2M+Na] ⁺	83	12	0.11	0.40	0.66
DEP-diethylphthalate	222	PI	245 [M+Na] ⁺ , 467 [2M+Na] ⁺	87	14	0.01	0.04	0.06
DBP-dibutylphthalate	278	PI	301 [M+Na] ⁺ , 579 [2M+Na] ⁺	91	10	0.03	0.06	0.12
DEHP-di(2-ethylhexyl) phthalate	390.5	PI	413.5 [M+Na] ⁺ , 804 [2M+Na] ⁺	90	11	0.07	0.06	0.12

($\Delta 44$)*=mass differences of $m/z=44$ (equidistant signals relative to the various ethoxylated oligomers)

contamination at the European Union (EU) level [22]. NP and OP are also included in the US EPA priority pollutant list [23].

EDCs usually exert their effects in the environment at low concentrations, so a trace-level analytical method is usually needed. A number of analytical methods have been

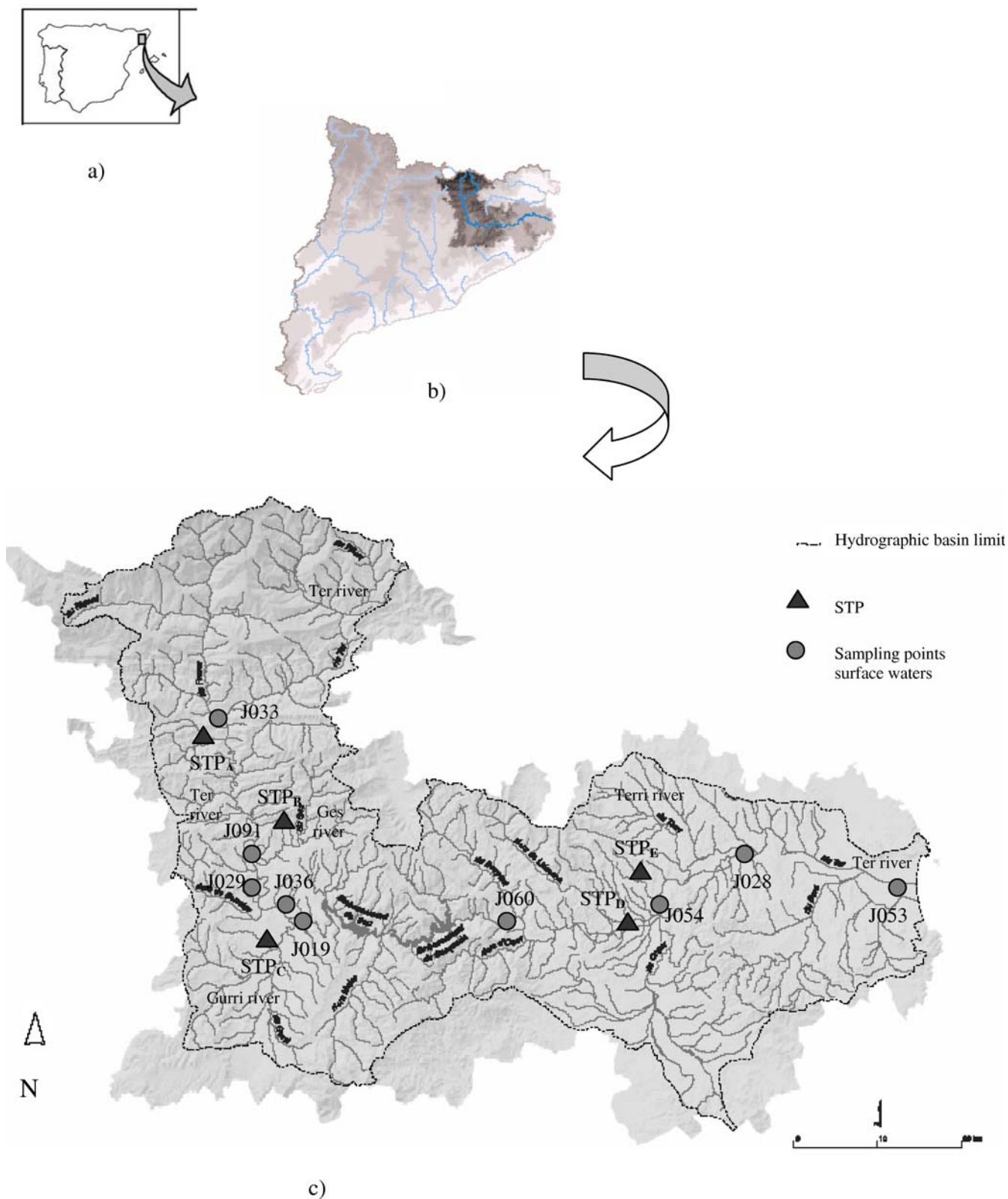


Fig. 1 Map of the Ter River basin (c) situated in Catalonia (b) (NE of Spain (a)), with the corresponding rivers and tributaries as well as the sampling points and STP locations indicated

reported in the literature for analyzing EDCs in environmental waters [24]. However, the methods developed usually focus on families or groups of chemicals, not on a large number of compounds with estrogenic activity (which usually belong to different families).

The purpose of this work was to perform chemical analysis in order to establish whether several organic pollutants with endocrine-disrupting properties or toxicants (benzothiazoles) are present in river waters, influents and effluents from five STPs that discharge into the Ter River, to evaluate the distributions, transport and fate of these pollutants in the river, and especially to evaluate the role and efficiency of STPs in relation to the removal of these compounds from wastewater effluents. For this purpose, solid phase extraction (SPE) followed by LC-ESI-MS was used for the unequivocal identification of different compound classes of pollutants at the low $\mu\text{g L}^{-1}$ level.

Materials and methods

Chemicals and reagents

The standards used in this study were nonylphenol mono and diethoxylate (NP₁EO: NP₂EO), laboratory-synthesized by AGBAR (Barcelona, Spain). Technical mixtures of alcohol ethoxylates and nonylphenol ethoxylates—Findet 9Q/22 (which contains chain isomers and oligomers)—were purchased from Kao Corporation (Barcelona, Spain). Therefore, all of the individual ethoxylated surfactants do not correspond to a pure standard, but rather to a mix of substances with an average number of ethoxy units. High-purity standards of phthalate esters (99%), benzothiazoles, bisphenol A (BPA, 99%) 4-*tert*-octylphenol (OP, 98% pure), technical-grade 4-nonylphenol (NP, 98%) and high-purity (98%) 4-heptylphenol (used as the internal standard) were all obtained from Aldrich (Milwaukee, WI, USA). The phthalates and benzothiazoles analyzed in this study (see Table 1) were respectively dimethyl phthalate (DMP), diethyl phthalate (DEP) and dibutyl phthalate (DBP), benzothiazole (BT, 96%), 2-methylthiobenzothiazole (MTBT, pure) and 2-hydroxybenzothiazole (OHBT, 98%). The internal standard bis(2-ethylhexyl)phthalate (ring-D₄, 98% purity) was purchased from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA). 4n-NP, used as a surrogate (99.5% pure) was acquired from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany).

Standard solutions of each compound and standard mixtures were prepared at $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ in methanol and stored at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Working standard solutions were obtained by further dilution of these solutions in methanol.

HPLC-grade solvents (water, methanol, acetonitrile, acetone and dichloromethane) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Analytical-grade sodium acetate was purchased from Panreac (Barcelona, Spain).

Sampling

River water samples were collected in March 2001 at nine points distributed along the Ter basin (Catalonia, NE Spain), including the Terri and Gurri tributaries (Fig. 1). In addition, influent and effluent wastewaters from five sewage treatment plants (STP) discharging into the Ter River were also collected.

The STP plants studied were Ripoll (STP_A), Torelló (STP_B), Vic (STP_C), Girona (STP_D) and Banyoles (STP_E); they perform a combination of primary and secondary treatments (which consist of a biological treatment and secondary settlement). All of the STPs studied had undergone additional nitrogen elimination treatment, with the exception of STP_D. Ripoll, STP_A, receives mainly domestic effluent and 30–40% of industrial effluent from several textile and tannery industries. The flow capacities of the different plants are higher for STP_D, STP_C and STP_E, which receive 40,000, 35,000 and 14,000 m^3 per day respectively, whereas STP_A and STP_B have a lower capacity, receiving only 9,000 and 6,000 m^3 per day. The flow rates of these STPs vary between 210 and 1900 $\text{m}^3 \text{h}^{-1}$; Ripoll and Torelló have the lowest values (~ 325 and $210 \text{ m}^3 \text{h}^{-1}$ respectively). The distance between the discharge point in the urban area and the sampling point varied from 15 to 34 km. These plants are routinely controlled by the Water Authority (Catalan Water Agency).

Water samples were collected in Pyrex borosilicate amber bottles. Each bottle was rinsed with tap water and with high-purity water prior to sampling. Influent and effluent waters were collected as 24 h flow-based composite samples. Samples were stored and transported at $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Upon arrival to the laboratory, surface waters were filtered through $0.45 \mu\text{m}$ -pore size HVLP filters (Millipore, Bedford, MA, USA), whereas waste waters were filtered first through $1 \mu\text{m}$ -pore size and then through 0.7 and $0.45 \mu\text{m}$ HVLP filters. The particulate material retained was washed with 10 mL of methanol, which was collected in a flask, evaporated and reconstituted. This extract was injected separately and the concentrations reported are the sum of the dissolved and particulate phases. All of the glass material (vials, bottles and volumetric material) was carefully cleaned with methanol to avoid contamination problems. Finally, the waters were stored at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ in the dark for a maximum of two days.

Sample extraction procedure

Before sample extraction, linear 4n-nonylphenol was added at a concentration of $1 \mu\text{g L}^{-1}$ as a surrogate (in environmental samples we detected branched 4n-NP).

Filtered samples were preconcentrated upon Lichrolut RP-18 (500 mg, 6 mL) cartridges (Merck, Darmstadt, Germany) using an ASPEC XL (Gilson, Villiers-le-Bel, France) automated SPE sampler processor (automated sample preparation with extraction columns), fitted with an 817 switching device and an external 306 LC pump for selection and dispensing of samples respectively (all from Gilson Villiers-

le-Bel, France). SPE cartridges were conditioned by passing 7 mL of methanol and 3 mL of HPLC-grade water through the cartridge at a flow rate of 3 mL min⁻¹. Five hundred milliliters (surface water), 100 mL (influent) or 200 mL (effluents) of filtered water sample were percolated through the cartridge at a flow rate of 5 mL min⁻¹. After preconcentration, the sorbent was dried for 30 min using a Baker LSE 12G apparatus (J.T. Baker, Deventer, Netherlands) connected to a vacuum system set at -15 psi. SPE cartridges were stored at -20 °C until analysis [25].

The elution step was performed by passing through 2×5 mL of MeOH : CH₂Cl₂ (9:1) (5 min delay between them). After elution, the extracts were evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen, and then the extract was reconstituted with methanol to a final volume of 300 µL prior to analysis. Internal standards (4-HP for NI and DEHP-d₄ for PI) were added at a concentration of 1 µg mL⁻¹ to the final extracts. Samples were stored at -20 °C prior to the analysis. Finally, 20 µL of each sample were injected into the LC system.

LC-MS analysis

Chromatographic and analytical conditions (LC-MS)

HPLC-MS was performed with an HP 1100 autosampler fitted with a 100 µL loop and an HP 1090 A LC binary pump from Hewlett Packard (Palo Alto, CA, USA). The analytical protocol followed is detailed elsewhere [25]. Briefly, it consists of an HPLC separation with a 5 µm, 250×4 mm i. d. C₁₈ reversed-phase column (LiChrospher 100 RP-18) preceded by a guard column (4×4 mm i.d., 5 µm) of the same packing material from Merck (Darmstadt, Germany). Table 1 shows all of the target compounds analyzed in this study with their ionization modes, the *m/z* ratios used for quantification and the quality parameters obtained. To quantify them, it was necessary to perform two analyses for each sample. Thus, APEOs, phthalates and BT and MTBT were detected with the ESI interface operating in the positive ionization (PI) mode, which produced [M+Na]⁺, whereas APs, BPA, AEOs and OHBT were detected in the negative ionization (NI) mode, which produced [M-H]⁻. The mixtures of polyethoxylated surfactants yield characteristic patterns that contain the [M+H]⁺ ion for each compound and equidistant signals with mass differences of *m/z*=+44 relative to the various ethoxylated oligomers [31]. Therefore, the intense ions that could be observed in the spectra are equally spaced ($\Delta m/z$ 44). The separation was performed at 1 mL min⁻¹ using methanol (A) and HPLC water (B) in PI mode, and acetonitrile (A) and water (B) in NI mode. In PI mode, gradient elution was from 30% A (3 min) to 80% A in 10 min, then to 90% A in 5 min, then it was kept isocratic for 15 min, then to 100% A in 10 min and then it was kept isocratic for 10 min. The gradient elution for the NI mode started with 30% A, then to 60% A in 15 min, then to 70% in 5 min, then to 90% in 10 min and back to initial conditions in 3 min, and then it was kept isocratic for

5 min. The extraction voltage used in both the positive (PI) and negative ionization (NI) modes was 90 V. Detection was carried out using an HP 1040 M diode array UV-Vis detector coupled in series to an LC-MSD HP 1100 mass-selective detector, equipped with an electrospray (ESI) interface. Acquisition was performed simultaneously: 50% in selected ion monitoring (SIM) and 50% in full-scan mode. We used this facility of the HP 1100 to quantify and confirm the presence of target compounds.

Quantitation Quantitative analysis was performed in selected ion monitoring (SIM) mode using external standard calibration. A series of injections of target compounds in the concentration range from 50 ng mL⁻¹ to 25 µg mL⁻¹ was used to obtain the calibration equation. Calibration curves were generated using linear regression analysis and they gave good fits (*r*²>0.990). Confirmation criteria involved analysis in full scan mode, and mass spectra and retention times were compared with those obtained from injecting a pure standard solution. The internal standards were used for process control, in order to check the performance of the MS in the NI and PI modes respectively. Thus, 4-HP was used in NI mode, whereas DEHP-d₄ was used in PI mode. A method blank was included in every analytical series, since almost all laboratory materials (solvents, glassware and chemicals) could contain phthalates [26].

Quality parameters were determined for every compound (see Table 1). Briefly, the detection limits (LOD) were calculated in SIM mode using a signal-to-noise ratio of 3 (S/N=3). The instrumental detection (IDL) and quantification (IQL) limits were also determined (using an S/N of 3 and 5 respectively). The recoveries and overall method reproducibility were determined in distilled water (*n*=6) spiked with the standard mixture to a final concentration of 10 µg L⁻¹. Values obtained ranged from 62 to 102%.

Results and discussion

Main characteristics of the Ter River basin: global concentration levels

Whereas industrial activity predominates in the upper course of the river, in the medium-to-lower course there are traditional agricultural and urban activities. Between STP_B and STP_C, two tributaries contribute to the Ter River flow, the Ges river with levels of A₁₄EO at 10.6 µg L⁻¹ and the stream of Riera de Sorreig. After STP_C, the Gurri tributary, with associated industrial activity, constitutes the most important point source of pollution, with levels of NPE₁O+NPE₂O, NP and DEP that are slightly higher (3.33, 1.32 and 2.83 µg L⁻¹ respectively) than the others detected in surface waters (see Table 2). At the confluence of the Ter River with the Riera de Sorreig and Gurri rivers, the conductivity is higher, showing a higher level of salinity [1]. The Sau-Susqueda reservoir acts as a natural purifying system and the levels of NP downstream were lower.

Table 2 Concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$) of alkylphenols, bisphenol A, nonylphenol ethoxylates, alcohol ethoxylates, phthalates and benzothiazoles analyzed

Sample code	River/STP	OP	NP	BPA	NPE ₍₁₊₂₎ O	A ₁₂ EO	A ₁₄ EO	DEP	DBP	MTBT	OHBT
J033	Ter	<0.06	<0.07	<0.05	1.61	2.09	1.43	9.77	2.39	<0.01	<0.01
STP _A Inf.	Ripoll	<0.06	<0.07	0.07	1.47	2.18	17.3	16.2	<0.03	0.09	<0.01
STP _A Eff.	Ripoll	0.16	0.51	0.07	3.85	1.22	0.77	<0.01	<0.03	0.09	<0.01
STP _B Inf.	Torelló	3.98	7.23	0.10	7.97	5.24	2.33	3.67	<0.03	0.34	0.09
STP _B Eff.	Torelló	0.13	0.38	0.07	4.98	0.26	0.28	<0.01	<0.03	0.32	<0.01
J091	Ges	0.24	0.26	<0.05	0.66	1.41	10.6	0.15	<0.03	<0.01	0.04
J029	R ^a Sorreig	0.10	0.32	<0.05	0.84	3.66	1.82	<0.01	<0.03	0.24	<0.01
STP _C Inf.	Vic	1.94	17.5	0.06	8.19	12.3	16.1	<0.01	<0.03	12.8	<0.01
STP _C Eff.	Vic	<0.06	2.07	<0.05	3.63	0.48	<0.05	<0.01	<0.03	1.25	0.15
J036	Gurri	0.52	1.32	<0.05	3.33	0.54	1.34	2.83	<0.03	1.12	0.17
J019	Ter	0.39	0.28	<0.05	0.98	2.91	0.28	<0.01	0.29	0.06	<0.01
J060	Ter	0.26	0.10	<0.05	1.59	0.37	0.79	7.97	0.47	<0.01	0.01
STP _D Inf.	Girona	3.16	5.59	1.51	10.3	<0.04	<0.05	<0.01	<0.03	<0.01	<0.01
STP _D Eff.	Girona	0.32	1.42	0.27	3.81	1.10	<0.05	13.3	2.78	0.29	<0.01
J054	Ter	0.48	0.23	<0.05	3.00	0.79	3.98	<0.01	<0.03	0.23	<0.01
STP _E Inf.	Banyoles	1.26	10.4	<0.05	5.41	<0.04	19.4	9.08	<0.03	3.01	<0.01
STP _E Eff.	Banyoles	0.33	0.33	<0.05	4.45	1.21	4.22	2.64	0.68	6.18	0.07
J028	Terri	0.16	0.30	<0.05	1.76	5.56	2.37	<0.01	<0.03	<0.01	<0.01
J053	Ter	<0.06	<0.07	<0.05	0.93	1.12	0.78	4.59	<0.03	<0.01	0.08
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)		0.06	0.07	0.05	0.06	0.04	0.05	0.01	0.03	0.01	0.01
Positive samples (%)		79	84	37	100	90	84	53	26	68	37

However, a previous study [2] indicated that the main pollutant in Sau water was NP, and both ethoxylated nonylphenols were detected in the sediments; these can be transported, depending on the climatic and environmental conditions, owing to their solubility [2].

Occurrence of target compounds in sewage treatment plants and in receiving waters

Table 2 shows the concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$) of the target compounds from source to mouth (including those solvated and corresponding particulate matter), as well as the corresponding detection limits. Concentrations ranged from 0.01 to 19.4 $\mu\text{g L}^{-1}$. DMP and BzT were not detected. All of the samples analyzed contained traces of at least five target compounds. The most ubiquitous compounds detected in the waters were NPE₁₊₂O, detected in all of the samples with concentrations between 0.66 and 10.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ inclusive, followed by NP (84%), AE₁₂₋₁₄O (90–84%), OP (79%), MTBT (68%), and DEP (53%). The higher levels detected in the river waters correspond to the Gurri river. However, as shown in Table 2, higher levels of contamination were detected mainly in STP influents, while lower values were detected in the effluent, so the STPs do not appear to contribute to the pollution observed in the lower course of the river. All of the STPs studied perform biological treatment with nitrogen elimination, excepting STP_D, which only performs biological treatment, as reflected in its lower removal efficiencies and therefore the higher pollutant levels in its effluent. The nitrogen elimination efficiencies depend strongly on the local

wastewater. The low removal efficiencies of NPE₁₊₂O appear to be due to the fact that NPEO_{n>2} are degraded during the wastewater treatment process, leading to short-chain NPE₁₊₂O with estrogenic activity. Higher concentrations were detected in the influents to STP_C and STP_D, close to urban sites. Specifically, Vic (STP_C), which performs physicochemical and biological treatments with nitrogen elimination, is also located in an industrial area with a long history of agriculture and livestock, including a variety of pig farms.

Behavior, fate and levels of compounds analyzed

The behavior of the EDCs during wastewater treatment processes differs depending on the group of compounds involved. They are determined by their physical and chemical properties and the nature of the treatment process involved [27].

Non-ionic surfactants

Some polar pollutants in wastewaters are not biodegradable or can be biotransformed into persistent and toxic metabolites during their degradation [28], mainly surfactants which are then discharged via wastewater. Their common occurrence in STP waters (particularly NP and NPEO) is certainly due to their extensive domestic and industrial use. As a result, APEOn and NP are found in water and suspended particulate material present in freshwater [4, 6–8, 29], marine and estuarine environments [6,

sediment [30, 31], wastewater [4–8, 32, 33] and fish and water [5, 7, 34, 35].

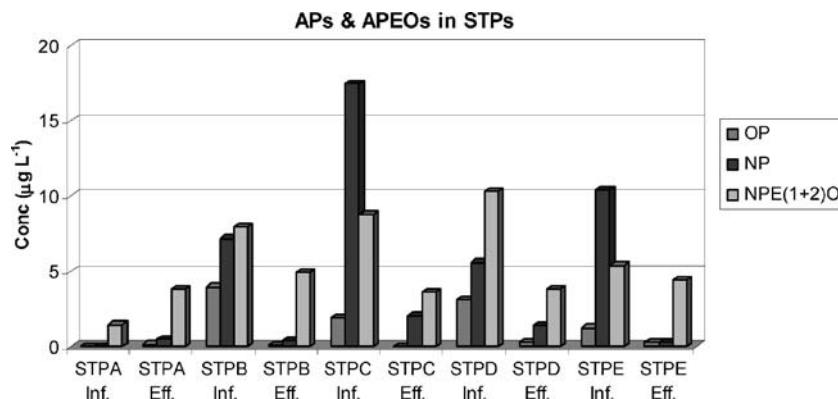
Alkylphenols (APs)

APs basically consist of an alkyl group, which can vary in size and position, attached to a phenolic ring. With $\log K_{ow}$ values ranging from 3.90 to 4.48 (NP), these compounds are lipophilic [27]. In this study, OP was detected in surface waters at levels of 0.10 to 0.52 $\mu\text{g L}^{-1}$, and in wastewaters from 0.13 to 3.98 $\mu\text{g L}^{-1}$. The low levels of OP detected in STP influents (1.26–3.98 $\mu\text{g L}^{-1}$) decreased further in the effluents. The highest levels of NP detected were found in the influents of STP_C followed by STP_E and _B. The influent concentrations (5.59–17.5 $\mu\text{g L}^{-1}$) were substantially reduced (by 75–97%) in the STP effluents.

Alkylphenol ethoxylates (APEs)

APEs are surfactants used for industrial, agricultural and domestic applications [27]. The use of NPEO is being restricted in some countries due to the toxicity of its biodegradation products. However, these surfactants are still often employed in the leather industry due to their effectiveness at removing grease from skins. It is estimated that 60–65% of all alkylphenolic compounds that enter a conventional STP are discharged into the environment, and around 25% of these are alkylphenols [36]. Aerobic conditions better facilitate the further biotransformation of APE metabolites than anaerobic conditions [27]. However, complete de-ethoxylation with the formation of APs has only been observed under anaerobic conditions [37]. The primary degradation of APEs in a conventional STP or in the environment starts with the shortening of the EO chain, leading to short-chain APEs and APs [27]. The metabolites formed with only one (NP₁EO) or two (NP₂EO) ethoxy units and NP are more persistent and more toxic [38] to aquatic organisms than the parent compounds (NP_nEO) [28], since they are considered to be endocrine disruptors [10, 39]. NPE_nO (n>2) have not been included in this study because they are not considered to be estrogenic or toxic [10].

Fig. 2 Concentrations ($\mu\text{g/L}^{-1}$) of OP, NP and NPE₍₁₊₂₎O in the influents and effluents of the STPs analyzed



The concentrations of nonylphenol mono- and diethoxylates are given in Table 2 as NPE₁O plus NPE₂O. Levels detected in STPs ranged from 1.47 to 10.3 $\mu\text{g L}^{-1}$; these are lower than those reported in previous studies in Catalan rivers [4–8]. Figure 2 shows the concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$) of the alkylphenolic compounds analyzed in the effluents and influents of the STPs. The STP_A from Ripoll receives mainly municipal wastewaters, so the influent levels of APs and NPE₁₊₂O were lower than those in the STPs that receive waters from industrial discharges. However, the levels of OP, NP, NPE₁₊₂O and BPA in effluents show a smaller decrease with respect to their influent values than the other STPs analyzed. The increase of NPE₁₊₂O in STP_A effluents indicates that degradation of NPE_nO_{n>2} can occur during the process and that, depending on the hydraulic retention time or the specific treatment conditions, degradation products can resist further elimination.

Alcohol ethoxylates (AEO)

Among other applications, AEOs are employed in pesticide formulations and as spray adjuvants (chemicals added to enhance the effectiveness of the pesticide) [40]. AEOs have been included in this study due to their increased use in recent years, since they are by far the most commonly used substitutes for NPEOs in Europe [41]. The intact surfactants, AEOs and NPEOs, exhibit a similar range of toxicities to aquatic organisms. Unlike NPEOs, biodegradation intermediates of AEOs are less toxic than the parent surfactants [41]. AEOs are used as technical mixtures, so they are not one single compound but a mixture of isomers [42]. Although several studies show that these compounds can persist after biological treatment [41], the AEOs are largely degraded during sewage treatment [42], suggesting that biodegradation is responsible for most of the removal observed [42]. AEO concentrations varied between 0.26–12.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ for A₁₂EO and 0.28–19.4 $\mu\text{g L}^{-1}$ for A₁₄EO, whereas A₁₆EO was only detected in the influent of STP_C and _E. Therefore, the highest values of AEO detected were for STP_C, with 12.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ for A₁₂EO, and for STPs _A, _C and _E (from 16.1 to 19.4 $\mu\text{g L}^{-1}$) for A₁₄EO. Removal rates for the parent surfactants in municipal STPs are similar for AEOs and NPEOs. Thus, they were efficiently removed in the STPs except in the case of A₁₂EO in Ripoll. The highest

level detected in surface waters (in the Ges River) were found after STP_B and C.

Plasticizers

Bisphenol A (BPA)

BPA is a polar monomer of polycarbonate plastic, used in canned foods as well as an intermediate in the synthesis of epoxy resins, flame retardants and many other products [43]. Because of its prolific use, BPA is ubiquitous in the environment [44]. Releases of BPA into the environment mainly occur via wastewater from industrial plants producing plastic products and from landfill sites. It is biodegraded during activated sludge treatment processes [43], so concentrations of BPA are expected to be low [43]. It was not detected in any surface waters, and was only detected in the influents of four STPs at 0.06–1.51 $\mu\text{g L}^{-1}$, and never at levels higher than 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ (the level linked to estrogenic activity) [44].

Phthalates

Phthalates have been in use for nearly 40 years, mainly in the manufacture of PVC and to a lesser extent other resins, as well as in the manufacture of plasticizers for building materials and home furnishings, in food packaging and in insect repellents [45]. Although these esters have since been found in all types of environmental and many biological samples, they are also frequently found in industrial wastewaters. The fate and behavior of phthalate esters (PAEs) in the environment is greatly influenced by the alkyl chain length. Thus, their degradation rate appears to decrease with increasing alkyl chain length because of the corresponding increase in $\log K_{ow}$ (which ranges from 1.46 to 13.1), indicating greater lipophilicity and decreasing solubility [46]. Certain phthalates have also shown estrogenic behavior [47,48]. Phthalates possess low water solubility (3 $\mu\text{g L}^{-1}$) [46] and, when released into the aquatic environment, they tend to adsorb strongly to suspended particles and sediments [48]. As a consequence, DEHP and DEP constitute the most ubiquitous phthalates found in waste waters, which correlates with their widespread use [49].

In our study, DEP was detected in the influents of STP_A and STP_E at concentrations of 16.2 and 9.08 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectively, and in the effluent of STP_D (13.3 $\mu\text{g L}^{-1}$). DBP was detected in surface waters at levels from 0.29 to 2.78 $\mu\text{g L}^{-1}$ and in the effluents of two STPs (D and E), while the levels of DMP and DEHP were below the LOQ of the method.

Benzothiazoles

Benzothiazoles are a class of chemicals produced in large volumes that are employed and subsequently discharged

from various industrial processes, mostly as 2-substituted benzothiazoles [50]. The occurrence of BT in river water has been ascribed mainly to the tire and rubber manufacturing industry [51], where, among other uses, they are employed as vulcanization accelerators or indicators of street runoff. These compounds are also widely employed in the leather and paper production industries as fungicides, where they are used instead of chlorophenols [51]. Their limited biodegradability and potential aquatic toxicity suggest that they are of higher environmental concern than previously recognized [51]. BT and OHBT are generally considered to be biodegradable, whereas 2-MTBT is recalcitrant [51]. In particular, sewage plant effluents appear to be one of the major release routes of these compounds into natural waters [52]. BT and MTBT have been detected in various environmental compartments [51] as a result of the degradation of parent compounds within industrial processes [52]; however, little is known about their fate and effects. During anaerobic treatment, the total benzothiazole concentration increases, primarily due to significantly increased concentrations of BT [53]; however, MTBT concentrations were significantly decreased in STP_C. The highest levels of MTBT, 12.8 and 6.18 $\mu\text{g L}^{-1}$, were detected in STP_C and STP_E, respectively, whereas OHBT was always detected at lower levels (0.07–0.15 $\mu\text{g L}^{-1}$ in STP_B, STP_C and STP_E) but these increased during biological treatment in STP_C and E. According to Reemtsma et al. [51], whereas BT is largely eliminated during aerobic treatment, MTBT remains after passing through several STPs (A and B), or it may even form during treatment (STPs D and E). These sites are industrialized, especially Vic, and the levels detected might be due to their use as fungicide (one of their most important uses) in water circuits. A systematic study on the occurrence of benzothiazoles in municipal wastewater [53] has shown that this is an important class of trace contaminants in this kind of wastewater. Thus, Reemtsma et al. [51] concluded that the 2-substituted benzothiazoles employed in industrial processes are not completely removed by biological wastewater treatment, which poses problems for the aquatic environment due to their limited biodegradability and potential toxicity [51].

Conclusions

STP influents, effluents and surface waters along the Ter river basin were analyzed to determine the levels, behavior and fate of different pollutants, most of them endocrine-disrupting chemicals.

From the results reported in this work, we conclude that the alkylphenolic compounds NPEO, NP and OP, alcohol ethoxylates and DEP are ubiquitous compounds present in influents and effluents of STP waters, although they are eliminated to a large degree by water treatment, so they do not contribute significantly to the levels detected in receiving waters. AP compounds were detected at their highest concentrations in STP influents and in the Gurri River. However, differences were observed among the

STPs studied, since the levels of APs and NPE₁₊₂O were lower in the STPs that mainly receive municipal wastewaters (STP_A) compared to those that receive waters from industrial discharges. Given the concentrations of EDCs in influents, biological treatment from the five STPs are necessary in order to eliminate the input of EDCs into the water system via industrial and urban wastes.

In addition, it was found that the concentrations of target endocrine-disrupting compounds did not increase towards the mouth of the Ter River basin, indicating that the levels encountered are specific to the activities carried out at each site. However, the low-level detection of these EDCs in river waters emphasizes the need to control their use in order to prevent any possible negative effects on living organisms in the aquatic environment.

Acknowledgements The work described in this article was supported by the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia Project EVITA (CTM2004-06255-CO3-01) and by the Catalan Water Agency contract. The authors would like to thank Roser Chaler and Dori Fanjul for their valuable technical assistance, Jordi Bonet for his help during sampling and sample processing, Lluís Tirapu for indicating the sampling points of interest, and STP personnel for collecting the samples. Merck is acknowledged for the gift of the LC columns and the SPE cartridges used in the study.

References

1. Consorci Alba-Ter/Fundació Agbar (2004) *Atles ambiental i patrimonial del riu Ter*. Consorci Alba-Ter/Fundació Agbar, Barcelona
2. Espadaler I, Caixach J, Om J, Ventura F, Cortina M, Pauné F, Rivera J (1997) *Water Res* 31:1996
3. Quintana J, Martí I, Ventura F (2001) *J Chromatogr A* 938:3
4. Castillo M, Martínez E, Ginebreda A, Tirapu L, Barceló D (2000) *Analyst* 125:1733
5. Solé M, López de Alda MJ, Castillo M, Porte C, Ladegaard-Pedersen K, Barceló D (2000) *Environ Sci Technol* 34:5076
6. Petrovic M, Rodríguez-Alba A, Borull F, Marce RM, Gonzalez-Mazo E, Barceló D (2002) *Environ Toxicol Chem* 21:37
7. Petrovic M, Solé M, López de Alda MJ, Barceló D (2002) *Environ Toxicol Chem* 21:2146
8. Céspedes R, Lacorte S, Raldúa D, Ginebreda A, Barceló D, Piña B (2005) *Chemosphere* 61:1710
9. Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C (1991) *Environ Health Persp* 92:167
10. Jobling S, Sumpter JP (1993) *Aquat Toxicol* 27:361
11. Nimrod AC, Benson WH (1996) *Crit Rev Toxicol* 26:335
12. Routledge EJ, Sheahan D, Desbrow C, Brighty GC, Waldock M, Sumpter JP (1998) *Environ Sci Technol* 32(11):1559
13. Colborn T (1995) *Environ Health Persp* 103(Suppl 7):135
14. Sonnenschein C, Soto AM (1998) *J Steroid Biochem Mol Biol* 65:143
15. Jobling S, Nolan M, Tyler CR, Brighty G, Sumpter JP (1998) *Environ Sci Technol* 32:2498
16. Safe SH (2000) *Environ Health Persp* 108:487
17. López de Alda MJ, Díaz-Cruz M, Petrovic M, Barceló D (2003) *J Chromatogr A* 1000:503
18. EC (1991) Directive 91/271/EC, Council Directive of 21 May concerning urban waste water treatment. European Communities, Brussels
19. Johnson AC, Sumpter JP (2001) *Environ Sci Technol* 35:4697
20. Purdom CE, Hardiman PA, Bye VJ, Eno NC, Tyler CR, Sumpter JP (1994) *Chem Ecol* 8:275
21. Gomes RL, Scrimshaw MD, Lester JN (2003) *Trends Anal Chem* 22:697
22. EC (2000) Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for Community action in the field of water policy (Offic J Europ Commun L327, 22 December 2000). European Communities, Brussels
23. US EPA (2006) US EPA priority pollutant list on EPA website. US Environmental Protection Agency (EPA), Washington, DC (see <http://www.epa.gov>)
24. Laganà A, Bacaloni A, De Leva I, Faberi A, Fago G, Marino A (2004) *Anal Chim Acta* 501:79
25. Céspedes R, Petrovic M, Raldúa D, Saura U, Piña B, Lacorte S, Viana P, Barceló D (2004) *Anal Bioanal Chem* 378:697
26. Jara S, Lysebo C, Greibrokk T, Lundanes E (2000) *Anal Chim Acta* 407:165
27. Ying G-G, Williams B, Kookana RS (2002) *Environ Int* 28:215
28. Ahel M, Giger W (1993) *Chemosphere* 26:1471
29. Ferguson PL, Iden CR, Brownawell BJ (2000) *Anal Chem* 72:4322
30. Marcomini A, Filippuzzi F, Giger W (1988) *Chemosphere* 17:853
31. Petrovic M, Barceló D (2000) *Anal Chem* 72:4560
32. Desbrow C, Routledge EJ, Brighty GC, Sumpter JP, Waldock M (1998) *Environ Sci Technol* 32:1549
33. Laganà A, Bacaloni A, Fago G, Marino A (2000) *Rapid Commun Mass Spectrom* 14:401
34. Tsuda T, Suga K, Kaneda E, Ohsuga M (2000) *Chemosphere* 41:757
35. Snyder SA, Keith TL, Naylor CG, Staples CA, Giesy JP (2001) *Environ Toxicol Chem* 20:1870
36. Ahel M, Giger W, Koch M (1994) *Water Res* 28:1131
37. Giger W, Brunner PH, Schaffner C (1984) *Science* 225:623
38. Servos MR (1999) *Water Qual Res J Can* 34:123
39. White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP, Parker MG (1994) *Endocrinology* 135:175
40. Krogh KA, Mogensen BB, Halling-Sorensen B, Cortés A, Vejrup KV, Barceló D (2002) *Anal Bioanal Chem* 376:1089
41. Krogh KA, Vejrup KV, Mogensen BB, Halling-Sorensen B (2002) *J Chromatogr A* 957:45
42. Krogh KA, Halling-Sorensen B, Mogensen BB, Vejrup KV (2003) *Chemosphere* 50:871
43. Staples CA, Dorn PB, Klecka GM, O'Block ST, Harris LR (1998) *Chemosphere* 36:2149
44. Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, Tokes L, Fieldman D (1993) *Endocrinology* 132:2279
45. Staples CA, Peterson DR, Parkerton TF, Adams WJ (1997) *Chemosphere* 35:667
46. Fromme H, Küchler T, Otto T, Pilz K, Müller J, Wenzel A (2002) *Water Res* 36:1429
47. Jobling S, Reynolds TRW, Parker M, Sumpter J (1995) *Environ Health Persp* 103:582-587
48. Harris CA, Hentu P, Parker MG, Sumpter JP (1997) *Environ Health Persp* 105:802
49. Gray LE, Wolf C, Lambright C, Mann P, Price M, Cooper RL, Ostby J (1999) *Toxicol Ind Health* 15:94
50. Reemtsma T (2000) *Rapid Commun Mass Spectrom* 14:1612
51. Reemtsma T, Fiehn O, Kalvonski G, Jekel M (1995) *Environ Sci Technol* 29:478
52. Kloepfer A, Gnirss R, Jekeland M, Reemtsma T (2004) *Water Sci Technol* 50:203
53. Kloepfer A, Jekel M, Reemtsma T (2005) *Environ Sci Technol* 39:3792

Artículo científico número 9:

“Occurrence and fate of alkylphenol and alkylphenol ethoxylates in sewage treatment plants and impact on receiving waters along the Ter River (Catalonia,N.E.Spain)”.

R. Céspedes, S. Lacorte, A. Ginebreda, D. Barceló

Environmental Pollution Vol. 153 (2008) 384-392



Occurrence and fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in sewage treatment plants and impact on receiving waters along the Ter River (Catalonia, NE Spain)

Raquel Céspedes^a, Sílvia Lacorte^{a,*}, Antonio Ginebreda^b, Damià Barceló^a

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

^b Agència Catalana de l'Aigua, Generalitat de Catalunya, Provença 204, 08036 Barcelona, Catalunya, Spain

Received 10 January 2007; received in revised form 13 August 2007; accepted 13 August 2007

Whereas partitioning of nonylphenol upon particulate matter and enrichment in sludge has been detected, long chain NPE_nO_s were mainly found in the dissolved phase.

Abstract

The partitioning of alkylphenols in the dissolved and particulate matter of influents, effluents, accumulation onto sludge and the impact of sewage treatment plant upon receiving waters was studied along the Ter River basin (Catalonia, NE Spain). A solid-phase extraction or pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography–mass spectrometry was developed and permitted to determine target compounds with high efficiency in waters, particulate material and sludge. Nonylphenol mono- and diethoxylate, nonylphenol and octylphenol partitioned preferably upon particulate matter and sludge, whereas long chain NPE_{3–15}O prevailed in the dissolved phase and was released by effluents. Within the treatment process, a net accumulation of alkylphenols in sludge was found, producing up to 148 g/t/month. The removal efficiency of alkylphenols was of 37–90% and depended on the treatment. Assessment on the fate of these contaminants within STPs is discussed in terms of flow rates, biological oxygen demand and tons of sludge produced.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Liquid chromatography–mass spectrometry; Alkylphenols; Water; Particulate matter; Sewage sludge; Sewage treatment plants

1. Introduction

Endocrine-disrupting compounds (EDCs) are exogenous substances that can cause adverse health effects in an intact organism or its progeny (Soto et al., 1991; Jobling and Sumpter, 1993). They are natural and man-made chemicals found in the aquatic environment, and they have received attention in recent years due to the interactions in the hormonal system of organisms or humans.

Among EDCs, nonylphenol (NP), 4-*tert*-octylphenol (OP) and mono- and diethoxylated nonylphenols (NPE_{1–2}O) deserve

special attention not only because of their disrupting properties but rather for the widespread and high concentrations found in the environment. Alkylphenol ethoxylates (APEOs), introduced as detergents in the United Kingdom in 1944 have excellent surface active properties and are one of the most widely used surfactants in the world, used for industrial, agricultural, and domestic applications (Ying et al., 2002). Since then, the production and use of non-ionic surfactants correspond to 90% of alkylphenols (APs) and APEOs. As an example, NPEOs are used in cleaning products, textiles, petroleum, pulp and paper industry and pesticides formulation (Ying et al., 2002). On the other hand, OP is an important chemical intermediate mainly used for the production of phenolic resins and lacquers.

APEOs and their metabolites were restricted or altogether banned in some countries in Europe (Naylor, 1995), and there

* Corresponding author. Tel.: +34 934006100; fax: +34 932045904.

E-mail address: slbqam@cid.csic.es (S. Lacorte).

are significant initiatives to reduce their use or phase them out world-wide (Renner, 1997). Thus, throughout northern Europe (Scandinavian countries, UK, Germany) a voluntary ban on APEO use in household cleaning products began in 1995, and restriction on industrial cleaning applications in 2000 (Renner, 1997). Despite these restrictions, APs are detected in high levels in environmental matrices and specifically, NP and OP are included in the priority list of 33 substances of the Water Framework European Directive (WFD) 2000/60/EC (Directive 2000/60/EC), whereas NP is included in the US EPA as non-priority pollutant list (US EPA (non)priority pollutant list, 2006 <http://www.epa.gov>). The environmental concern of these compounds is mainly because of the endocrine-disrupting effects of two short chain NPEO oligomers (NPE₁O and NPE₂O) and the metabolite NP (Routledge and Sumpter, 1996).

One of the main sources of APs in the environment is by direct urban or industrial input or via sewage treatment plants (STPs) effluents which contribute to the levels of APs in the aquatic system, primarily attributed to incomplete removal during sewage treatment processes (Brunner et al., 1988; Ahel et al., 1994a; Lee and Peart, 1995; Harries et al., 1996; Solé et al., 2000; Snyder et al., 2001). The levels encountered in certain sewage effluents and receiving rivers are sufficient to induce a hormonal response in some fish species (Purdom et al., 1994; Harries et al., 1996; Sumpter et al., 1996; Solé et al., 2000; Tsuda et al., 2000). Ahel et al. (1994a) estimated that at least 60–65% of all nonylphenolic compounds entering the STW are discharged to the receiving waters with the effluent and 51% are released as metabolic products after undergoing mechanical and biological treatment (Ahel et al., 1994a). It is reported that within a biological treatment plant, APEOs can be degraded aerobically and anaerobically generating shorter-chain APEs and APs, which were recalcitrant under aerobic conditions (Ying et al., 2002; Birkett and Lester, 2003; Ying, 2006). To further minimize the release of these compounds towards receiving waters, STPs have been designed with additional treatments rather than aerobic/anaerobic and have been installed in areas with more than 15,000 inhabitants.

Within a monitoring program started in Catalonia with the aim to determine the occurrence and fate of APs and APEOs in surface water and the effect of STPs upon water quality, the

objectives of this study were: (i) to set up an analytical method to determine NP, OP, NPE_{1–2}O and NPE_{3–15}O at trace level in water, particulate matter and sludge and to establish the quality parameters of the technique, (ii) to study the partitioning of these five alkylphenolic compounds in dissolved and particulate matter of the Ter River, including influent and effluent waters, (iii) to evaluate the role and efficiency of STP to remove such compounds and (iv) to estimate the accumulation of APs in sludge.

The study area is the Ter River, which supplies 55% of raw water for drinking purposes to Barcelona city and surroundings. With a 3010 km² of basin surface and 208 km long, it originates in the middle of the Catalan Pyrenees (at 2400 m high) and passes through Girona, and leads to the Mediterranean Sea (Alba-Ter Consortium/Agbar Foundation, 2004). This river receives the direct impact of metallurgic, pulp mill, textile and tannery industries and APs and APEOs have been identified as main contaminants (Espadaler et al., 1997; Céspedes et al., 2006).

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Table 1 lists the compounds studied and their physico-chemical properties. NPE_{1–2}O was laboratory-synthesized by Aigües de Barcelona. NPE_{3–15}O contained chain isomers and oligomers with an average number of nine ethoxy units and were from Kao Corporation (Barcelona, Spain). High purity OP, technical grade 4-nonylphenol (NP), and 4-heptylphenol (4-HP, used as the internal standard) were from Aldrich (Milwaukee, WI, USA). The internal standard bis(2-ethylhexyl)phthalate (ring-D₄, high purity 98%) was purchased from Cambridge Isotope Laboratories (Cambridge, MA, USA). Stock solutions of individual standards and standard mixtures were prepared at 1000 µg L⁻¹ in methanol. Working standard solutions were obtained by further dilution of stock solutions with methanol.

HPLC-grade solvents (water, methanol, acetonitrile, acetone and dichloromethane) were from Merck (Darmstadt, Germany). Analytical grade sodium acetate was purchased from Panreac (Barcelona, Spain).

2.2. Sample collection

Water samples were collected during spring 2001 in nine points distributed along the Ter River basin (Catalonia, NE, Spain), including Terri and Gurri tributaries, as well as influent and effluent wastewaters and corresponding sludge of five STPs discharging into the Ter River. Table 2 shows the sampling sites corresponding to surface water samples analyzed along the Ter River basin, the total organic carbon (TOC), suspended particulate material (SPM) and

Table 1
CAS number, formula, molecular weight and physico-chemical properties of the compounds analyzed

Compound	Acronym	CAS-no.	Formula	Molecular weight	Water solubility ^a	log <i>K</i> _{oc} ^b	log <i>K</i> _{oc} ^c
4- <i>tert</i> -Octylphenol	OP	104-66-9	C ₁₄ H ₂₂ O	206	12.6	4.12	5.18
4-Nonylphenol, branched	4-NP	84852-15-3	C ₁₅ H ₂₄ O	220	5.43	4.48	5.39
Nonylphenol monoethoxylate	NP ₁ EO	27986-36-3	C ₁₇ H ₂₈ O ₂	264	3.02	4.17	5.46
Nonylphenol diethoxylate	NP ₂ EO	9016-45-9	C ₁₉ H ₃₂ O ₃	308	3.38	4.21	5.18
Nonylphenol <i>n</i> -ethoxylate	NP _{<i>n</i>} EO (<i>n</i> = 3–15)	na	C ₂₁ H ₃₆ O ₄	na	na	na	na

Water solubility (mg L⁻¹), organic water partition coefficient (log *K*_{ow}) and organic carbon sorption constant (log *K*_{oc}).

na, Not available.

^a Ahel and Giger (1993a).

^b Ahel and Giger (1993b).

^c Ferguson et al. (2000).

Table 2
Surface water samples analyzed along the Ter River basin: rivers name or tributary, sampling sites, total organic carbon (TOC), suspended particulate material (SPM), conductivity at 20 °C, pH and dissolved oxygen (DO) measured in March 2001 for each sampling site

River	Site	TOC (mg L ⁻¹ C)	SPM (mg L ⁻¹)	Conductivity 20 °C (μS cm ⁻¹)	pH	DO (mg L ⁻¹ O ₂)
Ter	After Ripoll	<2.5	<7	230	9	11
Ges	Torelló	<2.5	<7	464	9	12
Sorreig	Les Masies de Voltregà	6.1	<7	1068	8	12
Gurri	Les Masies de Roda	9.8	7	3823	8	15
Ter	Roda de Ter	<2.5	12	464	na	10
Ter	El Pasteral	<2.5	12	478	8	10
Ter	Sant Julià de Ramis	4	11	986	na	6
Terri	Sant Julià de Ramis	<2.5	67	1538	na	11
Ter	Torroella de Montgrí	2.8	21	1100	na	8

na, Not available.

conductivity whereas Table 3 shows the main characteristics of the STPs studied. The STPs plants studied were Ripoll (STP_A), Torelló (STP_B), Vic (STP_C), Girona (STP_D) and Banyoles (STP_E) and consisted of primary settlement followed by biological treatment. Ripoll (STP_A) receives mainly domestic effluent and 30–40% of industrial effluent from several textile and tannery industries.

Influent and effluent water samples were assembled from 24-h flow based composite samples. Sludge was collected on the same day as water samples. River water samples were collected 15–34 km downstream from the discharge point of the STPs. All water samples were collected using Pyrex borosilicate amber containers. Each bottle was rinsed with tap water and with high purity water prior to sampling. Samples were transported and stored at 4 °C and extracted within 24 h.

2.3. Extraction of water samples and particulate material

Prior to the extraction, surface water samples were filtered through 0.45 μm HVLP (Millipore, Bedford, MA, USA) membrane filter, whereas wastewaters were filtered through 1, 0.7 and 0.45 μm pore size HVLP filters, respectively. The pore size of 0.45 μm was used to separate dissolved and particulate phases. The retained particulate material was washed with 10 mL of methanol, which was collected in a flask, evaporated and reconstituted with methanol. This extract was injected separately and therefore, concentrations of the dissolved and particulate phases are reported separately for each sample.

The <0.45 μm fraction was extracted with solid-phase extraction (SPE) with LiChrolut RP-18 (500 mg, 6 mL) cartridges (Merck, Darmstadt, Germany), using an automated sampler processor ASPEC XL (Gilson, Villiers-le-Bel, France), fitted with a 817 switching device and an external 306 LC pump. SPE cartridges were conditioned by passing 7 mL of methanol and 3 mL of HPLC-grade water through the cartridge at a flow rate of 3 mL min⁻¹. Five hundred milliliters of filtered river water sample (100 mL of STP influents and 200 mL of effluents) was percolated, respectively, through the C18 cartridge at a flow rate of 5 mL min⁻¹. After preconcentration, the sorbent was dried for 30 min using a Baker SPE 12 g apparatus (J.T. Baker, Deventer,

Netherlands) connected to a vacuum system set at -15 psi. The elution step was performed by passing (2 × 5 mL) MeOH/CH₂Cl₂ (9:1), with a 5-min delay between them. After elution, the extracts were evaporated to dryness with a gentle stream of nitrogen and reconstituted with 300 μL of methanol. Internal standards were added at 1 μg mL⁻¹.

2.4. Extraction of sludge

Sludge was freeze dried and homogenized using a mortar and pestle and then sieved through a 120 μm sieve. The freeze-dried samples were stored in precleaned glass bottles at -20 °C until extraction.

Sludge was extracted using a Dionex ASE 200 (Dionex, Idstein, Germany) following the conditions optimized by Petrovic et al. (2001, 2002b). Two grams of freeze-dried sludge was mixed thoroughly with Na₂SO₄ and filled into a 11 mL stainless steel extraction cells and extracted with acetone/methanol (1:1, v/v) under following conditions: temperature of 50 °C, pressure 1500 psi, heating time 5 min, two cycles of static extraction (5 min). As a final step, the cell was purged with gaseous nitrogen. The total volume of the extracts (~20 mL) was concentrated to an approximate volume of 1 mL using a rotary evaporator at 30 °C and redissolved in a 100 mL of HPLC water. Subsequent cleanup of extracts was performed by SPE using LiChrolut C18 cartridges (Merck, Darmstadt, Germany) as described above for water samples. These extracts were 10 times diluted before injection. Internal standards were added at 1 μg mL⁻¹.

2.5. Instrumentation and analytical methodology

HPLC-MS was performed with an HP 1100 autosampler fitted with a 100-μL loop and an HP 1090 A LC binary pump, both from Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA). The analytical protocol followed is detailed elsewhere (Céspedes et al., 2004). Briefly, it consists in an HPLC separation with a 5-μm, 250 × 4 mm i.d. C₁₈ reversed phase column (LiChrospher 100 RP-18) preceded by a guard column (4 × 4 mm i.d., 5 μm) of the same packing material from Merck (Darmstadt, Germany). The injection volume was set at 25 μL.

Table 3
Characteristics of sewage treatment plants along the Ter River basin: types of treatment, flow (m³ day⁻¹), DBO₅ (mg L⁻¹), habitant equivalents (h-eq), sludge treatment, sludge produced (t/month) and final sludge disposal

Code	STP	Type of treatment	Flow (m ³ day ⁻¹)	DBO ₅ (mg L ⁻¹)	h-eq Treated	Sludge treatment	Sludge produced (t/month)	Sludge disposal
STP _A	Ripoll	BN	7294	101	12,278	Dehydration	391	Agriculture
STP _B	Torelló	BN	4580	289	22,060	Dehydration	327	Various
STP _C	Vic	QBN	20,535	706	241,629	Anaerobic digestion/dehydration	1473	Various
STP _D	Girona	B	39,615	316	208,639	Anaerobic digestion/dehydration	646	Composting
STP _E	Banyoles	BN	10,336	581	100,087	Dehydration	550	Thermal heat

B, biologic; BN, biologic with nitrogen elimination; QBN, physico-chemical and biological with nitrogen elimination.

To quantify target compounds, it was necessary to perform two analyses for each sample. Thus, whereas NP and OP were detected with ESI interface operating in NI mode, NPEOs were detected in PI mode. Under NI conditions, APs were detected as $[M - H]^-$, whereas under PI conditions, using a mobile phase containing 25 mM of sodium acetate, the APEOs gave exclusively evenly spaced sodium adducts $[M + Na]^+$.

The separation was performed at a flow rate of 1 mL min^{-1} under gradient elution conditions using methanol (A) and HPLC water (B) in PI mode, and acetonitrile (A) and water (B) in NI mode. In PI mode, gradient elution was from 30% A (3 min), to 80% A in 10 min, to 90% A in 5 min, kept isocratic for 15 min, to 100% A in 10 min and kept isocratic for 10 min. The gradient elution for NI mode started with 30% A, to 60% A in 15 min, to 70% in 5 min, to 90% in 10 min and to initial conditions in 3 min, kept isocratic for 5 min. The extraction voltage used in both, PI and NI ionization modes was 90 V.

Detection was carried out using an HP 1040 M diode array UV–vis detector coupled in series with an LC–MSD HP 1100 mass selective detector, equipped with an electrospray (ESI) interface. The operating parameters of the ESI–MS detector are given in a previous study (Céspedes et al., 2004). Acquisition was performed simultaneously 50% in selected ion monitoring (SIM) and in full scan mode over a mass range of 115–650 and 115–1150 Da in NI and PI modes, respectively. We used this utility of the HP 1100 to quantify and confirm, respectively, the presence of target compounds.

2.6. Quantification and quality control

Quantification was performed by external standard calibration. Calibration curves were generated from 50 ng mL^{-1} to $25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ and good fits ($r^2 > 0.990$) were obtained. The internal standards were used for process control, in order to check the influence of ion suppression effect in ESI–MS detection. Thus, in NI mode 4-HP was used for the analysis of OP and NP, whereas DEHP- d_4 was used to determine NPEOs in PI mode. Procedural blanks analyzed with the absence of a matrix did not contain target compounds.

SIM mode was used for quantification purposes and full scan mode for confirmation of the target compounds. Identification criteria included also retention time comparison against the corresponding standards and Diode Array detection, making three or four identification points per compound confirmation (depending on their fragmentation), according to the 96/23/EC European Council Directive.

The recoveries and overall method reproducibility were determined from replicate analysis ($n = 6$) in distilled, surface and wastewaters and particulate material spiked with the standard mixture at a concentration of $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ for wastewaters and $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ for surface waters. Samples were analyzed as described above, together with a blank sample. For sludge, no spiking experiments were performed since we used a method previously developed in our group where quality parameters are already reported (Petrovic et al., 2001). Method performance was evaluated through calculation of the linearity, repeatability, accuracy and sensitivity of the method, which was specially designed to determine widespread concentrations of NP and OP in complex matrices.

3. Results and discussion

3.1. Method performance

Fig. 1 shows the recoveries of target compounds in the dissolved and particulate phases of distilled water, river waters,

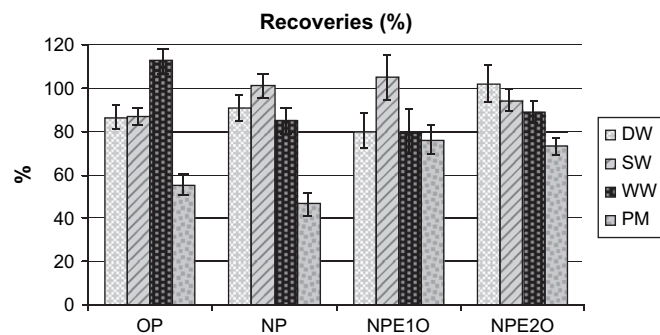


Fig. 1. Recovery percentages obtained for OP, NP, NPE₁O and NPE₂O in dissolved phase of distilled water (DW), surface water (SW) and wastewater (WW) respectively, and in particulate material (PM), with corresponding RSD (%).

STPs' influents and effluents. Distilled water was used as control. Mean recoveries ranged from 80 to 102% for distilled water, 87–105% for surface water and 79–113% for wastewater subtracting the initial contribution of target compounds in real samples. Recoveries of target compounds in particulate matter were from 47 to 76%, and thus, the final concentrations in real samples were corrected by their recovery values. In all cases, the repeatability of the method was satisfactory, with standard relative deviations (RSD) $\leq 6\%$, except somehow higher for NPE₁O, with RSD values up to 11% in wastewater.

In the case of complex matrices such as wastewater, to avoid false positives and to provide unequivocal identification, LC–MS proved to be selective and sensitive enough to determine this family of compounds in the matrices studied. Table 4 indicates the m/z ion used for quantification, the correlation coefficients (r^2) over a concentration range of 50 ng mL^{-1} to $25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, the method detection limits for water and the instrumental detection limits (IDL). The detection limit (LOD) of combined SPE–LC–MS procedure for water samples and PLE–LC–MS were calculated in SIM mode as the minimum amount of a compound present in a sample that produces a signal-to-noise ratio of 3 ($S/N = 3$), based on an injection of a $25 \text{ } \mu\text{L}$ aliquot of the final extract of each matrix tested. LODs obtained for waters varied between 0.06 (OP) and $0.12 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (NPE₁O), whereas for sludge LODs ranged from 5 to $23 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ (expressed on dry-weight basis).

3.2. Partitioning of alkylphenolic compounds

In environmental conditions, APs and APEOs partition according to their hydrophobic characteristics and to the

Table 4

Ionization mode, m/z ion used for quantification, linear correlation coefficients (r^2) over a concentration range of 50 ng mL^{-1} to $25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, detection limits in waters (LOD) and instrumental detection limits (IDL)

Compound	Ionization mode	m/z Used for quantification	r^2	LOD _{Water} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	IDL (ng)
OP	NI	205 $[M - H]^-$	0.999	0.06	0.1
NP	NI	219 $[M - H]^-$	0.997	0.07	0.2
NPE ₁ O	PI	287 $[M + Na]^+$	0.993	0.12	0.9
NPE ₂ O	PI	331 $[M + Na]^+$	0.991	0.06	0.3
NPE _{3–15} O	PI	375 $[M + Na]^+$, $\Delta \pm 44$	0.994	0.06	0.2

hydrodynamic conditions, as well as the physico-chemical and the biological processes of the river (Ahel et al., 1994a). Bio-transformation has been reported as the predominant mechanism determining the fate of nonylphenolic compounds in rivers (Ahel et al., 1994b). The methods described above were first used to analyze wastewater influents and effluents and receiving waters situated along the Ter River. Table 5 summarizes the concentrations of OP, NP, NPE_{1–2}O and NPE_{3–15}O in the dissolved phase, in particulate matter and the total concentration. Target compounds were detected in all water samples analyzed, with total concentrations (dissolved + particulate) ranging from 25.9 to 671 µg L⁻¹ (NPE_{3–15}O), from 0.66 to 10.3 µg L⁻¹ (NPE_{1–2}O), from 0.08 to 17.5 µg L⁻¹ (NP) and from 0.10 to 3.98 µg L⁻¹ (OP). However, knowledge of chemical partitioning between the aqueous and solid phases is essential to assess the transport and fate of APs. In our study, partitioning to the particulate matter was the dominant process for NP and OP due to their relatively high K_{ow} , decreasing their presence in the water column. These results are similar to previous ones which report that NP partitions preferentially upon the organic fraction of the sample i.e. it adsorb onto particulates (Naylor, 1995; Ying et al., 2002) and to sludge (Birkett and Lester, 2003) which in turn makes them more resistant to biodegradation (John et al., 2000; Isobe et al., 2001; Birkett and Lester, 2003).

Patrolecco et al. (2006) studied the determination of NP, NPE₁O, NPE₂O and BPA in water, suspended particulate matter and bed sediment collected in the polluted Tiber River (Italy), obtaining the highest concentrations in particulate matter for NP, being higher than that expected from their hydrophobicity.

In samples where these compounds were detected in both phases, the ratio calculated according to the concentration in

the particulate matter to that in the dissolved phase (water filtered through <0.45 µm pore size) was of 3–31 for OP and from 0.35 ($n = 1$ sample) to 2 for NP, indicating the affinity of these compounds for the particulate matter of the sample given the higher hydrophobicity of the compound (K_{ow} of 4.12 and 4.48, respectively) compared to long chain APEOs. The partitioning of target compounds between the dissolved and particulate fraction of the sample was similar for river or wastewaters, and only the relative concentrations of each target compound varied. Isobe et al. (2001) found that in primary effluents up to 80% of the total NP and 60% of the total OP was present in the particulate phase. Temperature has a great influence on alkylphenolic surfactant removal in STPs (Ahel et al., 1994a; Birkett and Lester, 2003), being the removal efficiencies greater in summer than winter due to increased temperatures. NPE_{1–2}O presented an intermediate behavior, being present in 90% of the samples in both particulate and dissolved phases, with an enrichment factor between 0.03 and 5.56. Contrarily, NPE_{3–15}O was found at higher concentration in the dissolved phase, and the ratio of NPE_{1–2}O over NPE_{3–15}O was in all cases below 1, indicating its preference for the dissolved phase. This phenomenon has already been reported for those EDC where adsorption to the organic particles is correlated with the K_{oc} and inversely correlated to the water solubility (Birkett and Lester, 2003). Langford et al. (2005) observed that the extent and rate of partitioning was proportional to $\log K_{ow}$ for alkylphenolic compounds, showing an inverse relationship between the number of ethoxy groups and the rate of partition. This fact suggests that NP will be strongly absorbed to PM and sludges.

Thus, to obtain the total concentration of APs and APEOs in a sample, filters should be washed with a solvent, such as MeOH, to recover any compounds associated with the particles.

Table 5
Concentrations (µg L⁻¹) of octylphenol (OP), nonylphenol (NP), nonylphenol mono- and diethoxylate (NPE_{1–2}O) and nonylphenol *n*-ethoxylate (NPE_{3–15}O) in dissolved phase and water and the corresponding particulate matter (PM) of the water samples analyzed

Code/STP	OP PM	OP waters	OP total	NP PM	NP waters	NP total	NPE _{1–2} O PM	NPE _{1–2} O waters	NPE _{1–2} O total	NPE _{3–15} O PM	NPE _{3–15} O waters	NPE _{3–15} O total
Ter	<0.06	<0.06	<0.06	0.08	<0.07	0.08	0.20	1.41	1.61	5.75	28.3	34.1
STP _A inf.	na	<0.06	na	na	<0.07	na	na	1.47	na + 0.47	na	530	na + 530
STP _A eff.	0.16	<0.06	0.16	0.51	<0.07	0.51	0.35	3.50	3.85	15.5	33.4	49.0
STP _B inf.	3.98	<0.06	3.98	7.23	<0.07	7.23	7.97	<0.06	7.97	37.2	429	466
STP _B eff.	0.13	<0.06	0.13	0.38	<0.07	0.38	0.96	4.02	4.98	9.92	30.8	40.7
Ges	0.24	<0.06	0.24	0.26	<0.07	0.26	0.07	0.59	0.66	29.9	122	152
R ^a Sorreig	0.10	<0.06	0.10	0.32	<0.07	0.32	0.09	0.75	0.84	29.3	40.7	70.0
STP _C inf.	1.70	0.24	1.94	11.8	5.67	17.5	8.19	<0.06	8.19	49.1	202	251
STP _C eff.	na	<0.06	na	na	2.07	na + 2.07	na	3.63	na + 3.63	na	31.3	na + 31.3
Gurri	0.52	<0.06	0.52	1.32	<0.07	1.32	1.96	1.37	3.33	14.7	39.4	54.2
Ter	0.39	<0.06	0.39	0.28	<0.07	0.28	0.06	0.92	0.98	5.21	20.7	25.9
Ter	0.26	<0.06	0.26	0.10	<0.07	0.10	0.92	0.67	1.59	10.5	49.6	60.2
STP _D inf.	3.06	0.10	3.16	3.63	1.96	5.59	8.77	1.55	10.3	53.0	618	671
STP _D eff.	0.32	<0.06	0.32	0.37	1.05	1.42	0.38	3.43	3.81	9.48	70.9	80.4
Ter	0.48	<0.06	0.48	0.23	<0.07	0.23	0.09	2.91	2.99	11.9	75.1	86.9
STP _E inf.	0.97	0.29	1.26	5.78	4.62	10.4	3.81	1.60	5.41	12.4	90.4	103
STP _E eff.	0.33	<0.06	0.33	0.33	<0.07	0.33	1.42	3.03	4.45	14.2	56.3	70.5
Terri	0.16	<0.06	0.16	0.30	<0.07	0.30	0.12	1.64	1.76	10.0	48.1	58.1
Ter	0.06	<0.06	<0.06	0.15	<0.07	0.15	0.09	0.84	0.93	9.55	29.7	39.3

na, Not analyzed.

3.3. Efficiency of sewage treatment plants and effects upon receiving waters

Among samples studied, higher levels of NP and OP were detected in STP influents, whereas lower concentrations of most compounds were observed in the effluents which in turn were similar to those found in surface waters. These results demonstrate the effectiveness of the STPs in eliminating, although not totally, these compounds. Fig. 2 shows the chromatograms of NP detected in STP_D, with higher levels in the influent than in the effluent, and even higher in the sludge.

The treatment performed in the five STPs studied is a three-stage process consisting of preliminary treatment, primary sedimentation and secondary treatment. The type and efficiency of secondary treatment used in each STPs is important in determining the concentrations of the NPE_nO and their degradation products present in the effluent. For example, nitrification used during secondary treatment can increase removal efficiencies (Ahel et al., 1994a; Birkett and Lester, 2003). However, the overall levels of target compounds were similar in all STPs studied, despite the size and treatment of the STPs (Table 3). No relationship was found between the influent flow rate and the total or individual concentration of NP and OP,

indicating that the concentrations are highly variable within STPs and highly dependent on the type and inputs received. The following data correspond to total concentrations (dissolved + particulate matter), with the exception of data identified below as “(d)”, which correspond only to the dissolved matrix (i.e. where the particulate matter could not be analyzed (see Table 5)). Among compounds studied, the lowest concentrations detected were those corresponding to OP, with levels of 1.26–3.98 $\mu\text{g L}^{-1}$ in the influents and 0.13–0.33 $\mu\text{g L}^{-1}$ in the effluents. Following, NP was detected from 5.59 to 17.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ in influents and from 0.33 to 2.07 (d) $\mu\text{g L}^{-1}$ in the effluents. NPE_{1–2}O ranged from 1.47 (d) to 10.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ in influents and from 3.63 (d) to 4.98 $\mu\text{g L}^{-1}$ in effluents and finally, NPE_{3–15}O was detected at highest concentrations, from 103 to 671 $\mu\text{g L}^{-1}$ in influents and from 31.3 (d) to 80.4 $\mu\text{g L}^{-1}$ in effluents. The overall values detected were slightly lower compared with those of previous studies in Catalan rivers (NE, Spain) (Castillo et al., 2000; Petrovic et al., 2002a; Céspedes et al., 2005), indicating a lesser use of these compounds in the study area.

One of the important issues to take into consideration when determining APs in STPs is the treatment efficiency. In the STPs studied, OP and NP were removed in 74–97%, despite

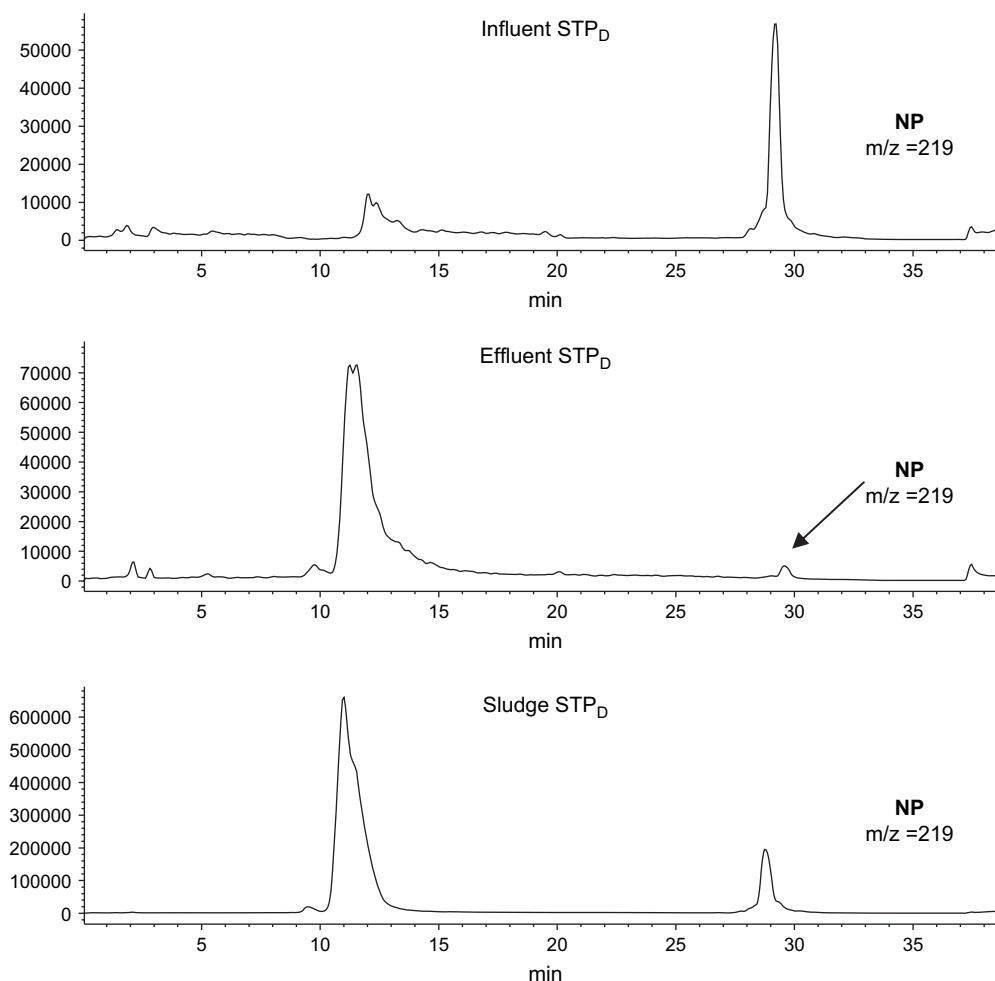


Fig. 2. Selected ion monitoring (SIM) chromatograms obtained by LC–ESI–MS in NI corresponding to NP detected in the influent, effluent and sludge of STP_D.

the treatment procedure of the different STPs, whereas NPE_{1-2}O was eliminated in 18–63%, except in STP_A where NPE_{1-2}O was detected in the effluent indicating some degradation of NPE_nO $n > 2$ during the treatment, effect that can depend on the hydraulic retention time or specific treatment conditions. For $\text{NPE}_{3-15}\text{O}$, the elimination rate was of 31–91%. The degradability of APs were studied by calculating the ratios among $\text{NP}/\text{NPE}_{1-2}\text{O}$ and $\text{NPE}_{1-2}\text{O}/\text{NPE}_{3-15}\text{O}$ which were below 1 except $\text{NP}/\text{NPE}_{1-2}\text{O}$ in influents of STP_C and STP_E , suggesting that in water, $\text{NPE}_{3-15}\text{O}$ are not rapidly degraded to NPE_{1-2}O nor to NP during biological treatment. Therefore, final effluents discharging to surface waters typically contained $\text{NPE}_{3-15}\text{O}$, less estrogenic than NP and faster biodegradable (Staples et al., 1998) and only trace levels of NP. Ahel et al. (1994a) found that NPEOs with >3 ethoxylate chains made up 82.4% of the nonylphenolic compounds present in primary effluent samples, indicating thus the higher benefits of biological treatment to eliminate APs. Similar findings were also reported by Fujita et al. (2000) who studied APEOs in 40 wastewater treatment plants throughout Japan.

Considering the sum of the APs studied (NP and OP), the removal efficiency was of 90, 90, 87, 86 and 37% for STP_A , STP_B , STP_C , STP_D and STP_E , respectively. Among all STPs studied, STP_E (Banyoles) showed lowest removal efficiency of APEOs despite it has biological treatment with additional nitrogen elimination. According to these values, STP effluents might partially contribute to the levels of NP and OP in the Ter surface waters, which were in general similar to those found in effluents. In surface waters, OP was detected from 0.10 to $0.52 \mu\text{g L}^{-1}$, NP from 0.08 to $1.32 \mu\text{g L}^{-1}$ and NPE_{1-2}O and $\text{NPE}_{3-15}\text{O}$ up to 3.33 and $152 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively. However, the Gurri River, one of the sites with higher TOC (9.8 mg L^{-1}) (Table 2), contained highest concentration of OP, NP and NPE_{1-2}O in surface waters (Table 5).

3.4. Accumulation of alkylphenolic compounds upon sewage sludge

Sewage treatment plants in Europe produce each year 8×10^6 t of sludge (Andreu et al., 2007). During STPs treatment, we found an accumulation of NP and OP in sewage sludge, with levels at the ppm range. NPEOs and NP were detected up to 66.5 and 194 mg kg^{-1} on a dry-weight basis, respectively. Fig. 3 shows the levels and distribution of the different alkylphenolic compounds in sludge. Among STPs studied, STP_C (Vic), with biological treatment and an additional nitrogen and phosphor elimination, had highest levels of NPE_{1-2}O and especially NP (194 mg kg^{-1}) in sludge. Overall, these levels are similar to previous studies in this area (Castillo et al., 2000; Petrovic et al., 2001) that found 7.5, 133 and 172 mg kg^{-1} for OP, NPEO and NP, respectively, in digested sludge (Petrovic et al., 2001) and lower to other studies which report concentrations as high as 470 mg kg^{-1} for raw sludge (Lee and Peart, 1995) and 450–2530 mg kg^{-1} for digested sludge (Giger et al., 1984), being frequently greater the concentrations in digested than in raw sludge (Ahel et al., 1994a).

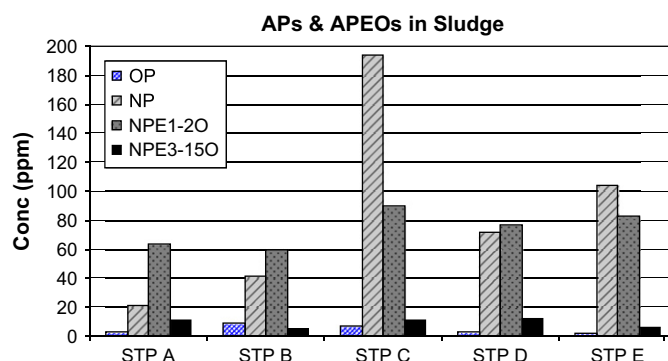


Fig. 3. Concentration of OP, NP, NPE_{1-2}O and $\text{NPE}_{3-15}\text{O}$ in the sludge of the STPs analyzed by PLE–LC–MS (mg kg^{-1} dry-weight).

We found a decreasing concentration in the order $\text{NP} \approx \text{NPE}_{1-2}\text{O} > \text{NPE}_{3-15}\text{O}$, given the ratios $\text{NP}/\text{NPE}_{1-2}\text{O}$ and $\text{NPE}_{1-2}\text{O}/\text{NPE}_{3-15}\text{O}$ varying from 1 to 8. The NP and OP are present in higher amounts in sludge relative to effluent as compared to NPEs due to their physical properties. The high proportion of the total concentration of NP and NPE_{1-2}O in sludge is determined predominantly by their partitioning to the particulate material during earlier stages of the wastewater treatment processes. In general, the more hydrophobic a chemical the greater the amount that will pass through the sludge (Birkett and Lester, 2003). During anaerobic digestion, further removal of residual ethoxylate groups occurs, and nonylphenol persists in digested sludge (Ahel et al., 1994a; Johnson and Sumpter, 2001). OP was detected at lowest levels in the sludge (between 1.91 and 9.04 mg kg^{-1}), and this could be attributed to its far lower production volume (Ying et al., 2002). The elimination mechanism of APs within the STPs is complex and no correlation was found between the total or individual levels of target compounds between influent and effluents. However, in our specific study, we further evaluated whether the specific STP operating parameters had any influence on the accumulation of NP and OP in sludge. No relationship was found between influent or effluent concentration of target compounds and flow rate or DBO_5 , basically because the influents of studied STPs are highly variable and depend on specific inputs of industrial wastes.

Taking into consideration the amount of sludge generated in each STP (Table 3) the amount of each target compound accumulated per ton per month was estimated. Highest levels were observed for NP and NPE_{1-2}O , with a net accumulation of 8.4 and 148 kg/t/month , respectively. Following $\text{NPE}_{3-15}\text{O}$ was detected between 1.49 and 15.9 g/t/month and OP with 1.39– 10.1 g/t/month . STP_C was the plant generating highest amount of sludge, and given the levels encountered, the one accumulating more NP. The sludge of STPs studied is dehydrated and either incinerated, disposed as residue or used in agriculture. The use of sludge in agriculture has been identified as a major potential source of APs and short chain APEOs to the terrestrial environment (Johnson and Sumpter, 2001; Ying, 2006) following the spreading of sludge on agricultural land (Solé et al., 2000), which may degrade rapidly or not be bioavailable. In addition, NP and OP have been identified in

agricultural fields (Hildebrandt et al., 2007), and in ground waters from agricultural fields (Latorre et al., 2003) as a result of leaching of sludge fertilized fields or use of pesticide additive treatments. Because NP may be highly toxic to aquatic life (Staples et al., 1998; Ying, 2006), and given the high concentrations of NP in sludge, further research is needed on sludge pretreatment conditions (thermal, dehydration, sterilization, etc) before disposal to determine whether the use of sludge containing mg/kg concentrations of APs can be of environmental concern.

4. Conclusions

OP, NP and NPE_{1–2}O, which have been reported as endocrine-disrupting compounds, together with NPE_{3–15}O occur in wastewaters and receiving waters along the Ter River. The highest levels were observed in STP influents, with concentrations of NP and NPE_{3–15}O up to 17.5 and 618 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively, whereas effluent contained levels 10 times lower, in average. OP and NP partitioned preferentially to the particulate fraction of the samples, whereas NPE_{1–2}O and NPE_{3–15}O were found in the dissolved phase. This fact indicates the importance to analyze the particulate fraction of waters to determine the total concentration of APEOs in a sample and to better assess the fate of these compounds within STP treatment.

The overall STP efficiency varied from 37 to 90%, and OP and NP were eliminated with highest efficiency while the less estrogenic NPE_{3–15}O was the major compound remaining in the effluent, thus contributing to the levels found in surface waters. Among the compounds studied, NP and NPE_{1–2}O were mostly accumulated in sludge. These results demonstrate the need to survey APs within STPs and assess their degradability to better set up disposal procedures to minimize the environmental impact produced by the use of sludge for agricultural purposes.

Acknowledgements

The work described in this article was supported by the Spanish *Ministerio de Educación y Ciencia* Project EVITA (CTM2004-06255-CO3-01) and by the Catalan Water Agency (ACA) contract. Authors would like to thank Dr. R. Chaler and D. Fanjul for their valuable technical assistance, J. Bonet for the work carried out, E. Teixidó and B. Catllà for the information given, Ll. Tirapu for indicating the sampling points of interest. Merck is acknowledged for the gift of the LC columns and the SPE cartridges and Francesc Ventura from (Aigües de Barcelona) for kindly providing NPEOs standards.

References

Andreu, V., Ferrer, E., Rubio, J.L., Font, G., Picó, Y., 2007. Quantitative determination of octylphenol, nonylphenol, alkylphenol ethoxylates and alcohol ethoxylates by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–mass spectrometry in soils treated with sewage sludges. *Science of the Total Environment* 378, 124–129.

Ahel, M., Giger, W., 1993a. Aqueous solubility of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Chemosphere* 26, 1461–1470.

Ahel, M., Giger, W., 1993b. Partitioning of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates between water and organic solvents. *Chemosphere* 26, 1471–1478.

Ahel, M., Giger, W., Koch, M., 1994a. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment – I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Research* 28, 1131–1142.

Ahel, M., Giger, W., Schaffner, C., 1994b. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment – II. Occurrence and transformation in rivers. *Water Research* 28, 1143–1152.

Alba-Ter Consortium/Agbar Foundation, 2004. *Environmental and Heritage Atlas of the Ter River*. Barcelona.

Birkett, J.W., Lester, J.N., 2003. *Endocrine Disruptors in Wastewater and Sludge Treatment Processes*. IWA Publishing, London, UK.

Brunner, P.H., Capri, S., Marcomini, A., Giger, W., 1988. Occurrence and behaviour of linear alkylbenzenesulphonates, nonylphenol, nonylphenol mono- and nonylphenol diethoxylates in sewage and sewage sludge treatment. *Water Research* 22, 1465–1472.

Castillo, M., Martínez, E., Ginebreda, A., Tirapu, L., Barceló, D., 2000. Determination of non-ionic surfactants and polar degradation products in influent and effluent water samples and sludges of sewage treatment plants by a generic solid phase extraction protocol. *Analyst* 125, 1733–1739.

Céspedes, R., Petrovic, M., Raldúa, D., Saura, U., Piña, B., Lacorte, S., Viana, P., Barceló, D., 2004. Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC–ESI–MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378, 697–708.

Céspedes, R., Lacorte, S., Raldúa, D., Ginebreda, A., Barceló, D., Piña, B., 2005. Distribution of endocrine disruptors in the Llobregat River basin (Catalonia, N.E. Spain). Analysis by LC–MS and recombinant yeast assay. *Chemosphere* 61, 1710–1719.

Céspedes, R., Lacorte, S., Ginebreda, A., Barceló, B., 2006. Chemical monitoring and occurrence of alkyl phenols, alkylphenol ethoxylates, alcohol ethoxylates, phthalates and benzothiazoles in sewage treatment plants and receiving waters along the Ter River basin of Spain. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385, 992–1000.

EC, 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Official Journal of the European Communities* L327 (22 December 2000 European Communities, Brussels).

Espadaler, I., Caixach, J., Om, J., Ventura, F., Cortina, M., Pauné, F., Rivera, J., 1997. Identification of organic pollutants in Ter river and its system of reservoirs supplying water to Barcelona (Catalonia, Spain): a study by GC/MS and FAB/MS. *Water Research* 31 (8), 1996–2004.

Ferguson, P.L., Iden, C.R., Brownawell, B.J., 2000. Analysis of alkylphenol ethoxylate metabolites in the aquatic environment using liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 72 (18), 4322–4330.

Fujita, M., Ike, M., Mori, K., Kaku, H., Sakaguchi, Y., Asano, M., Nishihara, T., 2000. Behaviour of nonylphenol ethoxylates in sewage treatment plants in Japan – biotransformation and ecotoxicity. *Water Science and Technology* 42, 23–30.

Giger, W., Brunner, P.H., Schaffner, C., 1984. 4-Nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolite from nonionic surfactants. *Science* 25, 623–625.

Harries, J.E., Sheahan, D.A., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Routledge, E.J., Rycroft, R., Sumpter, J.P., Tylor, T., 1996. A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15 (11), 1993–2002.

Hildebrandt, A., Lacorte, S., Barceló, D., 2007. Partitioning of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates between water and organic solvents. Assessment of priority pesticides, degradation products and pesticide adjuvants in groundwaters and top soils of agricultural areas of the Ebro river basin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387, 1459–1468.

Isobe, T., Nishiyama, H., Nakashima, A., Takada, H., 2001. Distribution and behaviour of nonylphenol, octylphenol and nonylphenol monoethoxylate in Tokyo metropolitan area: their association with aquatic particles and sedimentary distributions. *Environmental Science and Technology* 35, 1041–1049.

- Jobling, S., Sumpter, J.P., 1993. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: an in-vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology* 27, 361–372.
- John, D.M., House, W.A., White, G.F., 2000. Environmental fate of nonylphenol ethoxylates: differential adsorption of homologs to components of river sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 293–300.
- Johnson, A., Sumpter, J., 2001. Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. *Environmental Science and Technology* 35, 4697–4703.
- Langford, K.H., Scrimshaw, M.D., Birkett, J.W., Lester, J.N., 2005. The partitioning of alkylphenolic surfactants and polybrominated diphenyl ether flame retardants in activated sludge batch tests. *Chemosphere* 61 (9), 1221–1230.
- Latorre, A., Lacorte, S., Barceló, D., 2003. Presence of nonylphenol, octylphenol and bisphenol A in two aquifers close to agricultural, industrial and urban areas. *Chromatographia* 57, 111–116.
- Lee, H.-B., Peart, T., 1995. Determination of 4-nonylphenol in effluent and sludge from sewage treatment plants. *Analytical Chemistry* 67, 1976–1980.
- Naylor, C.G., 1995. Environmental fate and safety of nonylphenol ethoxylates. *Textile Chemist and Colorist* 27, 29–33.
- Patrolecco, L., Capri, S., De Angelis, S., Pagnotta, R., Polesello, S., Valsecchi, S., 2006. Partition of nonylphenol and related compounds among different aquatic compartments in Tiber River (Central Italy). *Water, Air, and Soil Pollution* 172, 151–166.
- Petrovic, M., Díaz, A., Ventura, F., Barceló, D., 2001. Simultaneous determination of halogenated derivatives of alkylphenol ethoxylates and their metabolites in sludges, river sediments, and surface, drinking, and wastewaters by liquid chromatography–mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 73 (24), 5886–5895.
- Petrovic, M., Solé, M., López de Alda, M.J., Barceló, D., 2002a. Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 2146–2156.
- Petrovic, M., Lacorte, S., Viana, P., Barceló, D., 2002b. Pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography–mass spectrometry for the determination of alkylphenolic compounds in river sediment. *Journal of Chromatography A* 959, 15–23.
- Purdom, C.E., Hardiman, P.A., Bye, V.J., Eno, N.C., Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1994. Estrogenic effects of effluents sewage treatment works. *Chemistry and Ecology* 8, 275–285.
- Renner, R., 1997. European bans on surfactant trigger transatlantic debate. *Environmental Science and Technology* 31, 316A–320A.
- Routledge, E.J., Sumpter, J.P., 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Science and Technology* 15, 241–248.
- Snyder, S.A., Keith, T.L., Naylor, C.G., Staples, C.A., Giesy, J.P., 2001. Identification and quantitation method for nonylphenol and lower oligomer nonylphenol ethoxylates in fish tissues. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (9), 1870–1873.
- Staples, C.A., Weeks, J., Hail, J.F., Naylor, C.G., 1998. Evaluation of aquatic toxicity and bioaccumulation of C8- and C9-alkylphenol ethoxylates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 2470–2480.
- Solé, M., López de Alda, M.J., Castillo, M., Porte, C., Ladegaard-Pedersen, K., Barceló, D., 2000. Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from the Catalanian area (NE Spain). *Environmental Science and Technology* 34, 5076–5083.
- Soto, A.M., Justicia, H., Wray, J.W., Sonnenschein, C., 1991. *p*-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from “modified” polystyrene. *Environmental Health Perspectives* 92, 167–173.
- Sumpter, J.P., Jobling, S., Tyler, C.R., 1996. Oestrogenic substances in the aquatic environment. In: Taylor, E.W. (Ed.), *Toxicology of Aquatic Pollution: Physiological, Molecular, and Cellular Approaches*. Cambridge University Press, Falta, pp. 205–224.
- Tsuda, T., Takino, A., Muraki, K., Harada, H., Kojima, M., 2000/2001. Evaluation of 4-nonylphenols and 4-*tert*-octylphenol contamination of fish in rivers by laboratory accumulation and excretion experiments. *Water Research* 35, 1786–1792.
- US EPA, 2006. US EPA Priority Pollutant List on EPA Website. US Environmental Protection Agency (EPA), Washington, DC. Available from: <http://www.epa.gov> <http://www.epa.gov/waterscience/criteria/wqcriteria.html>.
- Ying, G.G., Williams, B., Kookana, R., 2002. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates – a review. *Environment International* 28, 215–222.
- Ying, G.G., 2006. Fate, behaviour and effects of surfactants and their degradation products in the environment – a review. *Environment International* 32, 417–431.

5.3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.3.1. NIVELES DE EDCs Y ACTIVIDAD ESTROGÉNICA EN EL RÍO LLOBREGAT

Después de su uso, los surfactantes y otros EDCs son descargados en las aguas residuales municipales y a continuación son tratados en las EDARs, donde son totalmente o parcialmente eliminados, estando presentes en los efluentes que son vertidos en las aguas superficiales. Por tanto, la principal introducción en el medio ambiente es vía las descargas de aguas residuales de las EDARs en el medio receptor.

Durante el proceso de tratamiento de aguas residuales, algunos de los compuestos biodegradan a compuestos no-tóxicos antes de alcanzar el medioambiente, pero los alquilfenoles etoxilados (APEO) merecen particular atención debido al potencial disruptor endocrino de sus productos de degradación, confirmado por numerosos estudios *in vivo* e *in vitro*. Por tanto, la mayoría de estudios sobre estrogenicidad en el Llobregat están enfocados al estudio de estos compuestos (Solé y col., 2000; Díaz y col., 2002a,b; González y col., 2004; Petrovic y col., 2002a,b; Céspedes y col., 2005; Brix y col., 2010).

En la tabla 5.1. se resumen los principales estudios llevados a cabo en los últimos 17 años (2000-2017) para la determinación de EDCs a lo largo de la Cuenca del río Llobregat, en la parte alta, sus principales afluentes el Anoia y el Cardener, en la parte baja, así como en las entradas y salidas de las depuradoras que descargan agua residual a lo largo de la cuenca del río.

Se refiere una tendencia general de aumento en las concentraciones de los EDCs estudiados desde su nacimiento a su desembocadura, como es lógico, debido a todas las descargas industriales y municipales que va recibiendo a lo largo de su curso (Petrovic y col., 2011), con las concentraciones más altas obtenidas en la riera de Rubí. El rango de concentraciones va desde ng/L a cientos de µg/L.

Tabla 5.1. Concentraciones de compuestos alquilfenólicos ($\mu\text{g/L}$) y hormonas esteroideas (ng/L) detectadas en diversos estudios realizados a lo largo de la cuenca del río Llobregat en el periodo 2000-2017.

Ríos (Cuenca Llobregat)	Año Muestreo	Hormonas esteroideas	Concentraciones (ng/L) agua (ng/g) sedimentos	Comp. alquilfenólicos	Concentraciones ($\mu\text{g/L}$) agua (ng/g) sedimentos	Ensayos estrogénicidad	Referencias
Ríos Anoia y Cardener		Estrógenos y progestógenos	< LOD	NP NPEO	<LOD - 644	Concentración en plasma Vitellogenina (VTG) en carpas macho	(Solé y col., 2000)
Ríos Anoia y Cardener		Estrógenos y progestógenos		NP NPEO	<LOD - 644	Ensayo Recombinante de levaduras (RYA)	(García-Reyero y col., 2001)
Río Anoia España	Enero 2000	-	-	BPA OP, NP NPEC NPEO	nd nd 2.4-15; 0.3-35 11-28	-	(Petrovic y Barceló, 2001)
				BPA OP, NP NPEC NPEO	nd nd; 0.5 – 5.6 nd -4.6 2.2 – 7.4		
Río Anoia España	2002	E2 E1 E3 EE2 DES	nd nd – 3.55 nd – 3.67 nd – 3.67 nd – 3.67	–		–	(López de Alda y col., 2002)
Río Cardener España		E2 E1 E3 EE2 DES	nd nd – 3.55 nd – 3.67 nd – 3.67 nd – 3.67	–		–	
Río Llobregat España	2001?	E2 E1 E3	nd 8.0 (media) 6.3 (media)	OP NP	nd-2.97 nd- 21.9	Ensayo Recombinante de levaduras (RYA) En sedimentos	(Petrovic y col., 2002a, 2002b)
Cuenca del río Llobregat (ríos Llobregat, Anoia y Cardener)	2001	E2 E1 E3	nd nd- 10.2 (no pub) nd-XX (no pub)	BPA OP NP NP ₁ EO NP ₂ EO	nd-2.97 nd- 21.9 nd-37.3 nd-6.8 nd-3.17	Ensayo Recombinante de levaduras (RYA)	(Céspedes y col., 2005)

Ríos (Cuenca Llobregat)	Año Muestreo	Hormonas esteroideas o APs, APEOs	Concentraciones (ng/L) agua (ng/g) sedimentos	Comp. alquilfenólicos	Concentraciones (µg/L) agua (ng/g) sedimentos	Ensayos estrogenicidad	Referencias
Cuenca del río Llobregat España	Jun 2005	OP NP OP ₁ EC OP ₂ EC	bld / bld , 0-64 2-79 /bld bld-9 / bld	OP NP OP ₁ EC OP ₂ EC	0.04-0.23 0.04-0.45 bld-2.43 bld-2.22	Ensayo Recombinante de levaduras (RYA)	(Brix y col., 2010)
	Oct 2005	NP ₁ EC NP ₂ EC NP ₂ EO Suma NPEO	bld / bld-241 bld-77 / bld-535 bld-233 / bld-535 bld / bld 6-30 / bld-8	NP ₁ EC NP ₂ EC NP ₂ EO Suma NPEO	0.06-5.13 0.40-30.62 bld-0.27 0.17-2.36		
	May 2006 Nov 2006	OP NP OP ₁ EC OP ₂ EC NP ₁ EC NP ₂ EC NP ₂ EO Suma NPEO	bld / bld-3 3-30 / bld-35 bld / bld-2 bld / bld-31 bld / bld-3 bld-24 / 2-13 bld-17.02 / bld-31 16-119	OP, NP OP ₁ EC OP ₂ EC NP ₁ EC NP ₂ EC NP ₂ EO Suma NPEO	bld-0.88 / bld 0.05-0.53 / 0.02-0.14 bld-1.33 / bld-2.18 bld-1.57 / bld-2.47 0.08-6.11 / bld-3.49 0.15-11.74 bld / bld-6.04 0.15-1.29 / bld		
Portugal: Ria de Aveiro. Ríos Águeda and Vouga Ríos Casler and Antua	Ago 2006	-	-	BPA OP NP NP1EC NP1EO NP2EO	nd-5.4 / 23-683 nd-1.7 / nd-2.3 nd / 56-233 4.9-44 / 463-6150 nd-19 / 21-156 nd-145 / 9.7-180	-	(Jonkers y col., 2010)
Río Ebro, Río Llobregat, Río Júcar, Río Guadalquivir España	2010-2011	E2 E1 E3 EE2 DES E1-3S E3-3S E2-17G E1-3G E3-16G	nd - 7.8 nd - 7.3 nd - 5.7 nd - 2.2 nd nd - 9.3 nd - 13 nd - 7.2 nd - 8.4 nd - 13	BPA OP NP OP ₁ EC NP ₁ EC OP ₁ EO NP ₁ EO OP ₂ EO NP ₂ EO	nd - 649 nd - 85 nd - 391 nd - 1.25 nd - 1546 nd nd nd - 33 nd - 882	-	(Gorga y col., 2015)
Río Llobregat Río Anoia y Carner Riera de Rubí 2 EDARs y 1ETAP (Llob)		E1 E2	bld-40 bld-30	NP t-OP	bld-1.38 bld-0.022	-	(Rubirola y col., 2017)

Se observa una tendencia general de los surfactantes a disminuir (Gonzalez y col., 2004). Este descenso en los niveles de compuestos alquilfenólicos es debido probablemente a la restricción de uso de estos compuestos en detergentes domésticos y ciertos usos industriales impuesta por la Directiva 2003/57/CE y a la progresiva sustitución por otros compuestos más degradables, como alcoholes etoxilados (AEO), motivo por el cual se incluyeron los AEOs en el PVA llevado a cabo en el río Llobregat en esta tesis. Adicionalmente el Reglamento REACH ha incluido el NP y el OP en la lista de sustancias candidatas a SVHC (*Substances of Very High Concern*) que requieren una autorización de la ECHA para ser comercializadas. Este descenso en las concentraciones de compuestos alquilfenólicos comparado con estudios previos en la cuenca del río Llobregat, sugiere una mejora en el estatus medioambiental debido a un descenso de la presencia de EDCs en el río. Así, se observa un descenso significativo en los niveles de NP y OP desde el 2000, lo cual sugiere una retirada gradual y reemplazo de APEOs en la industria textil y de curtidos en España (Gorga y col., 2015). En los estudios más recientes en el Llobregat, se han detectado niveles de OP y NP muy inferiores, 0.085 µg/L y 0.391 µg/L respectivamente (Gorga y col., 2015), siendo únicamente inferiores en los ríos en Portugal (Jonkers y col., 2010). Aunque comparando con los niveles obtenidos en otros países, los altos valores de OP y NP detectados en la Riera de Rubí, 21.9 µg/L y 37.3 µg/L respectivamente, han sido los más altos, hay que destacar que estos valores tan altos corresponden a concentraciones máximas localizadas en los puntos más contaminados del tramo bajo del río, con las características de la Riera de Rubí. Por tanto, si comparamos los valores medios obtenidos en la cuenca del Llobregat, o exceptuando los puntos de la Riera de Rubí, los niveles son similares o tan solo ligeramente superiores a los obtenidos en otros ríos europeos.

Con el objetivo de determinar la presencia de varios EDCs seleccionados en aguas y sedimentos y estimar la estrogenicidad del agua, Brix y col., (2010) determinaron los niveles de compuestos alquilfenólicos (NP, OP, NP₁EO, NP₂EO, OP₁EC, OP₂EC, NP₁EC, NP₂EC) estrógenos naturales (E2, E3 y E1), naturales conjugados (E1-3G, E1-3S, E2-17G, E3-16G y E3-3S) y sintéticos (EE y DES) en la parte baja del río Llobregat mediante LC-MS y LC-MS/MS respectivamente y RYA, en 4 campañas de muestreo llevadas a cabo entre 2005 y 2006. Respecto a los compuestos alquilfenólicos, generalmente detectaron niveles bajos en aguas (entre bld y 0.88 µg/L de OP y 0.53 µg/L de NP), NP₁EO no fue detectado en ninguna muestra, mientras que los niveles más altos fueron obtenidos para nonilfenoxi dicarboxilados (NP₂EC), con concentraciones de hasta 30.62 µg/L en agua, seguidos de 6.11 µg/L de NP₁EC, mientras que en sedimentos obtuvieron rangos de concentraciones entre bld-535 ng/g de NP₂EC, seguidos de bld-241 ng/g de NP₁EC, bld-119 ng/g de suma NPEOs y bld-64 ng/g de NP, por la tendencia de estos compuestos a quedar adsorbidos en sedimentos. Se determinó la K_d para varios compuestos alquilfenólicos, mostrando la tendencia esperada de disminución de la K_d con el incremento en la polaridad. Las concentraciones de NP y OP solamente excedieron la media anual de las Normas de Calidad Ambiental de la UE en un punto de muestreo. Sin embargo, el potencial estrogénico calculado superó la concentración de efecto esperada en varios puntos de muestreo, indicando un riesgo potencial. Por tanto, el estudio de Brix y col., recomienda que los futuros valores de NCA o EQS incluyan los compuestos alquilfenólicos etoxilados y carboxilados de cadena corta. Respecto a los estrógenos, los únicos detectados en agua fueron E1 a 1,55 y 4.41 ng/L y su metabolito E1-3S a 0.44 ng/L a bajos niveles en el agua, mientras que en sedimentos no fueron detectados estrógenos en ninguna muestra (Brix y col., 2010).

Gorga y col., estudiaron 31 EDCs y otros compuestos relacionados (10 estrógenos, 8 compuestos alquilfenólicos, BPA, triclosán, 4 parabenos, 2 benzotriazoles, etc) mediante LC-MS/MS en agua del río y sedimentos de la cuenca del río Llobregat junto a otros 3 ríos ibéricos (Ebro, Júcar y Guadalquivir) en 2 campañas de muestreo en 2010 y 2011. Los contaminantes con efectos disruptores endocrinos detectados a niveles más altos en los ríos ibéricos fueron los compuestos alquilfenólicos y otros químicos industriales. La cuenca del Llobregat fue la más contaminada, con concentraciones superiores en algunos puntos cerca de la desembocadura. Detectaron los niveles más altos de compuestos alquilfenólicos, con concentraciones medias de NP₁EC alrededor de 100 ng/L en puntos de muestreo con alto impacto agrícola, industrial o humano, cerca de grandes ciudades o de áreas industriales en la cuenca del río Llobregat (por ejemplo, en los dos últimos puntos correspondientes a la Riera de Rubí). El estudio confirmó la presencia de mezclas complejas de contaminantes no regulados, aumentando la preocupación sobre sus potenciales efectos interactivos. Las hormonas naturales y sintéticas fueron detectadas a bajos niveles, con máximos de 16 ng/L y 7 ng/g en aguas y sedimentos, sin embargo, contribuyeron a más del 80% de la estrogenicidad total de las muestras, que fue inferior a 8 ng/L y 2.5 ng/g EEQ en aguas y sedimentos respectivamente, lo cual sugiere un bajo riesgo para los organismos acuáticos (Gorga y col., 2015).

Posteriormente, Huerta y col., desarrollaron un método analítico basado en PLE seguido de SPE y análisis mediante UPLC-MS/MS, para la determinación de 44 fármacos y 13 EDCs en biofilms naturales de una zona del río Llobregat con vertidos de una EDAR. Los biofilms de ríos son indicadores excepcionales de acumulación de contaminación de los compuestos emergentes analizados. Adicionalmente, evaluaron la persistencia, distribución y bioacumulación de estos contaminantes en el biofilm. Entre otros, determinaron estrógenos, BPA, parabenos y retardantes de llama. Obtuvieron unas recuperaciones de 32–93% para los EDCs y unos límites de detección del método en el rango de 0.2–2.4ng/g⁻¹. Detectaron cinco EDCs y siete fármacos en las muestras a concentraciones hasta 100 ng/g⁻¹ (Huerta y col., 2016).

Recientemente, Rubirola y col., desarrollaron un método analítico basado en SPE on-line y análisis mediante LC-MS/MS, para la determinación de 24 sustancias prioritarias de la Directiva Marco del Agua incluyendo pesticidas, fármacos, estrógenos y compuestos fenólicos. en aguas, con límites de cuantificación entre 0.3-4.8 ng/L, con patrones marcados para evitar el efecto matriz. Se han obtenido concentraciones hasta 63 ng/L de NP en el río Llobregat y 138 ng/L en la Riera de Rubí y 22 ng/L de OP. Se ha detectado E1 en varias muestras del río Llobregat y su afluente Anoia entre 0.7 y 6.8 ng/L, con los niveles más altos en la Riera de Rubí (4.3- 34 ng/L) y en efluentes de EDARs en su cuenca (8.6- 40 ng/L) (Rubirola y col., 2017).

Comparando los niveles detectados en 2001 con los de estudios posteriores en la cuenca del Llobregat reflejados en la tabla 5.1. en general se observa que:

- Los niveles detectados en las muestras correspondientes a 2005-2006, 2010-2011 y 2015 por diversos autores (Brix y col., 2010; Gorga y col., 2015; Rubirola y col., 2017) son inferiores a los tomados en marzo de 2001 en este estudio (Céspedes y col., 2005), reflejando la tendencia de descenso en las concentraciones de compuestos alquilfenólicos en el medio acuático.
- Los niveles más altos fueron obtenidos para APs y APECs, es decir, metabolitos de los alquilfenoles etoxilados de cadena larga (NP₁EC en el estudio de Gorga y col., mientras que en el de Brix y col., NP₂EC en aguas, y NP₂EC y NP en sedimentos).

- Respecto a los puntos de muestreo, las mayores concentraciones fueron detectadas en todos los casos en la Riera de Rubí y en el punto situado posteriormente a la ETAP de St. Joan Despí, donde desemboca el agua que desvía previamente el canal de la Riera de Rubí.

EFECTOS BIOLÓGICOS: Para conectar el gap entre la contaminación química y el estado ecológico, se requiere la aplicación de bioensayos indicando efectos a nivel celular, de organismo o población en pruebas en el laboratorio y relacionando efectos medibles de muestras medioambientales complejas a distintos tóxicos (Brack y col., 2007). Para obtener una caracterización óptima de los sistemas acuáticos combinando análisis químico y evaluación de efectos biológicos, varios artículos concluyen que es clave la necesidad de realizar estudios más avanzados sobre la utilidad de las respuestas de bioensayos *in situ* en detectar efectos sutiles y/o agudos en organismos acuáticos expuestos crónicamente a múltiples factores medioambientales y/o a niveles de contaminantes (Maltby y col., 2007).

Efectos estrogénicos: La cuenca del río Llobregat fue la primera cuenca española en la que se puso de manifiesto la existencia de fenómenos de feminización en peces, ocasionados por la presencia de EDCs con actividad estrogénica. Este preocupante hallazgo tuvo lugar en el curso de un programa de vigilancia llevado a cabo entre los años 1999 y 2002 en el que los niveles de estrógenos y detergentes de tipo alquilfenol etoxilado medidos en aguas y sedimentos en los ríos Anoia y , dos de los principales afluentes del Llobregat, fueron positivamente correlacionados con efectos de tipo estrogénico en peces, efectos que quedaron evidenciados por la presencia de concentraciones anormalmente elevadas de vitelogenina (VTG) plasmática (indicador de exposición a compuestos estrogénicos) en carpas y la existencia de peces *intersex* (es decir, peces con órganos reproductores masculinos y femeninos simultáneamente) (Solé y col, 2000; Petrovic y col., 2002a).

Vitelogenina (VTG): La producción de VTG en machos es una medida de la estrogénicidad ampliamente aceptada, ya que la VTG es una proteína precursora de la yema de huevo sintetizada naturalmente solo en peces hembra y por tanto se utiliza como indicador de exposición a compuestos estrogénicos (Matozzo y col., 1998). Algunos estudios relacionaron el aumento de VTG en muestras de plasma de carpas (*Cyprinus carpio*) con la presencia de NP a sitios cercanos a EDARs (Solé y col., 2000) y compuestos alquilfenólicos en muestras de agua y sedimentos y a estrona y estriol en agua (Petrovic y col., 2002b). Es más, los niveles de VTG mRNA en el hígado de los mismos peces fueron atribuidos a la presencia de derivados de NP en este río (García-Reyero y col., 2004). En un estudio realizado por Solé y col (2003), se caracterizaron carpas del río Anoia de acuerdo a varios parámetros (VTG en plasma, VTG en hígado, estradiol, testosterona, capacidad metabolizante de xenobióticos en el hígado) y se clasificaron en 3 grupos: hembras aparentemente normales, machos aparentemente normales y peces afectados (Solé y col., 2003). Los resultados obtenidos mostraron un contenido en VTG altamente variable en todos los grupos y un metabolismo de xenobióticos aumentado en el grupo de peces afectados. Se observó un incremento en VTG, hormonas sexuales y la mayoría de actividades enzimáticas de enero a marzo, pero fue atribuida a temperaturas del agua más altas. El estudio resalta la necesidad de ampliar la investigación en la capacidad reproductiva de los peces afectados (Solé y col., 2003). Los peces son muy importantes desde el punto de vista de la ecotoxicología al ser el grupo más diverso de vertebrados y ocupar la mayor parte de los ecosistemas acuáticos. Son especies susceptibles a la contaminación que responden con gran sensibilidad a los cambios del ambiente acuático y por tanto constituyen modelos muy útiles para determinar los efectos de la contaminación ambiental sobre la función reproductiva de los vertebrados. Algunas especies

representan especies superiores de la cadena trófica y son susceptibles a la biomagnificación y bioacumulación de los metales pesados y de contaminantes orgánicos.

Ensayo de Levaduras Recombinantes (RYA): también se ha utilizado el RYA para determinar la presencia de EDCs, ya que este ensayo determina la estrogénicidad total de las muestras, mostrando en general una buena correlación con los análisis químicos llevados a cabo. Así, por ejemplo, (García-Reyero y col., 2001) detectaron una respuesta estrogénica en las zonas de los ríos Anoia y Cardener aguas debajo de las descargas de las EDARs inferior que en las entradas de las EDARs (excepto en la salida de la EDAR de Manresa). En el estudio llevado a cabo en esta tesis (Céspedes y col., 2005) se detectaron positivos en el río Anoia y en el tramo bajo del Río Llobregat, mostrando una actividad estrogénica atribuida principalmente a la presencia de NP, y solo puntualmente a los estrógenos detectados esporádicamente, y más baja en la cuenca del río que en las muestras de EDARs (con la excepción de los puntos situados en la Riera de Rubí). Aunque la actividad estrogénica más alta fue detectada en las entradas de las EDARs, en la mayoría de los casos fue eliminada de forma eficiente con porcentajes de eliminación entre el 70 y 90%.

Tal y como se ha indicado en el apartado 3.1.3.5., de la introducción (Combinación de Técnicas biológicas y químicas de la introducción), Fernández y col., realizaron un procedimiento de fraccionamiento de las muestras para llevar a cabo la Identificación y Evaluación de la Toxicidad (TIE), demostrando que la fracción que contiene los compuestos alquilfenólicos (NP, NP₁EO y NP₂EO) fue la determinante para los valores de estrogénicidad detectados, mientras que las otras dos fracciones, que contenían BPA y las hormonas esteroideas naturales y sintéticas y sus conjugados, fueron las de menor actividad estrogénica debido al bajo nivel de estrógenos detectados, resultando no estrogénicas (Fernández y col., 2009).

5.3.2. Río Llobregat: Niveles de EDCs en aguas superficiales y residuales mediante LC-MS(MS) y determinación de la estrogénicidad (RYA). Correlaciones

A continuación, se muestran los gráficos 5.11, 5.13, 5.14 y 5.15 con las concentraciones ($\mu\text{g/L}$) detectadas para cada uno de los EDCs analizados, y se compara y correlacionan estos datos con los gráficos resultantes del ensayo RYA, que proporciona la actividad estrogénica total de la muestra, expresada en unidades arbitrarias (a.u.).

La correlación entre el perfil químico de las muestras de agua y el perfil obtenido para la actividad estrogénica, no siempre resulta clara y directa. El bioensayo RYA mide la estrogénicidad de la muestra sin tener en cuenta la identidad del compuesto químico responsable de la actividad. En algunos casos, ciertos compuestos estrogénicos juntos pueden presentar un efecto estrogénico mayor que el efecto aditivo de cada uno por separado, por el efecto sinérgico, así como puede darse un efecto antiestrogénico y disminuir la estrogénicidad total de la muestra (Kortemkamp y col., 2007). En la interpretación de estos gráficos se ha de tener en cuenta que, no es más estrogénica la muestra que presente un nivel más alto en la primera dilución, si únicamente presenta ésta; es decir, cuando los niveles de estrogénicidad se mantienen en la segunda dilución o en el resto, es indicativo de una mayor actividad estrogénica.

Aguas superficiales del río Llobregat: En la figura 5.8. se muestra (a) la evolución de las concentraciones de los EDCs ($\mu\text{g/L}$) obtenidas mediante LC-MS para cada uno de los compuestos analizados a lo largo de la cuenca del río Llobregat, desde su origen hasta la desembocadura, así como (b) las diluciones obtenidas en la determinación de la actividad estrogénica mediante el ensayo RYA. Se observa la tendencia general de aumento de contaminación a lo largo del río Llobregat: tras un aumento en la estrogenicidad y concentración de compuestos en los tres primeros puntos (de la Pobla de Lillet a Manresa), se produce una disminución en el cuarto punto y un progresivo aumento hasta la desembocadura, siendo los dos últimos puntos, correspondientes a la Riera de Rubí, los que registran un mayor nivel de contaminación, tal y como se refleja (a) en las concentraciones obtenidas mediante LC-MS, especialmente altas para los compuestos nonilfenólicos, y (b) en los valores de dilución seriada del ensayo de levaduras recombinantes.

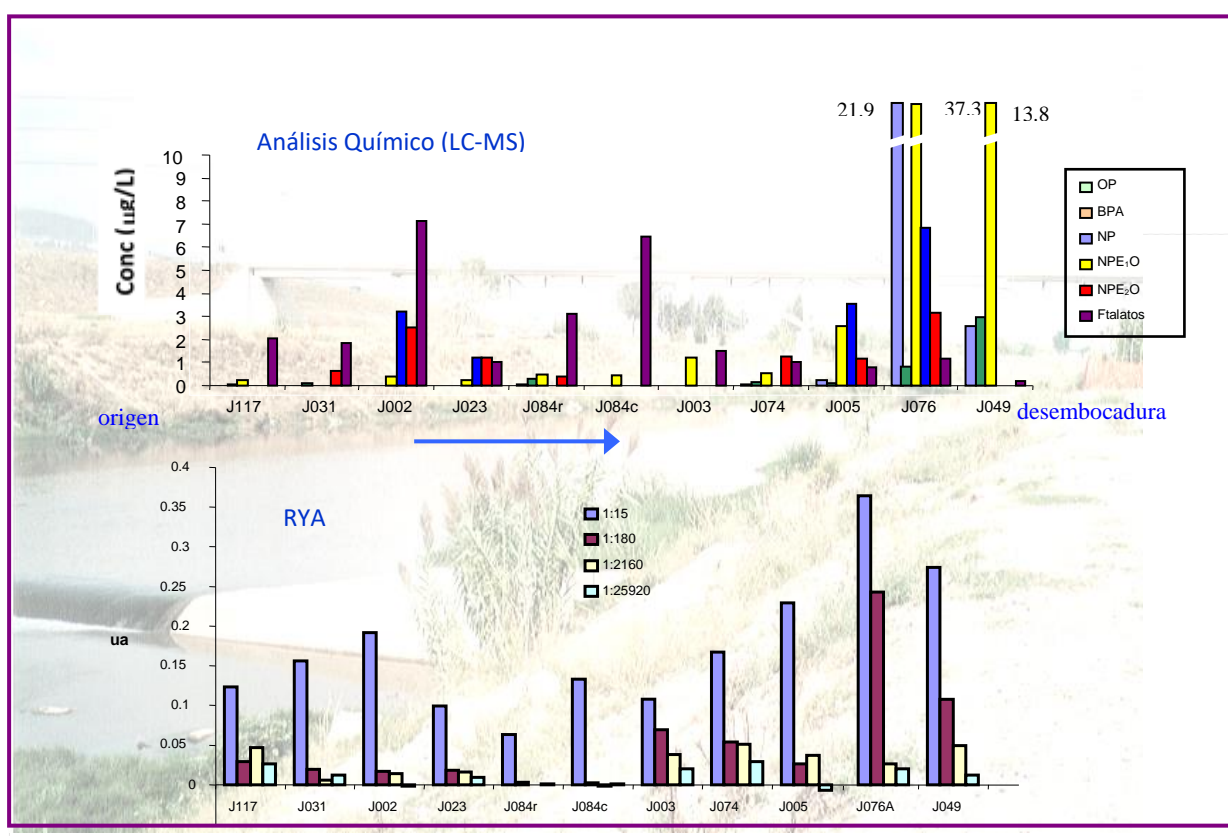


Figura 5.8. Correlación de análisis químico mediante LC-MS (a) y RYA (b) obtenida en los 10 puntos de muestreo de agua superficial en la cuenca del río Llobregat desde el origen hasta la desembocadura.

El perfil estrogénico a lo largo de la cuenca del río Llobregat (b) coincide bastante con los resultados obtenidos del análisis químico mediante LC-MS (a), siguiendo la tendencia general de aumento a medida que nos desplazamos más hacia la desembocadura del río. Destaca el punto J002, correspondiente a aguas del Cardener, afluente del Llobregat. La figura del análisis químico sugiere que el nivel de compuestos estrogénicos en este punto es muy superior a otros como el J031 o el J023, lo cual no queda reflejado en el gráfico del RYA. No obstante, si examinamos con más detenimiento la identidad de los compuestos más abundantes en J002, se observa que la mayor concentración corresponde a los ftalatos, compuestos de bajo potencial estrogénico; los niveles de OP, NP o BPA en este punto son mucho más bajos, por lo cual el resultado obtenido (la no coincidencia del perfil de estrogenicidad con los niveles químicos en este punto) es lógico. En el punto J084, en Abrera, en el que se tomó una muestra en el río y otra en el canal, vemos como el perfil de estrogenicidad es superior y se relaciona con las concentraciones detectadas por los

ftalatos, y como la muestra procedente del canal presenta un estrogénicidad ligeramente superior a la del río, posiblemente reflejo de los niveles más elevados de ftalatos detectados en el canal.

El perfil de actividad estrogénica, así como los valores detectados por LC-MS, van aumentando de nuevo en los puntos J074 y J005. Los últimos dos puntos, J076 y J049 son los que presentan una actividad estrogénica más alta (con respuesta incluso a dilución 1:180, tal y como vemos en el gráfico), hecho que coincide con los valores encontrados en estos puntos para el NP, OP, NPE₁O, NPE₂O y ftalatos, siendo especialmente elevado en el penúltimo punto de la cuenca, el J076, que corresponde a la Riera de Rubí, muy cargada de contaminantes, debido a que se producen habitualmente vertidos industriales y además presenta episodios torrenciales muy frecuentes. En la foto de la Figura 5.9 se puede ver una imagen de la Riera de Rubí tras una fuerte lluvia. Los mayores niveles obtenidos en esta zona están de acuerdo con estudios previos realizados en el Llobregat (Castillo y col., 2000; Solé y col., 2000; Eichorn y col., 2000; García-Reyero y col., 2001; Petrovic y col., 2002). Por tanto, en este punto se han detectado los valores más elevados para los contaminantes analizados, con 37.3 µg/L de NP, 21.8 µg/L de OP y 6.87 µg/L de NPE₁O. Recientemente se han detectado en este punto valores altos de contaminantes pero bastante inferiores, con 0.138 µg/L de NP, 30 ng/L de E2 y 34.30 ng/L de E1 (Rubirola y col., 2017). Finalmente, en el último punto (J049), situado aguas abajo de la ETAP de Sant Joan Despí (posterior a la captación y tratamiento de agua de consumo), se han detectado también concentraciones bastante altas, lo cual es lógico, pues corresponde al agua de salida del tubo del Gobernador, que descarga las aguas de la Riera de Rubí previamente desviadas.



Figura 5.9. Concentraciones de NP y OP detectadas en esta tesis en la cuenca del río Llobregat y foto descriptiva de la Riera de Rubí, punto de mayor contaminación (fuente: publicado en el Periódico el 26.10.2005).

En 1960 y 1970, para mejorar la calidad del agua en la captación de la ETAP De Sant Joan Despí, especialmente en periodos de sequía o con vertidos industriales, se desviaron el río Anoia y la riera de Rubí, los afluentes del Llobregat con mayor contribución a la contaminación del río, mediante la construcción de varios sistemas de canales o *bypass* paralelos al río Llobregat y también el uso de sistemas de canales agrícolas. En 1980 y 1990, se conectaron efluentes industriales y urbanos a EDARs. Estos sistemas de protección no siempre funcionan de forma apropiada, ya sea por episodios de fuertes lluvias o por un mantenimiento inadecuado, causando un gran descenso en la calidad del agua superficial que entra en la planta potabilizadora de Sant Joan Despí (Quintana y col., 2015).

A continuación, se resumen los principales resultados obtenidos para cada familia de compuestos:

Compuestos alquilfenólicos: Los valores de APs y APEOs obtenidos en la cuenca del río Llobregat en 2001, superan los valores establecidos en las Normas de Calidad Ambiental para aguas superficiales continentales (NCA-MA, en inglés EQS); en el caso del NP, las concentraciones obtenidas superaron el valor NCA-MA= 0.3 µg/L en todos los puntos excepto el 1, 2 y 4 (La Pobra de l'Illet, el Pont de Vilomara y Castellbell i el Vilar, J117, J031 y J023 respectivamente), mientras que en el caso del OP, se obtuvieron valores superiores a NCA-MA= 0.1 µg/L en los 3 últimos puntos. Adicionalmente, el NP también supera en los 3 últimos puntos de muestreo el valor de concentración máxima admisible (NC-CMA= 2.0 µg/L) establecido en las Normas de Calidad Ambiental de la Directiva UE de las Sustancias Prioritarias (Directiva 2008/105/EC), aunque generalmente corresponden a los puntos localizados en la zona más contaminada del último tramo del río, como la Riera de Rubí. Por tanto estos puntos constituirían en la actualidad un incumplimiento de la legislación vigente, sin embargo, tal y como ya se ha descrito anteriormente, se ha observado en el Llobregat una tendencia a la disminución general de los niveles de los compuestos alquilfenólicos en aguas y por tanto los niveles detectados actualmente son inferiores (Gorga y col., 2015) y en general no se producen incumplimientos de la normativa vigente, debido en gran parte a la prohibición de compuestos alquilfenólicos establecida en la D. 2003/53/CE, así como al incremento de EDARs en la cuenca del río y a los tratamientos más avanzados.

Bisfenol A: Se ha detectado BPA en el 58% de las muestras. Comparando con otros datos, las concentraciones detectadas han sido similares a las publicadas en otros estudios europeos: en UK (ríos Taff y Ely) (Kasprzyk-Hordern y col., 2008), Alemania (verano 1999) (Vethaak y col., 2005), área central de Italia (mayo 2002) (Laganà y col., 2004) y Portugal (Ria de Aveiro, ríos Águeda y Vouga, Ria, Casler y Antua, agosto 2006) (Jonkers, 2010) con niveles de BPA de 68 ng/L, 40 ng/L, 1000 ng/L, 29 ng/L, 5.4 ng/L y 683 ng/L, respectivamente.

Ftalatos: DEP y DEHP son los ftalatos más detectados, con valores que oscilan entre 0.20 y 12.96 µg/L y los niveles más altos corresponden al tramo anterior a la EDAR de Manresa, situado en el río Cardener. DBP fue detectado en menos puntos y a niveles inferiores, mientras que BBP y DMP no han sido apenas detectados. Tal y como ya se ha descrito anteriormente, la contaminación durante el proceso de extracción y análisis es crítica para realizar una determinación de ftalatos fiable, por lo cual hay que extremar las precauciones y realizar blancos para garantizar la calidad de los resultados.

Estrógenos: En referencia a los estrógenos, presentes en el medioambiente a niveles inferiores (ng/L) pero con una fuerte actividad estrogénica, con el fin de confirmar los niveles obtenidos en los puntos en los que se observan mayores estrogénicidades o se ha detectado previamente su presencia mediante LC-MS, se realizó un análisis confirmatorio de estas muestras mediante LC-MS/MS, técnica analítica más sensible.

Los esteroides más frecuentemente monitorizados a lo largo del río Llobregat (ver tabla 5.1.) son: estriol (E3), estrona (E1) y estrona sulfato (E1-3S), el principal metabolito del estradiol (E2) (Petrovic y col., 2002b; Rodríguez-Mozaz y col., 2004b; Kuster y col., 2008; Brix y col., 2010; Lopez-Roldan y col., 2010), no sobrepasando 40 ng/L en ningún caso. Los estrógenos E1 y E1-3S, han sido detectados a menudo en el Llobregat a niveles cercanos a los que pueden poner en peligro a organismos acuáticos, ya que se considera suficiente una concentración de 1-10 ng/L para causar efectos estrogénicos (Solé y col., 2000; López de Alda

y col., 2002; Petrovic y col., 2002b; Rodríguez-Mozaz y col., 2004b y 2006; Kuster y col., 2008; Brix y col., 2010).

De los estrógenos analizados en este estudio, solamente fueron detectados los que tienen menor potencial estrogénico: E1 con niveles entre 5.76 y 10.2 ng/L, su metabolito conjugado, E1-3S a 0.8 ng/L y E3 a 3.1 ng/L. Sin embargo, los compuestos con mayor potencial estrogénico: la hormona natural estradiol (E2) y las sintéticas etinil estradiol (EE) y dietilstilbestrol (DES), no fueron detectadas. Los niveles obtenidos están de acuerdo con estudios realizados en el Llobregat tanto previamente (Rodríguez-Mozaz y col., 2004) como posteriormente (Kuster y col., 2008; Brix y col., 2010; López-Roldán y col., 2010). Así, en un estudio realizado por Rodríguez-Mozaz y col., en las etapas del tratamiento de la ETAP de SJD, en el río Llobregat, se detectó 0.68 ng/L de E1 en el agua de entrada y 0.33 ng/L de su metabolito E1-3S que fueron eliminados a lo largo de proceso en la potabilizadora (Rodríguez-Mozaz y col., 2004b). Las concentraciones más altas fueron detectadas en la Riera de Rubí (canal que recibe agua del río Anoia) y el *by-pas* de la EDAR de Sant Feliu para pasar esta agua a un punto aguas debajo de la potabilizadora de Sant Joan Despí y cerca de Castellvell, un área influenciada por actividades urbanas.

Evaluando los datos contenidos en la tabla 5.1., se observa que en los primeros estudios realizados en el Llobregat no consta la presencia de estrógenos, pero esto es debido a que se determinaron mediante LC-MS (o GC-MS) y generalmente no fueron detectados. Sin embargo, la incorporación de técnicas de análisis más avanzadas (LC-MS/MS) han permitido detectar puntualmente los estrógenos y progestógenos a niveles de bajos ng/L y por tanto han hecho posible la detección de estos compuestos en varios puntos del río Llobregat. Así, Solé y col., (2000) evaluaron los estrógenos representativos, ambos naturales y sintéticos y la hormona natural progesterona, en varios puntos de los afluentes Anoia y Cardener, pero fueron detectados únicamente bajo los límites de detección (Solé y col., 2000). En estudios posteriores, tal y como hemos visto, se detectaron estrógenos en 2005 y 2006 1,55 y 4.41 ng/L de E1 y 0.44 ng/L de su metabolito E1-3S en el agua, mientras que en sedimentos no se detectaron en ninguna muestra (Brix y col., 2010): posteriormente se detectaron estrógenos en 2011 a concentraciones que no superaron los 16 ng/L en agua y 7 ng/g en sedimentos (Gorga y col., 2015), mientras que en 2015 alcanzaron 40 ng/L y 30 ng/L de E1 y E2 respectivamente (Rubirola y col., 2017).

Aguas residuales de EDARs en el río Llobregat: Las EDARs han sido identificadas como una de las principales fuentes de EDCs en ecosistemas acuáticos (Daughton y col., 1999; Petrovic et al., 2002). La amenaza de los vertidos de estos contaminantes a través de los efluentes de las EDARs es particularmente preocupante en arroyos o pequeños ríos, en los que la capacidad de dilución del ecosistema receptor de agua dulce es reducida (Brooks y col., 2005).

En referencia a las muestras correspondientes a las entradas y salidas de las 4 depuradoras estudiadas en la cuenca del río Llobregat, Manresa, Tarrasa, Igualada y Martorell, a continuación se presentan los gráficos con las concentraciones ($\mu\text{g/L}$) detectadas para cada uno de los EDCs analizados mediante LC-MS, y se compara y correlacionan estos datos con los gráficos resultantes del ensayo con levaduras recombinantes (RYA), que proporciona la actividad estrogénica total de la muestra, expresada en unidades arbitrarias (a.u.).

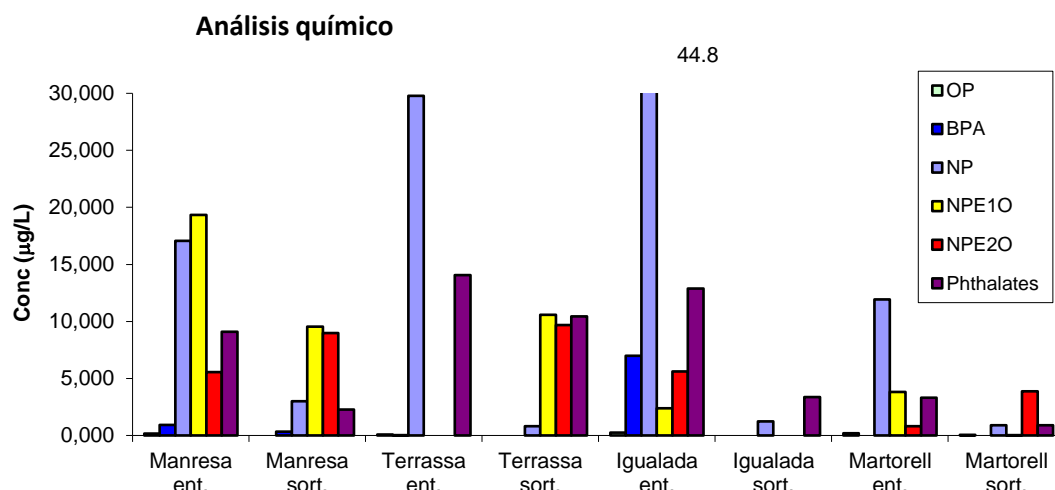


Figura 5.10. Concentraciones (µg/L) obtenidas para los diferentes EDCs en las EDARs del Llobregat.

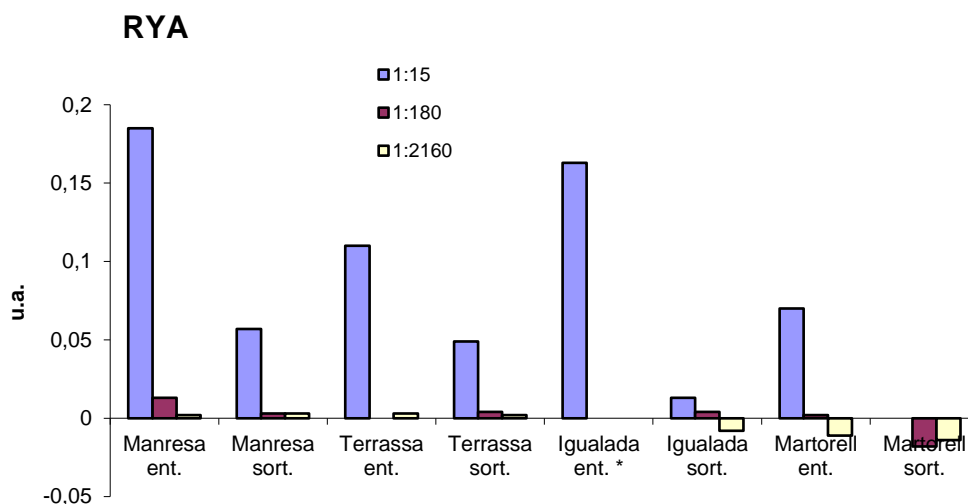


Figura 15.11. Actividad estrogénica de las aguas residuales de las depuradoras de la cuenca del Llobregat.

Respecto a la Fig. 15.11., que representa la actividad estrogénica de las aguas residuales de las EDARs del Llobregat, no se observa una estrogénica muy elevada en ninguna muestra. La EDAR de Igualada, con niveles altos de NP y BPA, debería presentar un efecto estrogénico superior al de otras EDARs, pero debido a que en esta depuradora no hay datos para la dilución 1:180, no se puede corroborar esta tendencia. Los valores obtenidos por debajo del eje cero, significan únicamente que se encuentran por debajo de la media del valor tomado como referencia, es decir, en estos puntos no hay actividad estrogénica. La interpretación de los resultados del RYA resulta en ocasiones complicada. El efecto detectado mediante estos ensayos es el conjunto de los compuestos individuales, cada uno con una potencia estrogénica diferente.

La conclusión más importante que se observa de los ensayos biológicos realizados (RYA) es que la estrogénica de las aguas residuales disminuye en los efluentes, después del proceso de tratamiento de las EDARs, resultado que se corresponde con los datos químicos, indicando el buen funcionamiento de las estaciones depuradoras analizadas.

Respecto a la correlación entre los datos químicos (figura 5.10) y del RYA (figura 5.11), tal y como se observa en estas figuras, el perfil estrogénico no se corresponde exactamente con el análisis químico para las aguas residuales analizadas, lo cual probablemente sugiere que estas muestras, de matriz más compleja, contienen EDCs no identificados mediante LC-MS, y por tanto necesitan caracterización química utilizando metodologías instrumentales más selectivas y específicas, por lo cual se realizó un análisis posterior de las muestras seleccionadas mediante LC-MS/MS con la finalidad de confirmar la presencia y niveles de estrógenos en las muestras. Las principales conclusiones obtenidas de la comparación del análisis químico y el RYA fueron:

- Las muestras de agua correspondientes a las EDARs de Terrasa e Igualada tienen efectos matriz y por tanto los niveles de RYA son inferiores.
- El influente de Martorell tiene una estrogénicidad superior que las concentraciones químicas de los compuestos alquilfenólicos (APs y APEOs), ya que en esta muestra se detectó estrona (E1).
- La entrada a la EDAR de Manresa y los dos puntos de muestreo localizados en la parte baja del río, altamente contaminado, tienen altos niveles, tanto de concentraciones químicas como de estrogénicidad determinada por RYA.

En conclusión, los resultados obtenidos, en los que se observan niveles inferiores o similares de EDCs en los efluentes estudiados respecto a las aguas superficiales, demuestran que las cuatro EDARs situadas en el Llobregat controlan eficazmente los vertidos urbanos, eliminando la principal carga contaminante durante la depuración de las aguas. La integración del ensayo RYA al análisis químico mediante LC-MS, con una buena correlación, ha demostrado la eficacia de las EDARs eliminando la actividad estrogénica y el bajo nivel de estrogénicidad en el río Llobregat.

A continuación se resumen los niveles obtenidos para cada una de las familias de EDCs estudiadas:

Compuestos alquilfenólicos: Las concentraciones de los NPEOs en las entradas de las EDARs son significativamente más altas que en los efluentes. Durante los procesos de tratamiento en las EDARs, los APEOs de cadena larga son parcialmente degradados a través de la disociación de cada unidad etoxi en NP₁EO y NE₂EO y NPECs, mediante secuencias anaeróbicas (APEOs) y aeróbicas (APECs) respectivamente (Mayor y col., 2007), dando finalmente el producto de degradación NP. Diversos estudios citan que la reducción de la concentración de NP durante los tratamientos de las EDARs principalmente debida a la adsorción del NP en el fango (Soares y col., 2008). En las depuradoras de Igualada y Terrasa se observa una mayor eliminación de NP, y por tanto se dará una mayor absorción en el fango. En particular, en la Fig. 5.13. se observa que los niveles de NP se reducen en las 4 depuradoras estudiadas, NP₁EO se reduce en todas las EDARs excepto en Manresa, mientras que la concentración de NP₂EO aumenta en los efluentes excepto en la EDAR de Igualada.

Diversos estudios llevados a cabo en el periodo 2000-2004 (Farré y col., 2001; Petrovic y col., 2001; Rodríguez-Mozaz y col., 2004a; Céspedes y col. 2005), detectaron concentraciones significativamente más altas, preocupantes medioambientalmente que los estudios posteriores (Kuster y col., 2008; Brix y col., 2010; Gorga y col., 2015). Esta reducción de contaminación es debida probablemente, tal y como se ha descrito anteriormente, al incremento en EDARs en la cuenca del río y la incorporación de tratamientos terciarios en depuradoras ya existentes, así como a la reducción específica del uso de algunos contaminantes, como es el caso de los alquilfenoles, debido a la legislación establecida posteriormente a los estudios llevados a cabo en esta tesis, como por ejemplo la D. 2003/53/EC.

Bisfenol A: El BPA está generalmente presente con concentraciones mayores en EDARs con agua industrial que en las de origen urbano (WHO, 2012). El BPA es fácilmente eliminado durante procesos de tratamiento de fango activado por mecanismos de biodegradación (Staples y col., 1998), aunque en algunos casos no es totalmente eliminado. Se ha detectado en el 58% de las muestras a niveles inferiores a 6.98 µg/L correspondiente a la entrada de Igualada, único punto en el que supera los 2 µg/L, nivel a partir del cual se ha descrito que puede causar efectos estrogénicos en peces (Krishnan y col., 1993), mientras que no se ha detectado su presencia en las EDARs de Terrasa ni Martorell. Siguiendo el principio de precaución, deberían tenerse en cuenta todos los puntos de muestro en los que se ha detectado BPA, ya que a pesar de la gran controversia y las numerosas publicaciones sobre a partir de que niveles este compuesto puede causar efectos estrogénicos, se sospecha que el BPA puede tener mayor actividad estrogénica a concentraciones inferiores (Vom Saal y col., 2007; Vandenberg y col., 2009).

Ftalatos: La biodegradación es principal mecanismo de eliminación y degradación de ftalatos que entran en las EDARs o son liberados a las aguas superficiales, ya que un amplio rango de bacterias pueden degradarlos bajo condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas. A medida que la longitud de la cadena aumenta y los compuestos son más hidrofóbicos, los procesos de degradación son menos importantes (Net y col., 2015). De las EDARs estudiadas, Terrasa es la que ha registrado mayor nivel de ftalatos. El DEHP, ftalato mayoritario, ha sido detectado en el 79% de las muestras. Aunque las concentraciones en las entradas de las EDARs suelen ser muy altas, DEHP se adsorbe muy bien en partículas de fango de forma que raramente es detectado a altas concentraciones en los efluentes, indicando alta eliminación. Adicionalmente, existe un problema con los blancos, posible explicación de la alta concentración a la salida de algunas EDARs.

Estrógenos y progestágenos: La eliminación durante el tratamiento de agua residual puede variar dependiendo del compuesto y el tipo de tratamiento. Además, las formas conjugadas menos activas en las cuales los estrógenos son excretados, pueden ser desconjugadas por microorganismos durante el tratamiento y liberarse en los efluentes del compuesto como precursor (*parent*) (Petrovic y col., 2004).

En el PVA realizado en esta tesis en la cuenca del río Llobregat, se confirmaron mediante LC-MS/MS las muestras en las que pudo detectarse su presencia pero no cuantificarse mediante LC-MS y/o en aquellas muestras en las que la estrogenicidad total de la muestra obtenida por el RYA, fue superior a las concentraciones individuales del resto de compuestos cuantificados por LC-MS en este estudio. Los niveles detectados están en concordancia con otros estudios, estando al nivel de efectos endocrinos demostrables en especies del medio acuático (Cargouet y col., 2004; Laganá y col., 2004; Vethaak y col., 2005; Barel-Cohen y col., 2006; Gorga y col., 2015).

Tal y como ya ha sido descrito, debido a su estrogenicidad, varios compuestos EDCs de las familias de los alquilfenoles y los estrógenos han sido regulados posteriormente a este estudio, siendo incluidos en diversas listas de contaminantes prioritarios y reguladas:

- NP y OP han sido listadas como sustancias peligrosas prioritarias en el ámbito de la política de aguas por la Directiva 2000/60/EC y la EU Decisión final No. 2455/2001/EC, mientras que
- E1 fue incluida en la lista nº 3 de contaminantes químicos (*CCL 3 List*) de la Agencia de Protección Ambiental (CCL3, EPA, 2001) y E1 y EE2 han sido más recientemente incluidos junto a E2 en la lista de observación de sustancias (*the Watch List*) establecida en la Decisión 2015/494/EC, candidatos para ser

incluidos en la lista de sustancias prioritarias (Directiva 2013/39/EU, 2013). Adicionalmente, en USA, E1, E2, E3 y EE han sido incluidos en la nueva la Lista de candidatos a contaminantes de agua de consumo (CCL4, *Drinking Water Contaminant Candidate List*, 2015) que, aunque no tiene validez como normativa, puede ser incluida en futuros reglamentos (*Environmental Protection Agency U.S. 2012*). Sin embargo, no existen reglamentaciones que limiten la concentración de estrona en el agua, a pesar de ser uno de los estrógenos detectados más frecuentemente en ríos. Lo que existe es un indicativo estimado por *Routledge y col.* donde las concentraciones de estrona, en el rango entre 0,01 y 0,10 µg/L, ejercen efectos estrogénicos en peces (*Routledge y col. 1998*).

5.3.3. Río Ter: Niveles de EDCs en aguas superficiales y residuales mediante LC-MS(MS) y determinación de la estrogénicidad (RYA). Correlaciones

En la figura 5.12. se muestran los gráficos con las concentraciones (µg/L) detectadas para cada uno de los compuestos disruptores endocrinos analizados en el río Ter, y se comparan y correlacionan estos datos con la actividad estrogénica total de la muestra que proporcionan los ensayos RYA llevados a cabo.

ANÁLISIS QUÍMICO: Aguas superficiales de la cuenca del río Ter

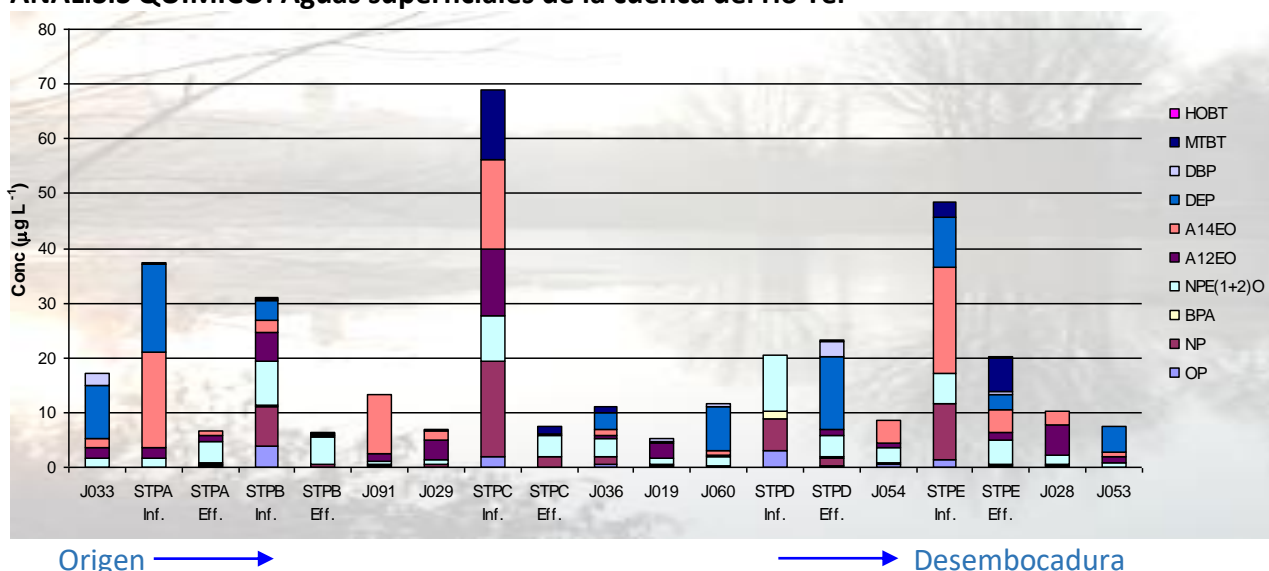


Figura 5.12. Concentraciones totales (µg/L) de los compuestos estudiados en la cuenca del río Ter (en el río y las 4 EDARs estudiadas, desde su origen hasta la desembocadura).

En la Figura 5.12. se observa la evolución de las concentraciones obtenidas en los puntos de muestreo a lo largo de la cuenca del río Ter, desde su nacimiento hasta la desembocadura, incluyendo las entradas y salidas de las EDARs estudiadas que descargan los efluentes a lo largo de la cuenca. Se observa claramente como los niveles más altos se obtienen en las entradas de las depuradoras, especialmente en la EDAR C, y entre las aguas superficiales, los puntos con mayores concentraciones se localizan en el río Gurri.

A continuación, se describen los principales resultados obtenidos del análisis de cada tipo de agua en la cuenca del río Ter:

Aguas superficiales del río Ter: del análisis de la fracción disuelta y particulada se han obtenido los siguientes resultados:

Fase disuelta: los EDCs analizados, compuestos nonilfenólicos y ftalatos, han sido detectados a niveles generalmente bajos, a excepción de los ftalatos en el primer punto, el Pasteral y Torroella de Montgrí (J033, J060 y J053 respectivamente). Se observa que en el Pasteral la estrogenicidad es mayor, coincidiendo con el resultado del análisis químico. Los puntos J033 y J053 en cambio, no presentan actividad estrogénica, por lo cual el nivel de ftalatos registrado en estos puntos puede provenir de alguna contaminación. No obstante, no se puede descartar la presencia de algún compuesto inhibitorio de la actividad estrogénica. La muestra con mayor concentración correspondiente al río Gurri, es aquella en la que se han obtenido valores más altos de carbono orgánico total (TOC de 9.8) y conductividad (3823 $\mu\text{S}/\text{cm}$). El carbono orgánico total (TOC) proporciona una indicación de la concentración de materia orgánica total. Una reducción en los niveles de carbono orgánico proporcionará una mejor calidad del agua.

PM o fracción particulada: la estrogenicidad obtenida correspondiente al material particulado (PM) contenido en los filtros del río Ter es de moderada a baja, sin un efecto estrogénico claro a la dilución 1:180 en ninguna de las muestras, hecho que podría ser debido a que los niveles de compuestos con acción endocrina detectados en los filtros por análisis químico son bajos, como es el caso del NP y OP, compuestos detectados a niveles inferiores a 1 $\mu\text{g}/\text{L}$.

Aguas residuales de EDARs en el río Ter: en el año del muestreo, las EDARs de Torelló y Girona trataban agua mixta tipo 1 y las de Vic y Banyoles agua mixta tipo 2, mientras que la depuradora de Ripoll, que registra menor contaminación, recibe básicamente agua de origen urbano. Las EDARs de Vic y Girona son las que tratan un mayor caudal de agua residual y en 2001 tenían un habitante-equivalente superior a 200.000. Ambas tenían un tratamiento de fangos de digestión anaeróbica, vs la deshidratación llevada a cabo en las otras EDARs, que tratan un volumen inferior de agua residual. Generalmente se detecta mayor contaminación en las EDARs con digestión anaerobia. La EDAR de Vic producía la mayor cantidad de fango (1473 t/mes). Girona era la única EDAR que no tenía eliminación de nitrógeno. La nitrificación durante el fango activado puede aumentar la eficiencia de eliminación (casi completa para NPEOs con n mayor que 6 (Birkett y col., 2003).

Fase disuelta: en general se observan niveles superiores en las entradas de las EDARs (exceptuando el nivel de ftalatos detectado en la salida de la EDAR de Girona). Respecto a la actividad estrogénica de las aguas residuales, se observa estrogenicidad en la mayoría de depuradoras analizadas, pues se mantiene la dilución 1:50 y en algunos casos incluso la 1:250. En Vic y en la entrada de Banyoles los niveles de NP son mayores, no afectando especialmente al perfil de estrogenicidad. Después del proceso de depuración de las EDARs, la actividad estrogénica tendría que disminuir, pero en cambio aumenta en Torelló y ligeramente en Vic, y de forma acusada en Girona.

PM o fracción particulada: los valores más altos de NP se obtuvieron en la entrada de las EDARs de Torelló, Girona y Banyoles, ya que tiene tendencia a quedar absorbido en las fases sólidas por sus propiedades físico-químicas. No se disponen de datos para los filtros de la entrada de Ripoll y Torelló, ni de la salida de Vic, ya que no pudo llevarse a cabo el análisis químico y ensayo RYA con estos extractos. Así pues, la Fig. 5.16 no es concluyente sobre si el tratamiento de estas EDARs disminuye la estrogenicidad. En

Banyoles disminuye, pero en Girona en cambio se observa un comportamiento anómalo, con estrogenicidad mayor en la salida, coincidiendo claramente con los resultados obtenidos para las aguas residuales. La actividad detectada en el PM contenido en los filtros correspondientes a las aguas de Vic, Girona y Banyoles, con efecto estrogénico en la dilución 1:180, es superior al que sugerirían los niveles de NP y OP que se observan en el correspondiente gráfico. Estos compuestos no explican este incremento en el efluente de la depuradora, por lo cual tendría que tratarse de otro/s compuesto/s reactivado/s por el tratamiento de la EDAR.

En la Figura 5.13. se muestra la correlación entre el análisis químico (LC-MS) y el ensayo RYA en las EDARs analizadas en el río Ter. Se diferencian claramente las 2 situaciones detectadas, la normal, con el comportamiento esperado de disminución de concentraciones y estrogenicidad con el tratamiento de la EDAR, mientras que a la derecha se presenta el caso de comportamiento distinto o anómalo, correspondiente a la EDAR de Girona, en la que se obtuvo mayor concentración y estrogenicidad en los efluentes, respecto a los registrados en la entrada de la EDAR.

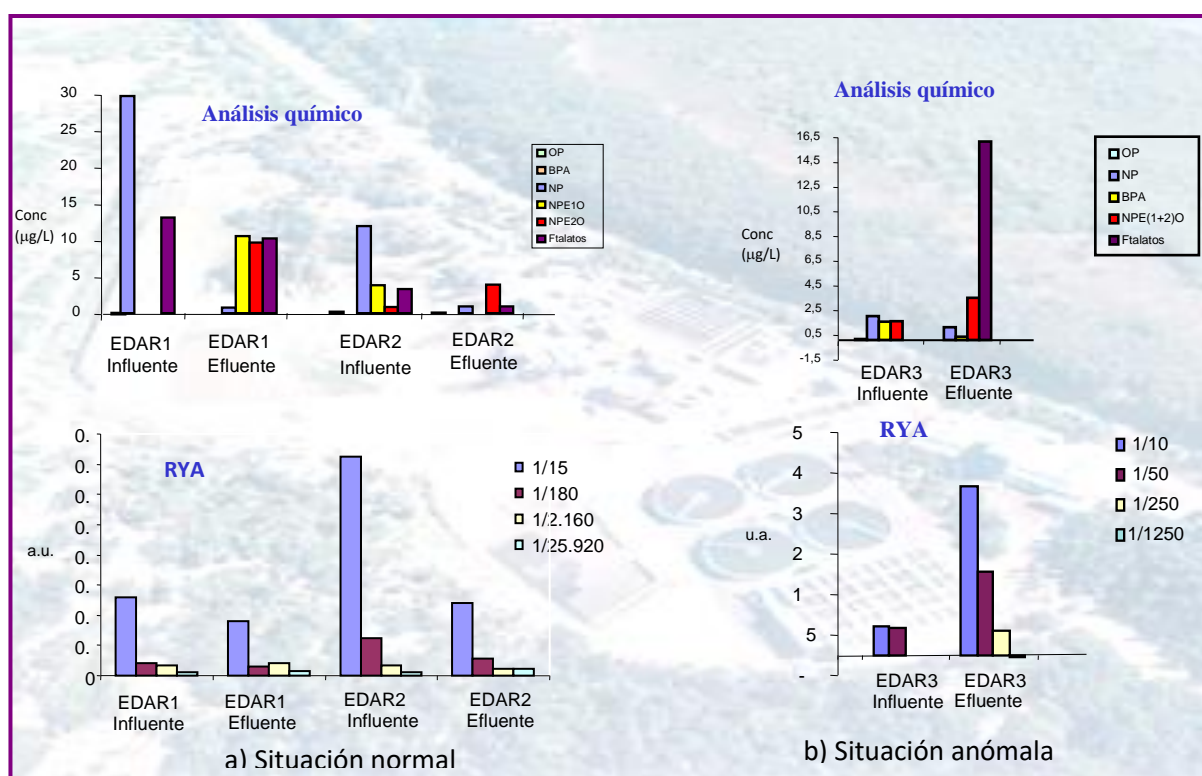


Figura 5.13. Correlación de análisis químico (gráficos superiores) y ensayo recombinante de levaduras (RYA) (gráficos inferiores) en EDARs del río Ter.

a) Situación normal o esperada: se observa una concentración más alta de compuestos orgánicos y una estrogenicidad mayor en la entrada de las EDARs, disminuyendo en el efluente, demostrando la eficacia del tratamiento de depuración aplicado:

- EDAR₁ (STP₁): se observa una clara disminución de NP y un aumento de NPE₁O y NPE₂O en el efluente, consecuencia de la degradación del NP en compuestos de cadena mayor, motivo por el cual el gráfico del RYA refleja una ligera disminución de estrogenicidad. Adicionalmente, se produce un incremento de BPA y un ligero descenso de ftalatos en el efluente de la EDAR

- EDAR₂ (STP₂): las concentraciones de NP y NPE₁O en el efluente son menores, mientras que NPE₂O incrementa, viéndose reflejado en una disminución mayor en la estrogenicidad obtenida mediante el ensayo de levaduras (RYA) y por tanto refleja una mayor efectividad en el tratamiento de depuración. Adicionalmente, se observa una alta eliminación del BPA y los ftalatos en el tratamiento de la EDAR.

b) Situación anómala: se observa una mayor estrogenicidad en el efluente de la EDAR y por tanto corresponde a una EDAR poco eficiente en su tratamiento. Parece coincidir con el análisis químico, que ha detectado un incremento en la concentración de ftalatos y NPE₁₊₂O en el efluente. Esta situación refleja un tratamiento de depuración poco efectivo (o una contaminación por ftalatos). Sin embargo, la baja estrogenicidad de los ftalatos no justificaría por si solo la alta estrogenicidad detectada por RYA en el efluente.

En particular, para cada tipo de contaminantes:

Compuestos alquilfenólicos: La principal fuente de esta familia de compuestos y otros EDCs en el medioambiente son los efluentes de las EDARs (Giger y col., 1984; Sabik Y col., 2003; Soares y col., 2008). Sin embargo, los APEOs no se eliminan completamente en los procesos de tratamiento de aguas residuales, y pueden encontrarse en sedimentos, ríos y en las aguas residuales y fangos de las depuradoras. 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).

Tal y como se ha descrito anteriormente, 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) o *endpoint* (Servos, 1999; Ying y col., 2002; Corvini y col., 2006). Por tanto, las concentraciones en las entradas de las EDARs de los NPEOs de cadena larga son significativamente más altas que las de los efluentes, mientras que, tal y como se observa en la Figura 5.16., la concentración de los NPEOs de cadena corta (NP₁EO, NP₂EO) incrementa durante el proceso de depuración, especialmente en la EDAR 1. En cambio, respecto al NP, contaminante ubicuo en el medioambiente, se observa como las concentraciones se reducen durante el tratamiento en las EDARs, sin embargo, se cree que es más debido 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). Los niveles de NP presentan variaciones estacionales con concentraciones más altas en verano debido al aumento de actividad microbiana a temperaturas más cálidas llevando a un incremento de degradación de los NPEOs (Li y col., 2004). Otros factores como el caudal de agua, la tasa de sedimentación y tamaño de partícula, también influyen en la tasa de degradación. 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 su interacciones hidrofóbicas (John y col., 2000). Una vez entran en los sedimentos, la vida media de degradación de los compuestos nonilfenólicos fue estimada ser superior a 60 años una vez entran en los sedimentos (Shang y col., 1999).

Distribución de APs y APEOs en aguas superficiales y residuales y material particulado.

En el estudio realizado en esta tesis sobre la distribución de los APs y APEOs, se ha determinado que, mientras los compuestos alquilfenólicos de cadena más larga NP₃₋₁₅EO tienen mayor tendencia a estar en la fase acuosa, los compuestos de cadena más corta, y especialmente los APs, con un log K_{ow} de 4.48 para NP y OP y mayor lipofilicidad, tienen una mayor tendencia a quedar adsorbidos en el material particulado y a quedar adsorbidos en el fango, principal vía de eliminación de estos compuestos en las depuradoras. Por tanto los NP₃₋₁₅EO de cadena larga son detectados en los efluentes a concentraciones mayores dando peores eliminaciones en las EDARs estudiadas, mientras que los APs, son más detectados en el material particulado y el fango de EDAR y por tanto proporcionan una alta eliminación en las EDARs al no ser apenas detectados en los efluentes de las depuradoras (la eliminación no sucede por mecanismos de biodegradación como otros compuestos, sino por su gran tendencia a quedar retenidos en el fango). Este hecho es de gran relevancia si tenemos en cuenta que son precisamente los APs los compuestos que tienen mayor estrogenicidad vs los compuestos alquilfenólicos de cadena larga, y por tanto se recomienda el análisis de la fracción particulada, así como de los sedimentos de ríos o fangos de depuradoras, donde tienen mayor tendencia a quedar retenidos, para poder determinar la concentración total (fase disuelta y retenida en el material particulado) de los compuestos alquilfenólicos, responsables de la mayor parte de estrogenicidad de las muestras en las cuencas de los ríos estudiadas.

El análisis de la fracción particulada para poder determinar las concentraciones totales presentes en el medioambiente y evaluar la estrogenicidad de las muestras, adquiere aún más relevancia en las zonas en las que los alquilfenoles han sido considerados los compuestos químicos causantes de la estrogenicidad en aguas de río en áreas integradas con aguas residuales (Körner y col., 2000; Fenet y col., 2003; Céspedes y col., 2005; Quirós y col., 2005, Brix y col., 2010) y en particular en esta zona del Nort-Este de España, en la que los niveles de estrógenos detectados son bastante bajos y esporádicos. Sin embargo, otros estudios en otras zonas de Europa atribuyen la estrogenicidad detectada a la presencia de estrógenos naturales y sintéticos (Routledge y col., 1998; Johnson y Sumpter, 2001; Furuichi y col., 2004; Nakada y col., 2004; Tarrant y col., 2008).

Bisfenol A: Se ha detectado en 7 de las 19 muestras analizadas, en todos los casos a concentraciones inferiores a 2 µg/L, valor a partir del cual Krishnan y col., publicó que el BPA puede ejercer efectos estrogénicos (Krishnan y col., 1993). Sin embargo, más de 450 estudios realizados en la última década afirman que el BPA puede causar efectos estrogénicos a dosis muy bajas (Vom Saal y col., 2007) y por tanto hay que tener en cuenta cualquier muestra en la que se detecte BPA. Generalmente se ha detectado en el primer tramo de la cuenca del río Ter y en las EDARs a su paso, indicativo de que es debido a la contaminación industrial puntual, mientras que no ha sido detectado en el tramo bajo del río ni en la EDAR de Banyoles.

Ftalatos: Tienen baja solubilidad en agua y cuando se liberan en el medioambiente, tienden a adsorberse fuertemente a las partículas suspendidas y los sedimentos (Harris y col., 1997; Fromme y col., 2002). La biodegradación es principal mecanismo de eliminación y degradación de ftalatos que entran en las EDARs, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, siendo menor en los compuestos más hidrofóbicos con cadenas más largas (Fromme y col., 2002). DEHP y DEP constituyen los ftalatos más ubicuos

detectados en aguas residuales, debido a su alta producción, amplio uso y propiedades físico-químicas (baja solubilidad y K_{ow} relativamente alta). DEHP es compuesto lipofílico con un $\log K_{ow}$ de 7.5 (EC 2008), con concentraciones normalmente altas en el agua residual en las entradas de las EDARs, pero sin embargo disminuyen considerablemente en la salida después del tratamiento indicando una alta eliminación, por su alta adsorción en fangos. En las 5 EDARs evaluadas en la cuenca del río Ter, solamente se ha detectado un incremento considerable de ftalatos en la salida de la EDAR de Girona, pudiendo tratarse de una contaminación a pesar de haber realizado blancos.

Otros compuestos: Adicionalmente, se han estudiado los alcoholes etoxilados (AEO) por haber sido uno de los sustituyentes más importantes de los NPEOs en Europa (Krogh y col., 2002), con menor toxicidad. Los AEOs han sido generalmente degradados y eliminados durante los tratamientos en las EDARs. Se ha detectado el mayor nivel de AEOs en la EDAR de Ripoll.

También se han estudiado los benzotiazoles, contaminantes con un gran volumen de producción utilizados principalmente en la industria de fabricación del caucho (Reemtsma y col., 1995), industrias del papel y piel, etc. Con potencial toxicidad acuática, BT y HOBT son biodegradables, mientras que MTBT es recalcitrante (Reemtsma y col., 1995). Se han detectado con niveles mayores en zonas industriales, como la entrada de la EDAR de Vic.

Eliminación de la estrogénicidad en las EDARs de las cuencas de los ríos Ter y Llobregat

Se han comparado las eficiencias de eliminación obtenidas de las concentraciones químicas y las actividades estrogénicas obtenidas respectivamente mediante LC-MS y RYA. Adicionalmente se han comparado los resultados en base a la estrogénicidad calculada basada en el análisis químico y la actividad estrogénica integrada cuantificada mediante el bioensayo RYA.

A continuación, se representa en las Figuras 5.14 y 5.15 los gráficos correspondientes a los compuestos alquilfenólicos (APs y APEOs) en las cuencas de los ríos Ter y Llobregat respectivamente:

- (a) Concentraciones de los APs vs la concentración total de todos los EDCs determinados mediante LC-MS;
- (b) Estrogénicidad total calculada (EEQ total) de los APs vs todos los compuestos objeto de estudio y
- (c) Actividad estrogénica determinada mediante el ensayo de levaduras recombinantes (RYA).

De los resultados obtenidos en las cuencas de ambos ríos, se observa que la suma de concentraciones de todos los EDCs es similar a la de los APs en la mayoría de EDARs del Llobregat y del Ter (excepto en Ripoll y Girona), confirmando que la principal contribución de la contaminación química se debe a los APs.

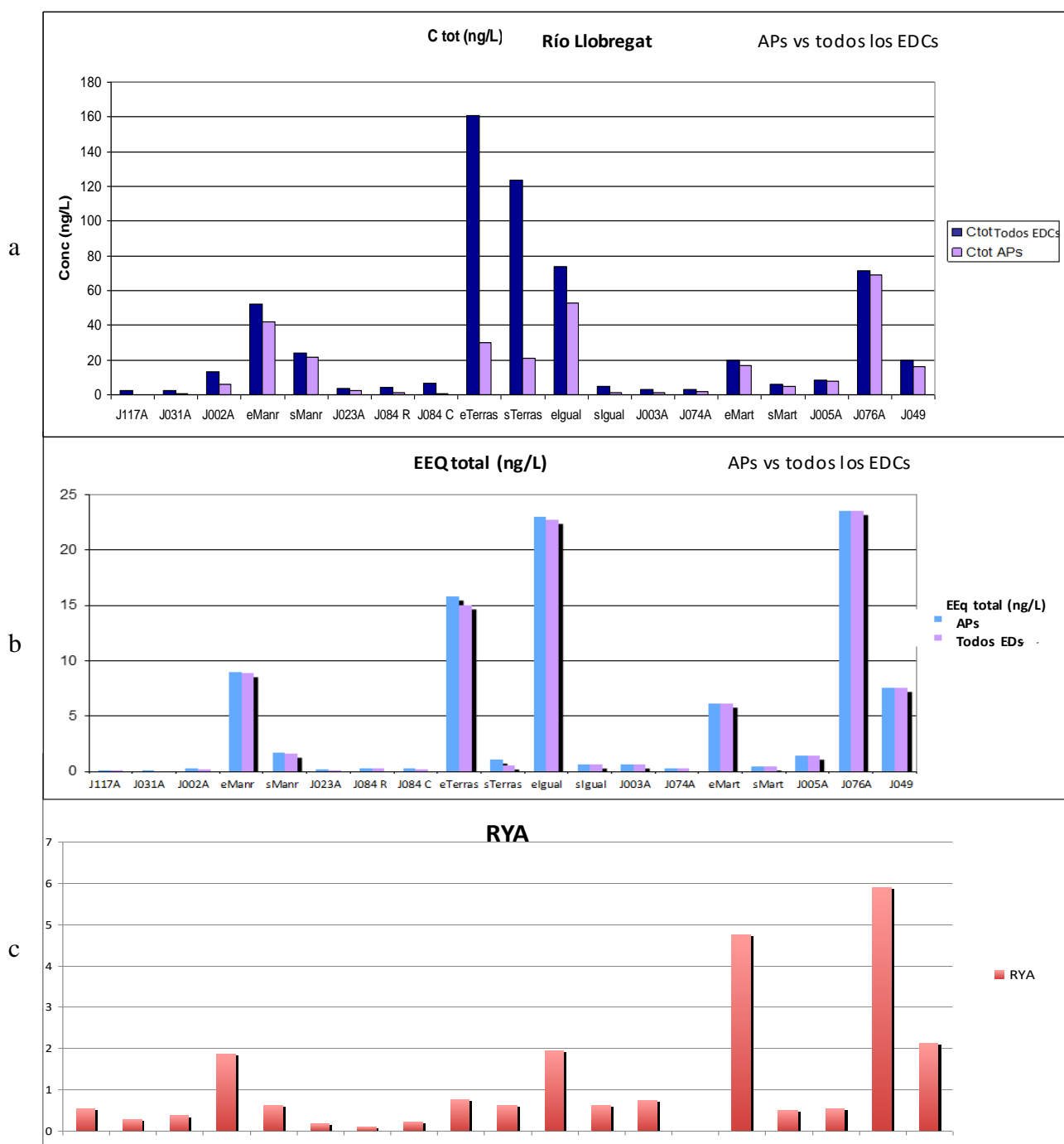


Figura 5.14. (a) Concentraciones ($\mu\text{g/L}$) de los compuestos alquilfenólicos detectados en la cuenca del río **Llobregat** mediante análisis químico por LC-MS, (b) valores de EEQ de los APs vs el total de EEQ de los compuestos alquilfenólicos y (c) estrogenicidad de las muestras detectada mediante el bioensayo RYA.

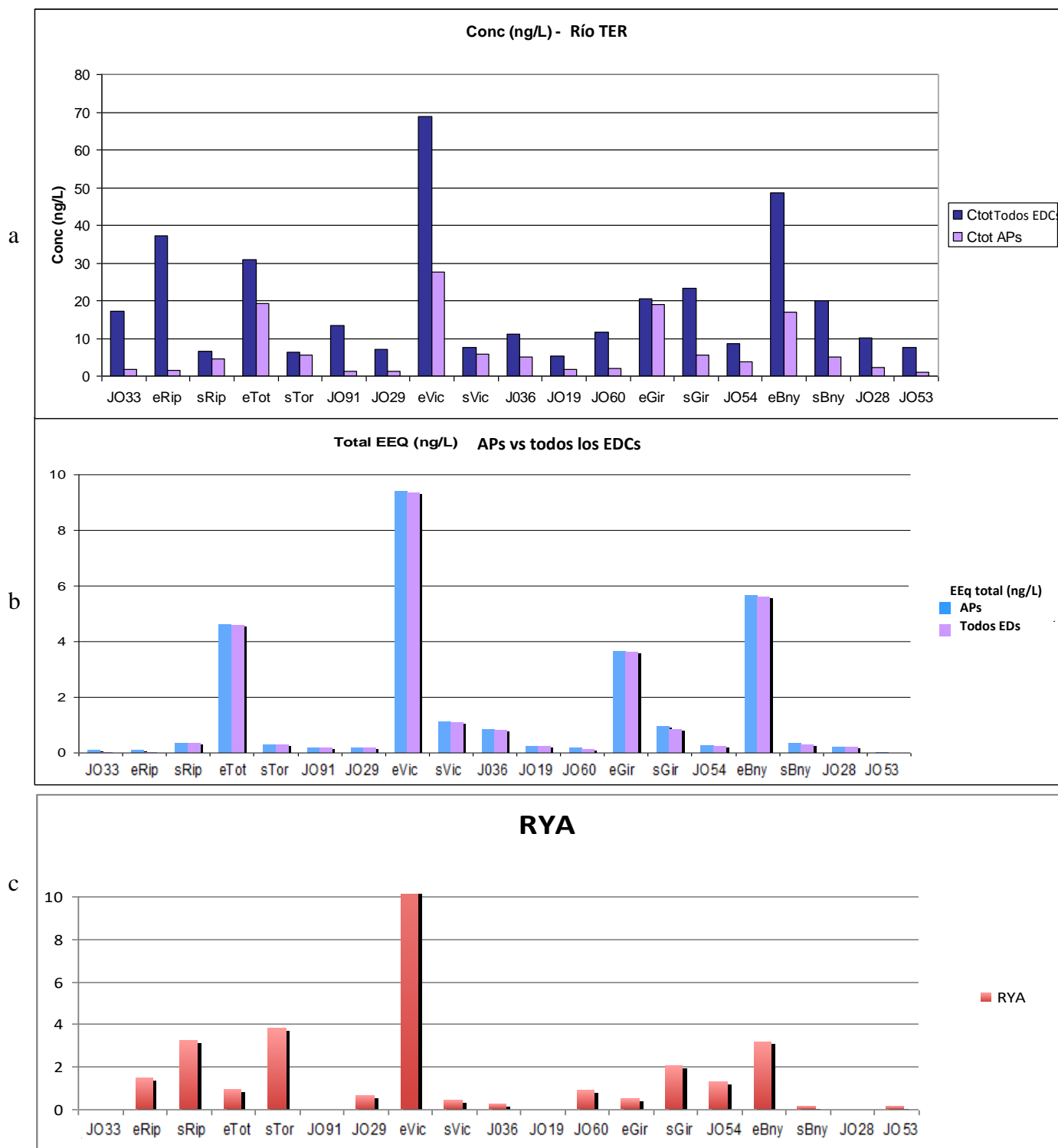


Figura 5.15. (a) Concentraciones ($\mu\text{g/L}$) de los compuestos alquilfenólicos detectados en la cuenca del río Ter mediante análisis químico por LC-MS, (b) valores de EEQ de los APs vs el total de EEQ de los compuestos alquilfenólicos, y (c) estrogenicidad de las muestras detectada mediante el bioensayo RYA.

Si comparamos la concentración de los APs obtenida mediante LC-MS vs la estrogenicidad calculada (EEQ), se observa como que la eliminación de las concentraciones químicas de APs detectadas en las EDARs fue de 29 a 71% en el Llobregat y de 70-79% en el Ter (excepto la EDAR de Ripoll). En base a los valores de la estrogenicidad calculada (EEQ) obtenidos, la eliminación fue eficiente en todas las EDARs estudiadas, con un rango de 82-97% y 77-95% en el Llobregat y el Ter respectivamente, demostrando una alta eficacia de las EDARs estudiadas, mientras que la estrogenicidad medida por el ensayo RYA tuvo una eliminación en el proceso de las EDARs en un rango de 67-89% en el Llobregat con una eliminación casi total de la estrogenicidad en el Ter (95-97%), debido a que en la cuenca del Ter se ha tenido en cuenta la concentración total de EDCs, es decir, la suma de las fracciones disuelta y del material particulado de cada muestra.

Por tanto, se observa que, aunque la eliminación de la concentración química es similar en las EDARs de ambos ríos, el hecho de analizar también el material particulado en las muestras del río Ter, resulta en una eliminación casi total de la estrogenicidad, que es más relevante que las concentraciones químicas por el impacto que puede tener en el medioambiente y los efectos que los EDCs pueden causar en los seres vivos.

De las diversas EDARs estudiadas en el río Llobregat, se observó mayor concordancia entre eliminación de las concentraciones químicas y la estrogenicidad, en la depuradora de Terrasa, con el mayor valor de habitante equivalente de las estudiadas y la única sin eliminación de nitrógeno en el tratamiento. Las EDARs en las que se detectó mayor concentración a la salida fueron las que no pudo analizarse la fracción particulada.

En la comparación de las concentraciones obtenidas mediante LC-MS con los valores EEQ mediante RYA se ha obtenido:

(i) Si EEQ (RYA) = Concentraciones (LC-MS): se obtiene una buena correlación entre análisis químico y biológico, indicando que LC-MS ha identificado los compuestos (o la mayor parte de ellos) responsables de la estrogenicidad de la muestra. Por tanto se confirma que APs y APEOs son los principales responsables de la estrogenicidad observada.

- *Cuenca del Llobregat*: el RYA ha detectado una mayor actividad estrogénica en las muestras de entradas de las depuradoras de Martorell, Tarrasa e Igualada, en las que LC-MS ha detectado las concentraciones más altas, así como en los dos últimos puntos del río, con una gran carga contaminante por la Riera de Rubí.
- *Cuenca del Ter*: las entradas de las EDARs de Torelló, Vic, Girona y Banyoles, con elevadas concentraciones de APs y APEOs, son los principales responsables de la estrogenicidad obtenida.

(ii) Si EEQ (RYA) > Conc. (LC-MS): cuando se observa un incremento en la actividad estrogénica no reflejada en el análisis químico (especialmente evidente en EDARs), la estrogénicidad puede ser debida a otros compuestos no determinados mediante LC-MS, por ejemplo pesticidas. En algunos casos se confirmó posteriormente la presencia de estrógenos mediante LC-MS/MS (pudiendo constituir un reflejo de la biotransformación de compuestos inactivos en otros estrogénicos especialmente cuando se detecta mayor estrogénicidad en los efluentes).

- *Cuenca del Llobregat*: en las entradas de las depuradoras de Igualada y especialmente la de Martorell, así como en el penúltimo punto de muestreo del río, uno de los más contaminados, se ha obtenido una estrogénicidad superior, seguramente por la existencia de otros compuestos EDCs *non target*, es decir, no determinados mediante el análisis químico.
- *Cuenca del Ter*: los efluentes de las EDARs de Ripoll y Torelló registran ligeramente mayor nivel de estrogénicidad en el gráfico que los niveles obtenidos por LC-MS, ya que han sido detectados APEOs pero no APs, compuestos de mayor estrogénicidad.

(iii) Si EEQ (RYA) < Conc. (LC-MS): puede haberse producido una inhibición (RYA) o un efecto antiestrogénico.

- *Cuenca del Llobregat*: en el efluente de la EDAR de Tarrasa se ha obtenido una concentración química aparentemente mayor que la estrogénicidad mediante el RYA.
- *Cuenca del Ter*: la entrada de la EDAR de Ripoll es la única que no refleja alta estrogénicidad, pero según el análisis químico, las concentraciones de APs son bastante bajas y por tanto la estrogénicidad es menor que en el resto de entradas de depuradoras.

Por tanto, los resultados obtenidos mediante análisis químicos por LC-MS y el ensayo biológico RYA, en general correlacionan bastante y de esta forma se confirma que los compuestos alquilfenólicos son los responsables de la mayor parte de actividad estrogénica observada en ambos ríos, Llobregat y Ter. El estudio realizado por Brix y col., en 2005 y 2006 (Brix y col., 2010), confirma que la principal actividad estrogénica detectada en el río Llobregat, se atribuye principalmente a la presencia de compuestos alquilfenólicos, ya que los estrógenos han sido detectados solo puntualmente y a bajas concentraciones.

En conclusión, los resultados obtenidos resaltan la importancia de tener en cuenta el análisis de la fracción particulada (PM), para determinar las concentraciones químicas de APs y APEOs y la determinación de la estrogénicidad (RYA), debido a su alta tendencia a adsorber en el material particulado (K_{ow} de 4.44), siendo especialmente importante en las muestras de la entrada de las EDARs, en las que PM es más importante y donde se espera obtener mayores niveles de APs y APEOs de cadena corta, los compuestos alquilfenólicos de mayor estrogénicidad y por tanto más relevantes desde el punto de vista medioambiental

5.4. CONCLUSIONES -----

Las principales conclusiones obtenidas del estudio realizado en las cuencas de los ríos Ter y Llobregat son:

Cuencas de los ríos:

- ✓ En la cuenca del río Llobregat se observa un incremento en las concentraciones a lo largo de la cuenca, desde su nacimiento a su desembocadura, por la mayor carga contaminante que va adquiriendo el río por las descargas industriales y urbanas, mientras que en la cuenca del río Ter no se observa un aumento en los niveles de EDCs detectados a lo largo de la cuenca del río, indicando que son específicos de las actividades llevadas a cabo en cada punto.
- ✓ Tanto los niveles de compuestos EDCs detectados, como la estrogenicidad de las muestras, son superiores en la cuenca del río Llobregat, con mayor actividad industrial

Niveles de los compuestos EDCs:

- ✓ Los compuestos más ubicuos fueron los utilizados en formulaciones industriales para diversos propósitos: los compuestos alquilfenólicos NP (94%), NPE₁O (48%), NPE₂O (74%), OP (58%) y los plastificantes DEP (100%) y DEHP (79%) y BPA (58%). Las concentraciones detectadas fueron superiores en la cuenca del Llobregat entre 0.13 y 44.8 µg/L (NP), 1.19 - 19.3 µg/L (NPE₁O), 0.39 - 9.69 µg/L (NPE₂O)) que en la del río Ter con rangos de 0.08-17.5 µg/L (NP, 100%), 0.66-10.3 µg/L y 25.9-671 µg/L para el NP, NPE₁₋₂O y NPE₃₋₁₅O respectivamente.
- ✓ Se ha confirmado la presencia puntual de los estrógenos de menor actividad estrogénica mediante LC-MS/MS: E1, su metabolito E1-3S y el E3, a niveles de 5.76-10.3 ng/L, 0.8 ng/L y 3.1 ng/L respectivamente, coincidiendo con otros estudios realizados en el Llobregat.
- ✓ Los niveles de APs y de APEOs de cadena corta (NPE₁O y NPE₂O) detectados, fueron inferiores en las EDARs que reciben principalmente agua residual municipal, comparado con las EDARs que reciben aguas de descargas industriales

Aguas superficiales (cuencas de ríos):

- ✓ En las aguas superficiales, se han detectado niveles superiores de EDCs en la cuenca del río Llobregat en diversos puntos, y especialmente en los dos últimos puntos correspondientes a la riera de Rubí (con valores 10X superiores a las habituales para el NP y el OP). En la cuenca del río Ter en cambio, los niveles son bastante inferiores, siendo un poco mayores en el primer punto de muestreo ubicado en el río Gurri.
- ✓ De los valores establecidos en la Directiva 2008/105/EC de contaminantes prioritarios para aguas superficiales, establecida posteriormente al PVA llevado a cabo, el NP sobrepasa el valor de NCA-MAC=2 µg/L en los 3 últimos puntos del río (lo cual supondría incumplimiento actualmente), mientras que en el Ter todos los valores cumplen la Directiva.

Aguas residuales. Eficacia de las EDARs:

- ✓ En las aguas residuales, se observa como la mayoría de compuestos son eliminados cuantitativamente en el tratamiento de las diferentes EDARs, siendo las depuradoras estudiadas en la cuenca del Llobregat, con niveles superiores en las entradas, más eficaces eliminando EDCs que las de la cuenca del Ter.
- ✓ Comparando el proceso de depuración en las EDARs estudiadas, se confirma la mayor eficacia en la eliminación de EDCs del tratamiento biológico y la menor en la EDAR sin eliminación de nitrógeno.

Análisis del material particulado (PM):

- ✓ El análisis del PM de los filtros correspondientes a las muestras de agua del Ter, ha permitido:
 - (1) aportar la concentración total de los EDCs en las muestras (suma de los niveles en la fracción disuelta y la particulada), obteniendo una mayor correlación con los valores de estrogenicidad y.
 - (2) El estudio de la distribución de los compuestos alquilfenólicos, que ha permitido confirmar la mayor adsorción y por tanto acumulación del PM y los sedimentos de los compuestos con mayor estrogenicidad, los APs y los APEOs de cadena corta (NP₁EO y NP₂EO), mientras que los de cadena larga (NP₃₋₁₅EO) y menor estrogenicidad son detectados mayoritariamente en aguas. Esto pone de manifiesto la importancia de analizar los sedimentos y el PM para poder determinar la fracción más estrogénica y obtener las concentraciones totales de APs y APEOs en el medioambiente acuático.

Metodología analítica mediante LC-MS(MS) vs bioensayo RYA:

- ✓ Mediante LC-MS, únicamente una parte de los compuestos responsables de la disrupción endocrina (*target*) pueden ser identificados, pero otros compuestos (desconocidos o *non target*) potencialmente causantes de la estrogenicidad, necesitan técnicas más específicas y sensibles.
- ✓ El bioensayo con levaduras recombinantes (RYA) llevado a cabo con los extractos, determina la estrogenicidad total de la muestra, detectando tanto los estrógenos naturales como los xenoestrógenos, haciendo por tanto medidas cuantitativas de la actividad estrogénica sin tener en cuenta la identidad de los compuestos químicos responsables.
- ✓ La actividad estrogénica detectada en aguas de Cataluña mediante el RYA es atribuida principalmente a los compuestos nonilfenólicos, más ubicuos (NP en el río y NPEOs en EDARs). Sin embargo, en los puntos en los que se han detectado estrógenos, éstos compuestos tienen mayor contribución en la estrogenicidad.
- ✓ Los ensayos RYA llevados a cabo tanto en la fracción disuelta como en la correspondiente fracción particulada de aguas residuales, han permitido confirmar la alta eficacia de las diferentes depuradoras analizadas eliminando la actividad estrogénica (95-96%), superior a la eliminación de la concentración de los compuestos estrogénicos (82-97% y 77-95% en las cuencas del Llobregat y del Ter respectivamente).

✓ Metodología integrada química-biológica:

✓ En la correlación de las concentraciones y los valores de EEQ obtenidos mediante LC-MS y RYA respectivamente se obtuvo:

(i) Si EEQ (RYA) = Conc. (LC-MS): APs y APEOs son los principales responsables de la estrogenicidad obtenida.

(ii) Si EEQ (RYA) > Conc. (LC-MS): la estrogenicidad puede ser debida a otros compuestos no determinados mediante LC-MS. En algunos casos se confirmó posteriormente con LC-MS/MS la presencia de estrógenos.

(ii) Si EEQ (RYA) < Conc. (LC-MS): puede haberse producido una inhibición (RYA) o un efecto antiestrogénico.

✓ En conclusión, la aplicación de la metodología integrada química-biológica LC-MS(MS) vs RYA, ha establecido en general buenas correlaciones entre composición química y actividad estrogénica para las muestras de aguas superficiales y residuales. En algunos casos se ha observado un incremento de la actividad estrogénica no reflejada en el análisis químico, especialmente evidente en muestras de EDARs.

✓ La combinación de integrar la determinación química de la concentración total (fracción disuelta y particulada) de cada EDC (LC-MS(MS) y de la actividad estrogénica total de las muestras (RYA), ha permitido mejorar las correlaciones y determinar la alta eficacia de las EDARs eliminando la estrogenicidad de las muestras (95-97%), de mayor relevancia para el medioambiente,

Evolución de los niveles de EDCs (de 2001 a 2018), en base a los estudios publicados:

✓ Se observa una disminución de los niveles de compuestos alquilfenólicos detectados en el río Llobregat a lo largo del tiempo, probablemente por la prohibición de su uso en detergentes domésticos y la restricción o disminución en usos Industriales establecido en la D. 2003/56/EC, el progresivo reemplazo por otros compuestos (ej: AEOs) así como el aumento de EDARs y tratamientos avanzados.

✓ Se han detectado los estrógenos E1, E1-3S y E3, únicamente puntualmente y a bajas concentraciones, y han sido recientemente (2015) incluidos en la lista de observación de la Directiva 2015/4 /EC y en la CCL4 de la EPA (E1, E2, E3 y EE2).

Por tanto, la incorporación de estos EDCs en diversas normativas y listas, confirma la relevancia de los compuestos seleccionados a estudiar en estos PVA.



CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES -----

A continuación, se resumen las principales conclusiones obtenidas en esta tesis doctoral:

1. Desarrollo y aplicación de metodologías analíticas:

El trabajo experimental ha sido realizado en el periodo 2001-2004, y por tanto hay que contextualizar las técnicas analíticas (LC-MS y LC-MS/MS) así como los correspondientes parámetros de calidad obtenidos en este periodo.

- ✓ Se han desarrollado y validado una metodología analítica basada en un método multiresiduo mediante extracción en fase sólida (SPE) y análisis por **cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)** con interfase de electrospray, obteniendo parámetros de calidad del método satisfactorios (LODs entre 0.01 y 0.12 µg/L y recuperaciones en el rango 78 - 102%) y se ha estudiado el efecto matriz en aguas superficiales y residuales. La metodología optimizada permiten la determinación simultánea y a niveles traza de 27 EDCs de diferentes familias químicas (compuestos alquilfenólicos, estrógenos, progestógenos, bisfenol A, ftalatos, benzotiazoles y alcoholes etoxilados) en aguas.
- ✓ Adicionalmente, se ha desarrollado y validado un método basado en la extracción SPE y análisis mediante **cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)**, con LODs en el rango 0.1 - 1 ng/L y recuperaciones entre 67 y 98% y se ha estudiado el efecto matriz en aguas superficiales y residuales. Este método ha permitido la detección, confirmación y cuantificación de los estrógenos ambientales más relevantes presentes en el medio acuático, que pueden ejercer efectos estrogénicos en organismos a niveles de ng/L.

2. Evaluación de la estrogénicidad mediante ensayos de levaduras recombinantes

- ✓ El bioensayo con levaduras recombinantes (RYA) llevado a cabo con los extractos de agua y material particulado, determina la estrogénicidad total de la muestra, detectando tanto los estrógenos naturales como los xenoestrógenos, haciendo por tanto medidas cuantitativas de la actividad estrogénica sin tener en cuenta la identidad de los compuestos químicos responsables de este efecto.
- ✓ Se han establecido los valores de estrogénicidad individuales (E2 equiv.) y la EC₅₀ de cada uno de los compuestos estudiados mediante el ensayo RYA y se ha obtenido que es un bioensayo *in-vitro* muy sensible a los estrógenos que decrece para el resto de familias de EDCs en el siguiente orden: Estrógenos >> APs & APEOs > BPA > ftalatos > benzotiazoles.

3. Desarrollo y validación de inmunoensayos ELISA mediante LC-MS y LC-MS/MS.

Aplicación en aguas

- ✓ Se han desarrollado dos inmunoensayos ELISA para la determinación de compuestos alquilfenólicos en aguas y se ha realizado la validación mediante el cálculo de los parámetros de calidad (límites de detección (LOD), concentración causante de inhibición del 50% de señal (IC₅₀), rango de trabajo, recuperaciones, estudios de reactividad cruzada, estudio del efecto de la matriz, etc).
- ✓ El ensayo directo ELISA basado en anticuerpos monoclonales ha permitido la detección conjunta de APs (NP + OP) y sus productos de degradación en muestras de aguas superficiales con un LOD de 6 ng/L y IC₅₀ de 54-65 ng/mL, mientras que el ensayo indirecto ELISA basado en anticuerpos policlonales, ha permitido la detección conjunta de (APs + APEOs + APECs), ya que el uso de los Ac policlonales permite reconocer toda una familia de compuestos, con una sensibilidad de 10 ng/L y con IC₅₀ de 246-291 ng/mL.
- ✓ La comparación de los resultados obtenidos del análisis en paralelo de aguas superficiales, residuales y de grifo fortificadas mediante LC-MS (MS) y los ensayos ELISA, ha permitido demostrar que ELISA es un ensayo sensible y específico, adecuado para realizar un *screening* o cribado previo de muestras de aguas, tanto superficiales como residuales, discriminando las muestras con presencia o no de APs y/o APs +APEOs y que existe buena correlación con la respuesta de LC-MS.
- ✓ El procedimiento analítico recomendado consiste en analizar los extractos de agua preconcentrados mediante el ensayo inmunoenzimático ELISA, más rápido, sencillo y económico que las técnicas cromatográficas, para realizar un previo *screening* o cribado de las muestras que permita discriminar o identificar las muestras positivas, que se analizarán a continuación mediante LC-MS(MS) y descartar las muestras negativas, con el consiguiente ahorro en tiempo y costes que conlleva evitar su análisis mediante LC-MS(MS).

4. Programas de Vigilancia Ambiental mediante análisis químico

- ✓ Los Programas de Vigilancia Ambiental (PVA) realizados en diversos ríos españoles y portugueses han permitido la integración de técnicas químicas y biológicas, con la determinación de las concentraciones de los EDCs y otros contaminantes prioritarios mediante LC-MS (MS), estableciendo la estrogenicidad de las muestras mediante RYA.
- ✓ Los compuestos EDCs más ubicuos en aguas en los tres PVA fueron los compuestos alquilfenólicos NP, NP₁EO y NP₂EO, los plastificantes como el DEHP, seguidos del BPA y el OP y el DEP en el río Ter.

- ✓ Presencia y niveles de compuestos alquilfenólicos en aguas: se detectaron niveles más elevados de EDCs en los ríos en Portugal, seguidos de la Riera de Rubí (efluente del río Llobregat), con mayor grado de contaminación y presiones industriales que el río Ter. Los PVA han permitido identificar los *hot spots* o puntos con mayores concentraciones de EDCs y las distribuciones geográficas de contaminantes.
- ✓ Presencia y niveles de estrógenos en aguas: el análisis mediante LC-MS/MS ha permitido confirmar la presencia puntual de los estrógenos en aguas. Se han detectado los estrógenos de menor actividad estrogénica: estrona (E1), su metabolito E1-3S y el estriol (E3), a niveles entre 0.8 ng/L y 10.3 ng/L en agua superficial y 8.2 ng/L de E1 en agua residual.
- ✓ Se han observado variaciones estacionales de las concentraciones obtenidas en el PVA de Portugal en algunos puntos, con concentraciones más elevadas en verano, probablemente debido a la menor dilución de aguas residuales vertidas en los ríos por la disminución de precipitaciones en este periodo. Sin embargo, en otros puntos de muestreo se observó que la carga total de EDCs permaneció bastante estable entre abril y agosto. La biodegradación y eliminación de NPEOs disminuye a medida que la temperatura desciende.
- ✓ En las aguas residuales, se observa como la mayoría de compuestos son eliminados cuantitativamente en el proceso de depuración de las diferentes EDARs, aunque la eficacia de degradación depende de cada depuradora.
- ✓ La aplicación de técnicas quimiométricas ha permitido obtener distribuciones geográficas y temporales, así como correlaciones entre los compuestos más ubicuos en ríos de Portugal e identificar las zonas con mayor grado de contaminación. Se han aplicado 2 modelos al Análisis de Componentes Principales (PCA) identificando el PCA-transformación logarítmica de los datos como el más adecuado para la contaminación por EDCs en Portugal, mayoritariamente generalizada.

5. Estudio de la distribución y comportamiento de compuestos alquilfenólicos.

- ✓ Se ha estudiado la compartimentación de los compuestos alquilfenólicos en la fase disuelta y particulada y se ha observado que los compuestos con mayor estrogénicidad, los APs y los APEOs de cadena corta (NP₁EO y NP₂EO) tienen tendencia a adsorberse en el material particulado, mientras que los de cadena larga (NP₃₋₁₅EO) son detectados mayoritariamente en aguas.
- ✓ Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la relevancia de determinar la fracción particulada en los EDCs:

6. Aplicación de la metodología integrada LC-MS (MS) y ensayo RYA a los PVA

- ✓ La actividad estrogénica detectada en aguas de Cataluña y en Portugal mediante el RYA suele ser baja (inferior a 0.1 ng/L E2 equiv), pero es atribuida principalmente a los compuestos nonilfenólicos. Sin embargo, en los puntos en los que se han detectado estrógenos, estos compuestos tienen una mayor contribución en la estrogénicidad total de la muestra.

- ✓ La aplicación de la metodología integrada química-biológica establecida (LC-MS(MS) vs RYA), ha obtenido en general buenas correlaciones entre composición química y actividad estrogénica para las muestras de aguas superficiales y residuales. En algunos casos se ha observado un incremento de la actividad estrogénica no reflejada en el análisis químico, especialmente evidente en muestras de EDARs (pudiendo constituir un reflejo de la biotransformación de compuestos inactivos en otros estrogénicos).
- ✓ La combinación del análisis químico de la fracción disuelta y particulada (obteniendo la concentración total de cada EDC) y la determinación de la actividad estrogénica total de las muestras mediante RYA, ha permitido
 - mejorar las correlaciones entre las concentraciones totales de cada EDC y la actividad estrogénica de las muestras
 - determinar la alta eficacia de las depuradoras eliminando la estrogénicidad de las muestras (95-98%), de mayor relevancia medioambiental por los efectos de los EDCs

7. Evolución de los niveles de EDCs y la normativa asociada (2001-actualidad)

- ✓ Los niveles detectados en varias muestras del 2001 superan los valores de NCA establecidos posteriormente a los PVA en la Directiva 2008/105/CE de contaminantes prioritarios para aguas superficiales, incumpliendo la normativa actualmente vigente. Así el NP ha superado el valor establecido de NCA-MAC = 2 µg/L en 20 muestras de las 186 analizadas en el PVA de Portugal y en los puntos más contaminados del río Llobregat (relacionados con la Riera de Rubí). Sin embargo, la disminución en las concentraciones de NP detectadas en el medioambiente hace que actualmente no se den incumplimientos tan grandes.
- ✓ De la evolución de los niveles de EDCs desde los PVA llevados a cabo en 2001 y teniendo en cuenta la bibliografía consultada hasta la actualidad (2018), se concluye que:
 - Compuestos alquilfenólicos: se observa una disminución a lo largo del tiempo en los niveles de los APs y APEOs detectados tanto en el río Llobregat como en Portugal, probablemente por la prohibición de su uso en detergentes domésticos (Directiva 2003/53/CE), la restricción o disminución en usos industriales, el progresivo reemplazo por otros compuestos (ej: AEOs) y el aumento de EDARs, así como la puesta en marcha de tratamientos más avanzados.
 - Estrógenos: han sido detectados únicamente puntualmente (E1, E1-3S y E3) y a bajas concentraciones (rango 0.8 – 10.2 ng/L), y debido a su elevada estrogénicidad, recientemente (2015) se han incluido en la lista de observación de la Decisión 2015/495/EC (E1, E2 y EE) y en la CCL4 de la EPA (E1, E2, E3 y EE2).

CONTRIBUCIONES DE ESTA TESIS DOCTORAL.....

En esta tesis doctoral, se ha puesto de manifiesto la aportación y contribución que han significado los estudios realizados, así como la relevancia que ha tenido este trabajo en la determinación de compuestos disruptores endocrinos en el medioambiente. Algunas evidencias son:

En referencia a los **Monitorings o Programas de Vigilancia Ambiental** realizados:

- **PVA Portugal** (Quirós y col., 2005): constituye uno de los primeros estudios que determina la estrogenicidad en ríos portugueses, tal y como puede verse en la tabla 4.1, sirviendo como referencia de los niveles de EDCs para los estudios realizados en Portugal posteriormente por otros grupos de investigación.
- **PVA Cuenca del río Llobregat** (Céspedes y col., 2005): el *monitoring* realizado en esta tesis es uno de los primeros estudios que determina la estrogenicidad a lo largo de la cuenca del río Llobregat, ampliamente estudiado (aumento exponencial de publicaciones en el periodo 2005-2014), estableciendo precedente para los múltiples estudios posteriores que han sido llevados a cabo, y habiendo sido citado (Céspedes y col., 2005) \approx 125 veces. Últimamente se ha visto que la estrogenicidad ha disminuido debido a una mayor depuración urbana e industrial.
- **PVA Cuenca del Río Ter**: río con menor contaminación que el Llobregat; los datos obtenidos sobre niveles de concentración de EDCs y estrogenicidad en sus aguas (Céspedes y col., 2006) constituyen una referencia de la contaminación del río, ya que apenas ha sido estudiado ni existen datos sobre el Ter. Adicionalmente, el estudio de la distribución de compuestos alquilfenólicos entre la fase disuelta (agua) y el material particulado (Céspedes y col., 2008) mediante la combinación del análisis químico (LC-MS) y la evaluación de la estrogenicidad (RYA), pone de manifiesto la importancia de analizar también el PM para una completa determinación de los EDCs en el medio acuático, ya que los compuestos de cadena más corta, con mayor estrogenicidad, tienen mayor tendencia a ser adsorbidos en la fracción particulada.

De las 9 publicaciones científicas realizadas con los resultados obtenidos en esta tesis, el número de veces que han sido citados en otros estudios refleja el impacto o importancia de los estudios realizados en la comunidad científica. Así:

- El estudio más citado (\approx 135 veces*) ha sido el que establece la metodología integrada químico-biológica, mediante la optimización del método LC-MS y la validación del RYA (Céspedes y col, 2004), que determina las curvas con los valores de estrogenicidad (EEQ) individual para cada uno de los compuestos estudiados. Este artículo define el principal objetivo establecido en esta tesis, demostrar que para realizar una correcta y completa determinación de los EDCs en el medioambiente, es imprescindible la integración de técnicas químicas y biológicas.

- El segundo artículo más citado (≈ 125 veces*) ha sido el de la determinación de la estrogénicidad y los niveles de EDCs a lo largo de la cuenca del río Llobregat (Céspedes y col, 2005), río de gran interés debido a la densidad urbana de su cuenca y a los efluentes industriales que recibe
- En tercer lugar, ha sido más citado (≈ 89 veces*) el artículo que estudia la distribución de compuestos alquilfenólicos entre la fase disuelta y la fracción particulada en el río Ter.

La reciente incorporación de algunos de los compuestos EDCs estudiados en esta tesis en la legislación de contaminantes, confirma la relevancia y el acierto de la **selección de los compuestos objeto de estudio** a determinar en esta tesis y por tanto reafirma la importancia de haber determinado y publicado niveles de estos contaminantes en el medio acuático, habiendo podido contribuir a establecer referencias de los niveles para la regulación de dichos compuestos en la normativa para que sean controlados. En particular:

- APs/ APEOs: (i) el uso de NP y NPEOs ha sido restringido en la D. (UE) 2003/53/EC en Europa; (ii) se han establecido valores límite en las Normas de Calidad Ambiental (NCA-MA) de la D. 2008/105/EC; (iii) NP y OP han sido clasificados en el R. REACH como sustancias extremadamente preocupantes (SVHC) y (iv) se ha observado una disminución en los niveles en el medio acuático debido a su restricción de uso en industrias.
- BPA: (i) restricción en algunos países de la UE; (ii) aumento exponencial de publicaciones; (iii) gran controversia entre la comunidad científica y la industria sobre los efectos que puede producir a dosis muy bajas; (iv) prohibición de BPA en biberones, (iv) recientemente ha sido incluidos en la lista de sustancias extremadamente preocupantes (SVHC) del R. REACH.
- Ftalatos: (i) se han establecido valores límite para el DEHP en las NCA-MA de la D. 2008/105/EC; (ii) DEHP ha sido clasificado en el R. REACH como SVHC; (iii) su uso ha sido restringido en algunos objetos, por ejemplo, en juguetes.
- Estrógenos: han sido incluidos en 2015: (i) en la lista de observación (*The Watch List*) de la D. (UE) 2015/495/EC en la Unión Europea; (ii) en la lista no normativa CCL4 de la EPA en EEUU.

(*) Consultas realizadas en www.Scopus.com el 5 de Septiembre de 2018.



BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Abdulla Bin-Dohaish el, J. (2012). The effects of 4-nonylphenol contamination on livers of Tilapia fish (*Oreochromis spilurs*) in Jeddah. *Biological Research*, 45(1), 15_20.
- Advanced Monitoring Program from Portuguese surface waters of 132 SVOCs and VOCs included in the 76/464/CEE directive (April 1999-May 2000)
- Ahel M, Giger W. 1985. Determination of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in environmental samples by high-performance liquid chromatography. *Anal Chem* 57:1577–1583.
- Ahel, M., Giger, W., 1993. Aqueous solubility of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Chemosphere* 26, 1461–1470.
- Ahel, M., McEvoy, J., Giger, W., 1993. Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in freshwater organisms. *Environ. Poll.* 79, 243–248.
- Ahel, M., Giger, W., Koch, M., 1994a. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment. I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Res.* 28, 1131–1142.
- Ahel, M., Scully, F.E., Hoigne, J., Giger, W., 1994b. Photochemical degradation of nonylphenol and nonylphenol polyethoxylates in natural waters. *Chemosphere* 28, 1361–1368.
- Ahel, M., Molnar, E., Ibric, S., Giger, W., 2000. Estrogenic metabolites of alkylphenol polyethoxylates in secondary sewage effluents and rivers. *Water Sci. Technol.* 42, 15–22.
- Almeida C, Serodio P, Florencio MH, Nogueira JMF (2007) New strategies to screen for endocrine-disrupting chemicals in the Portuguese marine environment utilizing large volume injection capillary gas chromatography-mass spectrometry combined with retention time locking libraries (LVI-GC-MS-RTL). *Anal Bioanal Chem* 387:2569–2583
- Alonso-Magdalena P, Quesada I, Nadal A (2011). Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews. Endocrinology*, 7(6):346-353.
- Alternating Least Squares Method for the Investigation of Environmental Pollution Patterns in Surface Water. *Environ. Sci. Technol.* 2009, 43, 5321–5326
- Amiridou, D., Voutsas, D. Alkylphenols and phthalates in bottled waters, *J Hazard Mater* (2011) 185, 281.
- Andreu, V., Ferrer, E., Rubio, J.L., Font, G., Picó, Y. Quantitative determination of octylphenol, nonylphenol, alkylphenol ethoxylates and alcohol ethoxylates by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-mass spectrometry in soils treated with sewage sludges, *Sci Total Environ* (2007) 378, 124-129.
- Aragon, M.; Marcen, R. M.; Borrull, F. Determination of Phthalates and Organophosphate Esters in Particulated Material from Harbour Air Samples by Pressurised Liquid Extraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Talanta*. 2012, 101, 473–478.
- Arditsoglou, A., Voutsas, D. Occurrence and partitioning of endocrine-disrupting compounds in the marine environment of Thermaikos Gulf, Northern Aegean Sea, Greece, *Mar Pollut Bull* (2012) 64, 2443-2452.
- Arditsoglou, A., Voutsas, D. Passive sampling of selected endocrine disrupting compounds using polar organic chemical integrative samplers, *Environ Pollut* (2008) 156, 316-324.
- Auriol, M- Y. Filali-Meknassi, C.D. Adams, R.D. Tyagi, T.-N. Noguero, and B. Pina. Removal of estrogenic activity of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater: Efficiency of horseradish peroxidase and laccase from *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 70: 445–52 (2008).
- Atlas ambiental y patrimonial del río Ter: publicación editada en el 2004 por el Consorcio Alba-Ter, que detalla información sobre la cartografía en general, del ámbito fluvial del Ter, del agua y del patrimonio cultural vinculado al agua.
- Azevedo DA, Lacorte S, Viana P, Barceló D (2001) Analysis of priority pesticides and phenols in Portuguese river water by liquid chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia* 53:113–118
- Azevedo DA, Lacorte S, Viana P, Barceló D (2001) Occurrence of nonylphenol and bisphenol A in surface waters from Portugal. *J Brazil Chem Soc* 12:532–537
- Baker, V.A., 2001. Session 5: Hot Topics in In Vitro Toxicology. Long-Term Effects, Hormonal Effects, Endocrine Disrupters. Endocrine disrupters —testing strategies to assess human hazard. *Toxicology in Vitro* 15, 413–419.

- Ballesteros, O., Zafra, A., Navalón, A., Vilchez, J.L. Sensitive gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of phthalate esters, alkylphenols, bisphenol A and their chlorinated derivatives in wastewater samples, *J Chromatogr A* (2006) 1121, 154-162.
- Barceló, D., Environmental Protection Agency and other methods for the determination of priority pesticides and their transformation products in water. *Journal of Chromatography A*. Volume 643, Issues 1–2, 23 July 1993, Pages 117-143
- Barceló, D., Effect-Directed Analysis of Key Toxicants in European River Basins. A Review. *Environmental Science and Pollution Research - International*. 2007, Volume 14, Issue 1, pp 30–38.
- Baronti C, Curini R, D'Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A, Samperi R. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environ. Sci. Technol.* 2000; 34: 5059
- Beck, I.C., Bruhn, R., Gandrass, J., Ruck, W. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic Sea, *J Chromatogr A* (2005) 1090, 98-106.
- Benijts, T., Dams, R., Lambert, W., De Leenheer, A. Countering matrix effects in environmental liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry water analysis for endocrine disrupting chemicals, *J Chromatogr A* (2004a) 1029, 153-159.
- Benijts, T., Lambert, W., De Leenheer, A. Analysis of multiple endocrine disruptors in environmental waters via wide-spectrum solid-phase extraction and dual-polarity ionization LC-ion trap- MS/MS, *Anal Chem* (2004) 76, 704-711.
- Blanco, C., Picó, Y. (2009). Prospects for combining chemical and biological methods for integrated environmental assessment. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 28, No. 6.745 – 757.
- Birnbaum LS. Environmental chemicals: evaluating low-dose effects. *Environ Health Perspect.* 2012; 120:143–4.
- Bono-Blay, F.; Guart, A.; Fuente, B.; Pedemonte, M.; Pastor, M. C.; Borrell, A.; Lacorte, S. Survey of Phthalates, Alkylphenols, Bisphenol A and Herbicides in Spanish Source Waters Intended for Bottling. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2012, 19, 3339–3349.
- Brack, W., Klamer, H.J.C., De Alda, M.L., Barcelo, D., 2007. Effect-directed analysis of key toxicants in European River basins a review. *Environmental Science and Pollution Research* 14, 30-38.
- Brack, W. Effect-directed analysis: A promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? *Anal. Bioanal. Chem.* (2003) 377: 397–407
- Brack, W., Schmitt-Jansen, M., Machala, M., Brix, R., Barceló, D., Shymanski, E., Streck, Georg., Schulze, T. How to confirm identified toxicants in effect-directed analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. (2008), Volume 390, 8, pp 1959–1973.
- Brix, R., Hvidt, S., & Carlsen, L. (2001). Solubility of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates. On the possible role of micelles. *Chemosphere*, 44(4), 759–763.
- Brix R, Barceló D. Chapter 5.3. Traceability and interlaboratory studies on yeast-based assays for the determination of estrogenicity. In: Brix R, Barceló D, editors. *Rapid chemical and biological techniques for water monitoring*. John Wiley & Sons, Ltd; 2009. p. 371–81.
- Brix, R., Postigo, C., Gonzalez, S., Villagrasa, M., Navarro, A., Kuster, M., De Alda, M.J.L., Barcelo, D., 2010. Analysis and occurrence of alkylphenolic compounds and estrogens in a European River basin and an evaluation of their importance as priority pollutants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396, 1301-1309.
- Bro, R. PARAFAC. Tutorial and applications. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 38 (1997) 149-171.
- Brosa, L. Aplicació de Tècniques cromatogràfiques a la deteminació d'alteradors endocrins en aigües Tesis doctoral., 2004.
- Brossa, L., Marce, R.M., Borrull, F. Pocurull, E. Occurrence of twenty-six endocrine-disrupting compounds in environmental water samples from Catalonia, Spain. *Environ. Toxicol. Chem.* (2005).24: 261–67.
- Brown, S.D. Chemometrics. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R.A. Myers, Ed., Wiley Interscience, 9669-9671 (2000).
- Campbell P. Alternatives to nonylphenol ethoxylates. Review of toxicity, biodegradation & technical-economic aspects. *ToxEcology Environmental Consulting*, Vancouver, B.C., Canada. Report for Environment Canada; 2002.

- Campos-Such, D (2007). Estado ecológico del río Ter 2006. Consorci Alba-Ter. Documento inédito. 99 pp.
- Cargouet, M., Perdiz, D., Mouatassim-Souali, A., Tamisier-Karolak, S., & Levi, Y. (2004). Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Science of the Total Environment*, 324(1–3), 55–66.
- Carvalho, A. R. M., Cardoso, V. V., Rodrigues, A., Benoliel, M. J., & Duarte, E. A. (2015). Fate and analysis of endocrine-disrupting compounds in a wastewater treatment plant in Portugal. *Water Air Soil Pollution* (2016) 227: 202.
- Carvalho, A.R., Cardoso, V.V., Rodríguez, A., Ferreira, E., Benoliel, M.J., Duarte, E.A. Occurrence and analysis of endocrine-disrupting compounds in a water supply system. *Environmental Monitoring and Assessment, Environ Monit Assess* (2015) 187: 139.
- Castillo, M., Penuela, G., Barcelo, D., 2001. Identification of photocatalytic degradation products of non-ionic polyethoxylated surfactants in wastewaters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography–mass spectrometric detection. *Fresenius J. Anal. Chem.* 369, 620–628.
- Cavalheiro, J., Monperrus, M., Amouroux, D., Preud'Homme, H., Prieto, A., Zuloaga, O. In-port derivatization coupled to different extraction techniques for the determination of alkylphenols in environmental water samples, *J Chromatogr A* (2014) 1340, 1-7.
- Cerejeira, M.J., Viana, P., Batista, S., Pereira, T., Silva, E., Valério, M.J., Silva, A., Ferreira, M., Silva-Fernandes, A.M. Pesticides in Portugal surface and ground waters. *Water Res* 2003; 37:1055–63.
- Céspedes, R. Análisis y Vigilancia Ambiental de Compuestos Orgánicos Semivolátiles y Disruptores Endocrinos en aguas naturales. (2001). Máster experimental en Química Analítica,
- Céspedes, R., Petrovic, M., Raldúa, D., Saura, U., Piña, B., Lacorte, S., Viana, P., Barceló, D. . 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. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Vol. 378 (2004) 697-708.
- Céspedes, R., Lacorte, S., Raldúa, D., Ginebreda, A., Barcelo, D., Piña, B., 2005. Distribution of endocrine disruptors in the Llobregat River basin (Catalonia, Ne Spain). *Chemosphere* 61,(2005) 1710-1719.
- Céspedes, R., Skryjová, K., Rackova, M., Zeravik, J., Fránek, M., Lacorte, S., Barceló, D. Validation of an ELISA for the Determination of 4-Nonylphenol and Octylphenol in Surface and Waste Water Samples by LC-ESI-MS. *Talanta*. Vol. 70 (2006) 745-751.
- Céspedes, R., Lacorte, S., Ginebreda, A., Barceló, D. Chemical monitoring and occurrence of alkylphenols, alkylphenol ethoxylates, alcohol ethoxylates, phthalates and benzothiazoles in sewage treatment plants and receiving waters along the Ter River basin (Catalonia, N. E. Spain), *Anal Bioanal Chem* (2006) V. 385, 992-1000.
- Céspedes R, Lacorte S, Ginebreda A, Barcelo D. Occurrence and fate of alkylphenols and alkylphenols ethoxylates in sewage treatment plants and impact on receiving waters along the Ter River (Catalonia,
- Céspedes, R., Skryjova, K., Rakova, M., Zeravik, J., Franek, M., Lacorte, S., & Barcelo, D. (2006). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of 4-nonylphenol and octylphenol in surface water samples by LC-ESI-MS. *Talanta*, 70(4), 745_751.
- Céspedes, R; Petrovic, M; Raldúa, D; Saura, U; Piña, B; Lacorte, S; Viana, P; Barceló, D. (2004) Integrated protocol for the determination of endocrine disrupting activity in the surface waters and sediments using biological techniques by recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. *Analytical Bioanalytical Chemistry*. Vol. 378, 697-708.
- Chang BV, Yu CH, Yuan SY. Degradation of nonylphenol by anaerobic microorganisms from river sediment. *Chemosphere* 2004;55:493–500.
- Chang BV, Chiang F, Yuan SY. Anaerobic degradation of nonylphenol in sludge. *Chemosphere* 2005;59:1415–20.
- Chaube, R., Gautam, G. J., & Joy, K. P. (2013). Teratogenic effects of 4-nonylphenol on early embryonic and larval development of the catfish *Heteropneustes fossilis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 64(4), 554_561.
- Chen, B., Mai, B.X., Duan, J.C., Luo, X.J., Yang, Q.S., Sheng, G.Y., Fu, J.M. Concentrations of alkylphenols in sediments from the Pearl River estuary and South China Sea, South China, *Mar Poll Bull* (2005) 50, 993-997.
- Chen, C. C., Lin, Y. P., Wang, C. W., Tzeng, H. C., Wu, C. H., Chen, Y. C., . . . Wu, Y. C. (2006). DNA-gold nanorod conjugates for remote control of localized gene expression by near infrared irradiation. *Journal of the American Chemical Society*, 128(11), 3709_3715.

- Choi, Y.S., Cho, S., Lee, C., Luu, H.M.-D., Guo, J. Contamination of ultrapure water with bisphenol A leached from polysulfone ultrafilter, *Talanta* (2012) 94, 353.
- Colborn T, vom Saal FS, Soto AM. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 1993; 101: 378.
- Coldham NG, Dave M, Sivapathasundaram S, McDonnell DP, Connor C, Sauer MJ. 1997. Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay. *Environ Health Perspect* 105:734– 742.
- Commission of the European Communities. 1976. Dangerous substances discharge into the environment. L 129. Directive 76/464/ CEE. In Official Journal of the European Community. Brussels, Belgium.
- Commission of the European Communities. 1976. Guidance document on elements for pollution reduction programs under article 7 of council directive 76/464/CEE. ADONIS 71065. Brussels, Belgium.
- Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive. Environmental Quality Standards, Substance Data sheet (25): octylphenol (para-tert-octylphenol), 2005.
- Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive. Environmental Quality Standards (EQS). Substance Data sheet (24): Nonylphenols and 4-Nonylphenol, 2005.
- Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive. Environmental Quality Standards, Substance Data sheet (25): octylphenol (para-tert-octylphenol), 2005.
- Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive. Environmental Quality Standards (EQS). Substance Data sheet (24): Nonylphenols and 4-Nonylphenol, 2005.
- Corcia A. Analysis of free estrogens and their conjugates in sewage and river waters by solid-phase extraction then liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Chromatographia* 2002; 56: 25.
- Croce, V., Patrolecco, L., Polesello, S., Valsecchi, S. Extraction of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates from river sediments: Comparison of different extraction techniques, *Chromatographia* (2003) 58, 145-149.
- Croley TR, Hughes RJ, Koenig BG, Metcalfe CD, March RE. Mass spectrometry applied to the analysis of estrogens in the environment. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000; 14: 1087.
- Cruceru, I., Florescu, A.; Badea, I. A.; Vladescu, L. Determination of Three Alkylphenol Isomers in Various Water Samples Using a New HPLC Method Based on a Duet Stationary Phase. *Environ. Monit. Assess.* 2012, 184, 6061–6070.
- Dachs, J., Van Ry, D.A., Eisenreich, S.J. Occurrence of Estrogenic Nonylphenols in the Urban and Coastal Atmosphere of the Lower Hudson River Estuary, *Environ Sci Technol* (1999) 33, 2676-2679.
- David, A., Gómez, E., Ait-Aissa, S., Bachelot, M., Rosain, D., Casellas, C., Fenet, H. Monitoring organic contaminants in small French coastal lagoons: comparison of levels in mussel, passive sampler and sediment, *J Environ Monit* (2010) 12, 1471-1481.
- De Juan A, Tauler R. 2001. Comparison of three-way resolution methods for non-trilinear data sets. *J Chemom* 15:749–771.
- De Juan, A.; Casassas, E.; Tauler, R. in: R.A. Myers (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, vol. 11, Wiley, Chichester, West Sussex, UK, 2002, pp. 9800–9837
- De Juan, A.; Tauler, R. Chemometrics applied to unravel multicomponent processes and mixtures: Revisiting latest trends in multivariate resolution. *Anal. Chim. Acta* 2003, 500, 195-210.
- De Voogt, P., van Hattum, B. Critical factors in exposure modeling of endocrine active substances, *Pure Appl Chem* (2003) 75, 1933-1948.
- Decisión de la Comisión 2002/657/CE, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. DOCE, L 221/8.
- Decisión de la Comisión de 12 de agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. DOCE, L 221/8.
- Dhooge W, Arijis K, D'Haese I, Stuyvaert S, Versonnen B, Janssen C, et al. Experimental parameters affecting sensitivity and specificity of a yeast assay for estrogenic compounds: results of an interlaboratory validation exercise. *Anal Bioanal Chem* 2006;386(5):1419–28.

Diamanti-Kandarakis E et al. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Reviews*, 30(4):293–342.

Diaz, A., Ventura, F., Galceran, M.T., 2002a. Development of a solid-phase micro-extraction method for the determination of short-ethoxy-chain nonylphenols and their brominated analogs in raw and treated water. *Journal of Chromatography A* 963, 159-167.

Diaz, A., Ventura, F., Galceran, M.T., 2002b. Simultaneous determination of estrogenic short ethoxy chain nonylphenols and their acidic metabolites in water by an in-sample derivatization/solid-phase microextraction method. *Analytical Chemistry* 74, 3869-3876.

Diaz, A., Ventura, F., Galceran, M.T., 2004. Identification of 2,3-butanedione (diacetyl) as the compound causing odor events at trace levels in the Llobregat River and Barcelona's treated water (Spain). *Journal of Chromatography A* 1034, 175-182.

Diaz-Cruz MS, de Alda MJL, Lopez R, Barcelo D. Determination of estrogens and progestogens by mass spectrometric techniques (GC/MS, LC/MS and LC/MS/MS). *J. Mass Spectrom.* 2003;38 (9):917–23.

Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de octubre de 2000 por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. DOCE, L 327/1.

Directiva 2002/72/CE de la Comisión de 6 de agosto de 2002 relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. DOCE, L 220/18.

Directiva 2003/53/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 18 de junio de 2003, por la que se modifica por vigésimo sexta vez la Directiva 76/769/CEE del Consejo respecto a la limitación y comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos (nonilfenol, etoxilados del nonilfenol y cemento). DOUE, L 178/24.

Directiva 2004/107/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 115 de diciembre de 2004 relativa al arsénico, el cadmio, el mercurio, el níquel y los hidrocarburos aromático policíclicos en el aire ambiente. DOUE, L 23/3.

Directiva 2008/105/CE del Parlamento y del Consejo de 16 de diciembre de 2008 relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la que se modifican y derogan ulteriormente las Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE,

Directiva 2008/56/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de junio de 2008 por la que se establece un marco de acción comunitaria para la política del medio marino (Directiva Marco sobre la Estrategia Marina). DOUE, L 164/19.

Directiva 2009/90/CE de la Comisión del 31 de julio de 2009 por la que se establecen, de conformidad con la Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las especificaciones técnicas del análisis químico y del seguimiento del estado de las aguas. DOUE, L 201/36.

Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de agosto de 2013 por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas. DOUE, L 226/1.

Directiva 76/769/CEE del Consejo de 27 de julio de 1976 relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros que limitan la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos. DOCE, L 262/201.

Directiva 96/23/CE del Consejo de 29 de abril de 1996 relativa las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y por la que se derogan las Directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las Decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE. DOCE, L 125/10.

Directiva 98/83/CE del Consejo de 3 de noviembre de 1998 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. DOCE, L 330/32.

Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *Official Journal of the European Union*.

Directive 2003/53/EC. Book of the amending for the 26th time Council Directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (nonylphenol, nonylphenol ethoxylate and cement). *Official Journal of the European Union*, L178, 24–27.

ECETOC, 1996. ECETOC Monograph No. 33. Environmental Oestrogens —A Compendium of Test Methods. Brussels.

ECHA (2018). List of registered substances. Helsinki, Finland, European Chemicals Agency. Available at: <https://echa.europa.eu/es/information-on-chemicals/registered-substances>

- ECHA (2012). Candidate list of substances of very high concern for authorisation. Helsinki, Finland, European Chemicals Agency. Available at: <http://echa.europa.eu/web/guest/candidate-list-table>.
- ECHA (2014) Nonylphenol and nonylphenol ethoxylates. Technical report. European Chemicals Agency, Committee for Risk Assessment (RAC), Committee for Socio-economic Analysis (SEAC)
- EEA Technical Report No2/2012: The impacts of endocrine disrupters on wildlife, people and their environments. The Weybridge+15 (1996–2011) report
- Esteban S, Gorga M, Petrovic M, González-Alonso S, Barceló D, Valcárcel Y (2014) Analysis and occurrence of endocrine-disrupting compounds and estrogenic activity in the surface waters of Central Spain. *Sci Total Environ* 466–467:939–951
- E.U. Decision No 2455/2001/CE of the European Parliament and of the Council of 20 November establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending Directive 2000/60/CE.
- E.U., Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals (REACH).
- EFSA, European Food Safety Authority (2015). www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub3978.htm
- Eichhorn, P., Knepper, T.P., Ventura, F., Diaz, A., 2002. The behavior of polar aromatic sulfonates during drinking water production: a case study on sulfophenyl carboxylates in two European waterworks. *Water Research* 36, 2179–2186.
- Eichhorn, P., Petrovic, M.O and occurrence of endocrine-disrupting compounds and estrogenic activity in the surface waters of Central Spain. *Science of the Total Environment* 466. 939– 951
- Estévez, M. C., Kreuzer, M., Sánchez-Baeza, F., & Marco, M. P. (2006). Analysis of nonylphenol: Advances and improvements in the immunochemical determination using antibodies raised against the technical mixture and hydrophilic immunoreagents. *Environmental Science & Technology*, 40(2), 559–568.
- European Communities. 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000. Brussels, Belgium.
- European Environment Agency (2012). Impacts of endocrine disrupters on wildlife, people and their environments— Weybridge+15 (1996– 2011) report. Copenhagen, Denmark, European Environment Agency, 112 pp. (Technical Report No. 2/2012).
- European Food Safety Authority (2011). Comprehensive Food Consumption Database EPA-1997, Exposure Factors Handbook, Environmental Protection Agency
- Farre M, Kloter G, Petrovic M, Alonso MC, de Alda MJL, Barcelo D. Identification of toxic compounds in wastewater treatment plants during a field experiment. *Anal Chim Acta* 2002;456(1):19–30.
- Farre M, Kuster M, Brix R, Rubio F, Alda M-J, Alda M-JLd, et al. Comparative study of an estradiol enzyme-linked immunosorbent assay kit, liquid chromatography– tandem mass spectrometry, and ultra performance liquid chromatography–quadrupole time of flight mass spectrometry for part-per-trillion analysis of estrogens in water samples. *J Chromatogr* 2007;1160(1–2):166–75.
- Farré, M., Kantiani, L., Barceló, D. (2007). Advances in immunochemical technologies for analysis of organic pollutants in the environment. *TrAC. Trends in Analytical Chemistry*. Vol. 26, N. 11
- Fernández, M.P., Noguero, T.N., Lacorte, S., Buchanan, I., Piña, B. (2007) RYA Toxicity identification fractionation of environmental estrogens in waste water and sludge using gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry and recombinant yeast. 393, 957–968.
- Ferguson, P.L., Iden, C.R., Brownawell, B.J., 2001. Distribution and fate of neutral alkylphenol ethoxylate metabolites in a sewage-impacted urban estuary. *Environ. Sci. Technol.* 35, 2428–2435.
- Ferguson, P.L., Bopp, R.F., Chillrud, S.N., Aller, R.C., Brownawell, B.J., 2003. Biogeochemistry of nonylphenol ethoxylates in urban estuarine sediments. *Environ. Sci. Technol.* 37, 3499–3506.
- Ferrara, F., Fabietti, F., Delise, M., & Funari, E. (2005). Alkylphenols and alkylphenol ethoxylates contamination of crustaceans and fishes from the Adriatic Sea (Italy). *Chemosphere*, 59(8), 1145–1150.
- Ferreira, J. G., Simas, T., Nobre, A., Silva, M. C., Shifferegger, K., & Lencart-Silva, J. (2003). Identification of sensitive areas and vulnerable zones in transitional and coastal Portuguese systems. Application of the United States National Estuarine Eutrophication Assessment to the Minho, Lima, Douro, Ria de Aveiro, Mondego, Tagus, Sado, Mira, Ria Formosa and Guadiana systems. IMAR.

- Ferrer, E., Santoni, E., Vittori, S., Font, G., Manes, J., & Sagratini, G. (2011). Simultaneous determination of bisphenol A, octylphenol, and nonylphenol by pressurised liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry in powdered milk and infant formulas. *Food Chemistry*, 126(1), 360–367.
- Franek, M., Zeravik, J., Eremin, S. A., Yakovleva, J., Badea, M., Danet, A., Emneus, J. (2001). Antibody-based methods for surfactant screening. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 371(4), 456–466.
- Franek, M., & Hruska, K. (2005). Antibody based methods for environmental and food analysis: A review. *Veterinarni Medicina*, 50(1), 1–10. Retrieved from <http://www.vri.cz/docs/vetmed/50-1-1.pdf>
- Franek M. (1987): Structural aspects of steroid antibody specificity. *Journal of Steroid Biochemistry*, 28, 95–108.
- Franek M. (2000): Immunochemistry of PCBs: Scope and limitations in environmental and food analysis. Ab-stracts of Papers of the American Chemical Society, 219, U117–U117.
- Franek M., Deng A.P., Kolar V. (2000): Performance characteristics for flow injection immunoassay using monoclonal antibodies against s-triazine and 2,4-D herbicides. *Analytica Chimica Acta*, 412, 19–27.
- Franek M., Deng A.P., Kolar V., Socha J. (2001a): Direct competitive immunoassays for the coplanar polychlorinated biphenyls. *Analytica Chimica Acta*, 444, 131–142.
- Fujita, M., Ike, M., Goda, Y., Fujimoto, S., Toyoda, Y., Miyagawa, K., 1998. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of linear alkylbenzene sulfonate: development and field studies. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1143–1146.
- Fujita, M., Ike, M., Mori, K., Kaku, H., Sakaguchi, Y., Asano, Y., Nishihara, T., 2000. Behavior of nonylphenol ethoxylates metabolites in sewage treatment plants in Japan biotransformation and ecotoxicity. *Water Sci. Technol.* 42, 23–30.
- Gaido KW, Leonard LS, Lovell S, Gould JC, Babai D, Portier CJ, McDonnell DP. 1997. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol Appl Pharmacol* 143:205–212.
- Gallart-Ayala, H., Moyano, E., Galcerán, M.T. On-line solid phase extraction fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bisphenol A and its chlorinated derivatives in water samples, *J Chromatogr A* (2010) 1217, 35113518.
- Gallart-Ayala, H., Moyano, E., Galcerán, M.T. Recent Advances in Mass Spectrometry Analysis of Phenolic Endocrine Disruptors and Related Compounds, *Mass Spectr Rev* (2010) 29, 776- 805.
- Gallart-Ayala, H.; Moyano, E.; Galceran, M. T. Analysis of Bisphenols in Soft Drinks by On-line Solid Phase Extraction Fast Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 2011b, 683, 227–233.
- Gallart-Ayala, H.; Moyano, E.; Galceran, M. T. Fast Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry for the Analysis of Bisphenol A-Diglycidyl Ether, Bisphenol F-Diglycidyl Ether and Their Derivatives in Canned Food and Beverages. *J. Chromatogr. A* **2011a**, 1218, 1603–1610.
- Garcia-Reyero, N., Grau, E., Castillo, M., De Alda, M.J.L., Barcelo, D., Piña, B., 2001. Monitoring of endocrine disruptors in surface waters by the yeast recombinant assay. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 1152-1158.
- Garcia-Reyero, N., Raldua, D., Quiros, L., Llavera, G., Cerda, J., Barcelo, D., Grimalt, J.O., Piña, B., 2004. Use of vitellogenin mRNA as a biomarker for endocrine disruption in feral and cultured fish. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378, 670-675.
- Garcia-Reyero N, Requena V, Petrovic M, Fischer B, Hansen PD, Diaz A, et al. Estrogenic potential of halogenated derivatives of nonylphenol ethoxylates and carboxylates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2004;23(3):705–11.
- Gatidou, G., Thomaidis, N.S., Stasinakis, A.S., Lekkas, T.D. Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr A* (2007) 1138, 32-41.
- Geladi, P., Analysis of multiway (multimode) data. *Chemom Intell Lab Syst.*, 7, 11-30, (1989).
- Geladi, P., Kowalski, B.R.(1986). Partial least-squares regression: a tutorial. *Anal. Chim. Acta* 185, 1-17.
- Gemperline, P. Practical Guide to Chemometrics, Second Edition, CRC Press, Boca Raton FL, 2006.

Ghekiere, A., Verslycke, T., & Janssen, C. (2006). Effects of methoprene, nonylphenol, and estrone on the vitellogenesis of the mysid *Neomysis integer*. *General and Comparative Endocrinology*, 147(2), 190_195.

Gentili, A., Perret, D., Marchese, S., Mastropasqua, R., Curini, R., and Di Corcia, A. Analysis of free estrogens and their conjugates in sewage and river waters by solid-phase extraction then liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Chromatographia* (2002).**26**: 25–32.

Giger W, Brunner PH, Schaffner C. 4-Nonylphenol in sewage-sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science* 1984;225:623–5.

Ginebreda, A., Muñoz, I., de Alda, M.L., Brix, R., Lopez-Doval, J., Barcelo, D., 2010. Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat River (Ne Spain). *Environment International* 36, 153-162.

Goda, Y., Kobayashi, A., Fujimoto, S., Toyoda, Y., Miyagawa, K., Ike, M., & Fujita, M. (2004). Development of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of alkylphenol polyethoxylates and their biodegradation products. *Water Research*, 38(20), 4323_4330.

Gomes RL, Scrimshaw MD, Lester JN. Determination of endocrine disrupters in sewage treatment and receiving waters. *Trends Anal Chem* 2003;22(10):697–707.

Gomes, R-L. Avcioglu, E., Scrimshaw, M-D., and Lester, J.N.. Steroid estrogen determination in sediment and sewage sludge: a critique of sample preparation and chromatographic/mass spectrometry considerations, incorporating a case study in method development. *Trends Anal. Chem.* **23**: 737–44 (2004).

Gonzalez, S., Petrovic, M., Barcelo, D., 2004. Simultaneous extraction and fate of linear alkylbenzene sulfonates, coconut diethanol amides, nonylphenol ethoxylates and their degradation products in wastewater treatment plants, receiving coastal waters and sediments in the Catalanian area (Ne Spain). *Journal of Chromatography A* 1052,111-120.

Gonzalez, S., López de Alda, R., Cortina, J.L., 2012. Review: Presence and biological effects of emerging contaminants in Llobregat River: A review. *Environmental Pollution* 161 (2012) 83-92.

González, A., Valenzuela, L. La levadura *Saccharomyces cerevisiae*: un modelo de estudio desde hace más de cien años Add bibliografía Benjamí Piña

Gorga M, Petrovic M, Barceló D. Multi-residue analytical method for the determination of endocrine disruptors and related compounds in river and waste water using dual column liquid chromatography switching system coupled to mass spectrometry. *J Chromatogr A* (2013); 1295:57–66.

Gorga M, Insa, S., Petrovic M, Barceló D. Occurrence and spatial distribution of EDCs and related compounds in waters and sediments of Iberian rivers *Science of the Total Environment*, (2015) 503, 69-86.

Gray MA, Metcalfe CD. Toxicity of 4-tert-octylphenol to early life stages of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat Toxicol* 1999; 46:149–54.

Grover, D.P., Balaam, J., Pacitto, S., Readman, J.W., White, S. and Zhou, J.L., 2011. Endocrine disrupting activities in sewage effluent and river water determined by chemical analysis and in vitro assay in the context of granular activated carbon upgrade. *Chemosphere* 84(10), 1512-1520.

Grote, M., Brack, W., Walter, H.A., Altenburger, R. Confirmation of cause-effect relationships using effect-directed analysis for complex environmental samples. *Environmental Toxicology and chemistry*. 2005. Pages 1420-1427.

Guenther K, Heinke V, Thiele B, Kleist E, Prast H, Raecker T (2002) Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food. *Environ Sci Technol* 36:1676–1680

Hanselman, T.A. Graetz, D.A Wilkie, A.C. Szabo, N.J. and Diaz. C.S. 2006. Determination of steroidal estrogens in flushed dairy manure wastewater by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Environ. Qual.* 35: 695–700.

Harris CA, Henttu P, Parker MG, Sumpter JP. The estrogenic activity of phthalate esters in vitro. *Environ Health Perspect* 1997; 105:802–11.

Hecker, M; Hollert, H; Effect-directed analysis (EDA) in aquatic ecotoxicology: state of the art and future challenges. *Environmental Science and Pollution Research*. 2009, Volume 16, Issue 6, pp 607–613.

Henrion, R., (1994). N-way principal component analysis theory, algorithms and applications, *Chemom Intell Lab Syst* 25, 1-23.

- Huang, X.; Lin, J.; Yuan, D.; Hu, R. Determination of Steroid Sex Hormones in Wastewater by Stir Bar Sorptive Extraction Based on Poly (vinylpyridine-ethylene dimethacrylate) Monolithic Material and Liquid Chromatographic Analysis. *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 3508–3511.
- Inoue, K., Wada, M., Higuchi, T., Oshio, S., Umeda, T., Yoshimura, Y., Nakazawa, H. Application of liquid chromatography-mass spectrometry to the quantification of bisphenol A in human semen, *J Chromatogr B* (2002) 773, 997-102.
- International Programme on Chemical Safety. 2002. Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors. Geneva:World Health Organization. Available: <http://www.who.int/ipcs/publications/newissues/endocrinedisruptors/en/>.
- IPCS (2002). Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. Geneva, Switzerland, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.
- Isobe T, Shiraishi H, Yasuda M, Shinoda A, Suzuki H, Morita M. Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid-chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2003; 984: 195.
- Isobe, T., Takada, H., Kanai, M., Tsutsumi, S., Isobe, K.O., Boonyatumanond, R., Zakaria, M.P. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and phenolic endocrine disrupting chemicals in south and southeast Asian mussels, *Environ. Monit. Assess.* (2007) 135, 423- 440.
- Jaumot Soler, J. (2006) Memoria tesis doctoral: Nous desenvolupaments, aplicacions bio analítiques i validació de mètodes de resolució multivariant.
- Jobling S, Sumpter JP. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat Toxicol* 1993;27: 361–72.
- Jobling S, Reynolds T, White R, Parker MG, Sumpter JP. A variety of environmentally persistent chemicals, including some plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ Health Perspect* 1995;103:582–7.
- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G., Sumpter, J.P., 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2498–2506.
- John DM, House WA, White GF. Environmental fate of nonylphenol ethoxylates: differential adsorption of homologs to components of river sediment. *Environ Toxicol Chem* 2000;19:293–300.
- Johnson, A.C., Belfroid, A., Di Corcia, A., 2000. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Sci. Total Environ.* 256, 163–173.
- Johnson, A.C., Sumpter, J.P., 2001. Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. *Environ. Sci. Technol.* 35, 4697–4703.
- Johnson AC, Aerni H-R, Gerritsen A, Gibert M, Giger W, Hylland K, et al. Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment and management practices. *Water Res* 2005;39:47–58.
- Joliffe, I.T., (1986) *Principal Component Analysis*, Springer. New York, NY, USA.
- Joliffe, I.T., (2002). *Principal Component Analysis*. Springer series in statistics. Springer-Verlag. New York, NY, USA.
- Jonkers N, Knepper TP, De Voogt P. Aerobic biodegradation studies of nonylphenol ethoxylates in river water using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Environ Sci Technol.* 2001;35:335–40.
- Jonkers N, Laane R, De Voogt P. Fate of nonylphenol ethoxylates and their metabolites in two Dutch estuaries: evidence of biodegradation in the field. *Environ Sci Technol* 2003;37:321–7.
- Jonkers, N., Laane, R., de Graaf, C., de Voogt, P. Fate modeling of nonylphenol ethoxylates and their metabolites in the Dutch Scheldt and Rhine estuaries: validation with new field data, *Estuar Coast Shelf Sci* (2005) 62, 141-160.
- Jonkers, N., Sousa, A., Galante-Oliveira, S., Barroso, C., Kohler, H., Giger, W. Occurrence and sources of selected phenolic compounds disruptors in Ria de Aveiro, Portugal, *Environ Sci Pollut Res* (2010) 17, 834-843.
- Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J.A., Matthiessen, P., Sumpter, J.P., 1996. Inhibition of testicular growth in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 194–202.

- Jonkers, N., Laane, R.W.P.M., de Voogt, P., 2003. Fate of nonylphenol ethoxylates and their metabolites in two dutch estuaries: evidence of biodegradation in the field. *Environ. Sci. Technol.* 37, 321–327.
- Johnson, A.C., Aerni, H.R., Gerritsen, A., Gibert, M., Giger, W., Hylland, K., Jurgens, M., Nakari, T., Pickering, A., Suter, M.J.F., Svenson, A., Wettstein, F.E., 2005. Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across a range European sewage plants with different treatment and management practices. *Water Res.* 39, 47–58.
- Jones, F.W., Westmoreland, D.J., 1998. Degradation of nonylphenol ethoxylates during the composting of sludges from wool scour effluent. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2623–2627.
- Jones, F.W., Westmoreland, D.J., 1999. Removal of wool wax, nonylphenol ethoxylates and pesticide residues from wool scour effluent. *Water Res.* 33, 1775–1780.
- Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C. et al. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect* 104(suppl 4): (1996) 715-740.
- Köck-Schulmeyer, M., Villagrasa, M., López de Alda, M., Céspedes-Sánchez, R., Ventura, F., Barceló, D. Occurrence and behavior of pesticides in wastewater treatment plants and their environmental impact. *Science of the Total Environment* 458–460 (2013) 466–476
- Köck-Schulmeyer, M., Plaguicidas polares en el medioambiente: análisis, presencia y evaluación de riesgo. Tesis doctoral. 2014
- Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT (2002) Pharmaceuticals, hormones, and other or-organic wastewater contaminants in U.S. streams 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ Sci Technol* 36:1202–1211
- Koh, Y. K., Chiu, T. Y., Paterakis, N., Boobis, A., Scrimshaw, M. D., Lester, J. N., & Cartmell, E. (2009). Fate and occurrence of alkylphenolic compounds in sewage sludges determined by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Environmental Technology*, 30(13), 1415_1424.
- Kortenkamp A, Martin O, Faust M, Evans R, McKinlay R, Orton F, et al. (2011). State of the Art Assessment of Endocrine Disruptors. Final Report. European Commission, Directorate-General for the Environment Available:[http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/sota_edc_final_report.pdf]
- Kortenkamp A (2007). Ten years of mixing cocktails: A review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 115:98-105.
- Krishnan, A.V., Stathis, P., Permuth, S.F., Tokes, L., Feldman, D., 1993. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132, 2279–2286.
- Kuch HM, Ballschmiter K. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. *Environ Sci Technol* 2001;35:3201–6.
- Kuster, M., López deAlda, M.J., Barata, C., Raldúa, D., Barceló, D., 2008. Analysis of seventeen polar to semi-polar pesticides in the Ebro river delta during the main growing season of rice by automated on-line solid phase extraction-liquid chromatography- tandem mass spectrometry. *Talanta* 75 (2), 390–401.
- Kuster, M., López, M.J., de Alda, M.J.L., Barceló, D. Analysis and distribution of estrogens and progestogens in sewage sludge, soils and sediments, *TrAC -Trends Anal Chem* (2004) 23, 790-798.
- La Guardia, M.J., Hale, R.C., Harvey, E.P., Mainor, T.M., 2001. Alkylphenol ethoxylate degradation products in land-applied sewage sludge (biosolids). *Environ. Sci. Technol.* 35, 4798–4804.
- Labadie, P and Budzinski, H. Determination of steroidal hormone profiles along the Jalle d’Eysines River (near Bordeaux, France). *Environ. Sci. Technol.* 39: 5113–20 (2005).
- Labadie, E. and Hill, E.M., Analysis of estrogens in river sediments by liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry. Comparison of tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1141: 174–81 (2007).
- La Farré M, Perez S, Kantiani L, Barcelo D (2008) Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *Trac-Trend Anal Chem* 27(11)
- Lacorte S, Latorre A, Guillamon M, Barcelò D (2002) Nonylphenol, octylphenol, and bisphenol a in groundwaters as a result of agro-nomic practices. *Sci World J* 2:1095–1100

- Lacorte S, Viana P, Guillamon R, Tauler R, Vinhas T, Barcelo D. 2001. Main findings and conclusions of the implementation of Directive 76/464/CEE concerning the monitoring of organic pollutants in surface waters (Portugal, April 1999–May 2000). *J Environ Monit* 3:475–482.
- LaFleur, A. D.; Schug, K. A. A Review of Separation Methods for the Determination of Estrogens and Plastics-Derived Estrogen Mimics from Aqueous Systems. *Anal. Chim. Acta* (2011), 696, 6–26.
- Laganá A, Bacaloni A, Fago G, Marino A. Trace analysis of estrogenic chemicals in sewage effluent using liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000; 14: 401.
- Laganá A, Bacaloni A, De Leva I, Faberi A, Fago G, Marino A. 2004. Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Anal Chim Acta* 501:79–88.
- Langford, K.H., Lester, J.N., 2002. Fate and behavior of endocrine disrupters in wastewater treatment processes. In: Brikett, J.W., Lester, J.N. (Eds.), *Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes*. CRC Press Inc, Boca Raton, USA.
- Langford KH, Scrimshaw MD, Brikett JW, Lester JN. Degradation of nonylphenolic surfactants in activated sludge batch tests. *Water Res* 2005a;39:870–6.
- Langford KH, Scrimshaw MD, Brikett JW, Lester JN. The partitioning of alkylphenolic surfactants and polybrominated diphenyl ether flame retardants in activated sludge batch tests. *Chemosphere* 2005b;61:1221–30.
- Lara-Martin PA, Gomez-Parra A, Barcelo D, Gonzalez-Mazo E (2006) Presence of surfactants and their degradation intermediates in sediment cores and grabs from the Cadiz Bay area. *Environ Pollut* 144: 483–491
- Lara-Martin, P.A., González-Mazo, E., Petrovic, M., Barceló, D., Brownawell, B.J. Occurrence, distribution and partitioning of nonionic surfactants and pharmaceuticals in the urbanized Long Island Sound Estuary (NY). *Marine Pollution Bulletin* 85 (2014) 710–719
- Latorre, A., Lacorte, S., Barceló, D. Presence of nonylphenol, octylphenol and bisphenol a in two aquifers close to agricultural, industrial and urban areas. *Chromatographia* (2003).57: 111–16.
- Lee HB, Peart TE. Determination of 17 β -estradiol and its metabolites in Sewage effluent by solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 1998; 81: 1209.
- Lee, H.B., 1999. Review of analytical methods for the determination on nonylphenol and related compounds in environmental samples. *Water Qual. Res. J. Can.* 34, 3–35.
- Legler J, Dennekamp M, Vethaak AD, Brouwer A, Koeman JH, van der Burg B, et al. Detection of estrogenic activity in sediment-associated compounds using *in vitro* reporter gene assays. *Sci Total Environ* 2002;293(1–3):69–83.
- Li, D., Dong, M., Shim, W.J., Hong, S.H., Oh, J.R., Yim, U.H., Jeung, J.H., Kanan, N., Kim, E.S., Cho, S.R., 2005. Seasonal and spatial distribution of nonylphenol and IBP in Saemangeum Bay, Korea. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 966–974.
- Li, D., Kim, M., Shim, W.J., Yim, U.H., Oh, J.R., Kwon, Y.S., 2004. Seasonal flux of nonylphenol in Han River, Korea. *Chemosphere* 56, 1–6.
- Li, X., Ying, G.-G., Su, H.-C., Yang, X.-B., Wang, L. Simultaneous determination and assessment of 4- nonylphenol, bisphenol A and triclosan in tap water, bottled water and baby bottles, *Environ Int* (2010) 36, 557–562.
- Lin, C.; Fuh, M.; Huang, S. Application of Liquid–Liquid Microextraction and High-Performance Liquid Chromatography for the Determination of Alkylphenols and Bisphenol-A in Water. *J. Sep. Sci.* 2011, 34, 428–435.
- Lin Z-P, Ikonomou MG, Jing H, Mackintosh C, Gobas FAPC. Determination of phthalate ester congeners and mixtures by LC/ESI-MS in sediments and biota of an urbanized marine inlet. *Environ Sci Technol* 2003;37:2100–8.
- Lister AL, Van Der Kraak GJ. Endocrine disruption: why is it so complicated? *Water Qual Res J Can* 2001;36(2):175–90.
- Liu, J.F., Liang, X., Jiang, G.B., Cail, Y.Q., Zhou, Q.X., Liu, G.G. High performance liquid chromatography determination of 4-nonylphenol, 4-tert-octylphenol, and their short ethoxyl chain polyethoxylates in water samples using a microporous membrane liquid-liquid extraction sample pretreatment technique, *J Separ Sci* (2003) 26, 823-828.
- Liu, X.Y., Zhang, X.Y., Zhang, H.X., Liu, M.C. A chemometric strategy for optimization of solid-phase microextraction: Determination of bisphenol a and 4-nonylphenol with HPLC, *Journal Of Chromatographic Science* (2008) 46, 596-600.

- Liu, Z., Kanjo, Y., Mizutani, S. Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment — physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: A review. *Science of the Total Environment*. (2009) 407, 731748.
- Liu, Y., Guan, Y.T., Tam, N.F.Y., Mizuno, T., Tsuno, H., Zhu, W.P. Influence of Rainfall and Basic Water Quality Parameters on the Distribution of Endocrine-Disrupting Chemicals in Coastal Area, *Water Air Soil Poll* (2010) 209, 333-343.
- Liu, H., Cui, K., Zeng, F., Chen, L., Cheng, Y., Li, H., Li, S., Zhou, X., Zhu, F., Ouyang, G., Luan, T., Zeng, Z. Occurrence and distribution of phthalate esters in riverine sediments from the Pearl River Delta region, South China, *Mar Poll Bull* (2014) 83, 358-365.
- Loos R, Hanke G, Umlauf G, Eisenreich SJ (2007) LC-MS-MS analysis and occurrence of octyl- and nonylphenol, their ethoxylates and their carboxylates in Belgian and Italian textile industry, waste water treatment plant effluents and surface waters. *Chemosphere* 66:690–699
- Loos, R., Wollgast, J., Castro-Jimenez, J., Mariani, G., Huber, T., Locoro, G., Hanke, G., Umlauf, G., Bidoglio, G., Hohenblum, P., Moche, W., Weiss, S., Schmid, H., Leiendecker, F., Ternes, T., Ortega, A.N., Hildebrandt, A., Barcelo, D., Lepom, P., Dimitrova, I., Nitcheva, O., Polesello, S., Valsecchi, S., Boutrup, S., Sortkjaer, O., de Boer, R., Staeb, J. Laboratory intercomparison study for the analysis of nonylphenol and octylphenol in river water, *TrAC-Trends Anal Chem* (2008) 27, 89-95.
- Loos, R., Gawlik, B.M., Locoro, G., Rimaviciute, E., Contini, S., Bidoglio, G., 2009. EU-wide survey of polar organic organic persistent pollutants in European river waters. *Environ. Poll.* 157, 561–568.
- Loos, R.; Locoro, G.; Contini, S. Occurrence of polar organic contaminants in the dissolved water phase of the Danube River and its major tributaries using SPE-LC-MS2 analysis. *Water Res.* 2010, 44, 2325–2335.
- Loos R, Locoro G, Comero S, Contini S, Schwesig D, Werres F, Balsaa P, Gans O, Weiss S, Blaha L, Bolchi M, Gawlik B (2010) Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. *Water Res* 44:4115–4126
- Lopes, J.F., Dias, J.M., Cardoso, A.C., Silva, C.I.V. The water quality of the Ria de Aveiro lagoon, Portugal: From the observations to the implementation of a numerical model. *Marine Environmental Research* 60 (2005) 594–628.
- López de Alda MJ, Barceló D. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2000; 892: 391.
- Lopez de Alda, ML and Barcelo, D. Use of solid-phase extraction in various of its modalities for sample preparation in the determination of estrogens and progestogens in sediment and water. *J. Chromatogr. A* 938: 145–53 (2001)
- López de Alda MJ, BarcelóD. Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in wastewaters. *Fresenius J. Anal. Chem.* 2001; 371: 437.
- López de Alda MJ, Gil A, Paz E, Barcelo D. Occurrence and analysis of estrogens and progestogens in river sediments by liquid chromatography–electrospray-mass spectrometry. *Analyst* 2002;127(10):1299–304.
- López de Alda MJ, Gil A, Paz E, BarcelóD. Determination of estrogens and progestogens in river sediments by liquid chromatography/mass spectrometry. *Analyst* 2002; 127: 1279.
- López de Alda MJ, Díaz-Cruz S, Petrovic M, BarcelóD. A review. Liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. *J. Chromatogr. A* (2003).1000: 503–26.
- López-Roldán R, de Alda ML, Gros M, Petrovic M, Martín-Alonso J, Barceló D. Advanced monitoring of pharmaceuticals and estrogens in the Llobregat River basin (Spain) by liquid chromatography–triple quadrupole-tandem mass spectrometry in combination with ultra-performance liquid chromatography–time of flight-mass spectrometry. *Chemosphere* 2010; 80:1337–44.
- Loyo-Rosales, J.E., Rosales-Rivera, G.C., Lynch, A.M., Rice, C.P., Torrents, A. Migration of nonylphenol from plastic containers to water and a milk surrogate, *J Agric Food Chem* (2004) 52, 2016-2020.
- Loyo-Rosales, J.E., Schmitz-Afonso, I., Rice, C.P., Torrents, A. *Analysis of octyl- and nonylphenol and their ethoxylates in water and sediments by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*, *Anal Chem* (2003) 75, 4811-4817.
- Loyo-Rosales, J.E., Rice, C.P., Torrents, A., 2007. Fate of octyl- and nonylphenol ethoxylates and some carboxylated derivatives in three American wastewater treatment plants. *Environ. Sci. Technol.* 41, 6815–6821.

- Lu, C., Chen, X., & Liu, H. (2009). Determination of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates in textiles by normal-phase high performance liquid chromatography and solid-phase extraction. *Se pu_Chinese Journal of Chromatography/Zhongguo hua xue hui*, 27(4), 458_462.
- Lu, J.; Wu, J.; Stoffella, P. J.; Wilson, P. C. Isotope Dilution-Gas Chromatography/Mass Spectrometry Method for the Analysis of Alkylphenols, Bisphenol A, and Estrogens in Food Crops. *J. Chro-matogr. A* 2012, 1258, 128–135
- Lu Z, Gan J (2014) Isomer-specific biodegradation of nonylphenol in river sediments and structure-biodegradability relationship. *Environ Sci Technol* 48:1008–1014
- Luo Y, Guo W, Ngo HH, Nghiem LD, Hai FI, Zhang J, Liang S, Wang XC (2014) A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Sci Total Environ* 473–474:619–641
- Maggioni S, Balaguer P, Chiozzotto C, Benfenati E (2013) Screening of endocrine-disrupting phenols, herbicides, steroid estrogens, and estrogenicity in drinking water from the waterworks of 35 Italian cities and from PET-bottled mineral water. *Environ Sci Pollut Res* 20:1649–1660
- Maia, R. 1999. Portuguese-Spanish River Basin. Bilateral agreements. Evolution and Context. *Water Science and Technology*. V. 42, Nº 1-2, 2000.
- Maia, R. The EU Water Framework Directive Implementation in the Iberian Context.
- Malinowski, E.D. Factor Analysis in Chemistry. John Willey & Sons. New York, 2002.
- Mart'ianov, A. A., Zherdev, A. V., Eremin, S. A., & Dzantiev, B. B. (2004). Preparation of antibodies and development of enzyme-linked immunosorbent assay for nonylphenol. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 84(13), 965_978.
- Mart'ianov, A. A., Dzantiev, B. B., Zherdev, A. V., Eremin, S. A (2005). Immunoenzyme assay of nonylphenol: The study of selectivity and the detection of non-ionic surfactants in water samples. *Talanta*. Vol. 65 (2005) 367-374.
- Martín-Alonso, J., 2005. Managing resources in an European semi-arid environment: combined use of surface and groundwater for drinking water production in the Barcelona metropolitan area.
- Martinez E, Llobet I, Lacorte S, Viana P, Barcelo D. 2002. Patterns and levels of halogenated volatile compounds in Portuguese surface waters. *J Environ Monit* 4:253–257.
- Martínez, E., Gans, O., Weber, H., Scharf, S. Analysis of nonylphenol polyethoxylates and their metabolites in water samples by high-performance liquid chromatography with electrospray mass spectrometry detection, *Water Sci Technol* (2004) 50, 157163.
- Mas, S., Juan, A.d., Tauler, R., Olivieri, A.C., Escandar, G.M. Application of chemometric methods to environmental analysis of organic pollutants: A review. *Talanta* 80 (2010) 1052–1067
- Massart, D.L., B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. de Jong, P.J. Lewi and J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*, Elsevier Science, Amsterdam, Holland, 1998.
- Matsui, K., Kawaji, I., Utsumi, Y., Ukita, Y., Asano, T., Takeo, M., Negoro, S. (2007). Enzyme-linked immunosorbent assay for nonylphenol using antibody-bound microfluid filters in vertical fluidic operation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(4), 347_350.
- Mauricio, R.; Diniz, M., Petrovic, M., Amaral, L., Peres, I., Barceló, D., Santana, F. A characterization of selected endocrine disruptor compounds in Portuguese WasteWater Treatment Plant. *Environmental Monitoring and Assessment* (2006) 118: 75– 87
- Meucci, V., & Arukwe, A. (2005). Detection of vitellogenin and zona radiata protein expressions in surface mucus of immature juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to waterborne nonylphenol. *Aquatic Toxicology* (Amsterdam, Netherlands), 73(1), 1_10.
- Meulenbergh, E. P. (2009). Phenolics: Occurrence and immunochemical detection in environment and food. *Molecules* (Basel, Switzerland), 14(1), 439_473.
- Michałowicz J (2014) Bisphenol A—sources, toxicity and biotransformation. *Env Toxic Pharma* 37:738–758
- Micić, V., & Hofmann, T. (2009). Occurrence and behaviour of selected hydrophobic alkylphenolic compounds in the Danube River. *Environmental Pollution*, 157(10), 2759– 2768. doi:10.1016/j.envpol.2009.04.028.

- Mills, L. J., & Chichester, C. (2005). Review of evidence: are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Science of The Total Environment*, 343(1–3), 1–34. doi:10.1016/j.scitotenv.2004.12.070.
- Morales, T. V.; Sosa-Ferrera, Z.; Santana-Rodríguez, J. J. Development and Optimisation of an On-line Solid Phase Extraction Coupled to Ultra-High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Methodology for the Simultaneous Determination of Endocrine Disrupting Compounds in Wastewater Samples. *J. Chromatogr. A* 2012, 1230, 66–76.
- Mueller, G.C., Kim, U.H. Displacement of estradiol from estrogen receptors by simple alkylphenols, *Endocrin* (1978) 102, 14291435.
- Murk AJ, Legler J, van Lipzig MMH, Meerman JHN, Belfroid AC, Spenkeliink A, et al. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three *in vitro* bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2002;21(1):16–23.
- Muz, M.; Son`omez, M. S.; Komesli, O. T.; Bakirdere, S.; G`okçay, C. F. Determination of Selected Natural Hormones and Endocrine Disrupting Compounds in Domestic Wastewater Treatment Plants by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry after Solid Phase Extraction. *Analyst*. 2012, 137, 884–889.
- Nakamura, S., Sian, T.H., and Daishima. S.J., 2001. Determination of estrogens in river water by gas chromatography–negative-ion chemical-ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 919: 275–82.
- Navarro-Ortega, A., Tauler, R., Lacorte, S., Barceló, D. Occurrence and transport of PAHs, pesticides and alkylphenols in sediment samples along the Ebro River Basin, *J Hydrol* (2010) 383, 5.
- Naylor CG, Mieure JP, Morici I, Romano RR. Alkylphenol ethoxylates in the environment. Proceedings of the 3rd CESIO International Surfactants Congress, Section E, F and LCA Seminar, London; 1992. p. 111–24.
- Net S, Sempéré R, Delmont A, Paluselli A, Ouddane B (2015) Occurrence, fate, behavior and ecotoxicological state of phthalates in different environmental matrices. *Environmental Science & Technology* 49(7):4019–4035
- Newbold RR, Jefferson WN, Padilla-Banks E, Haseman J (2004). Developmental exposure to diethylstilbestrol (DES) alters uterine response to estrogens in prepubescent mice: low versus high dose effects. *Reproductive Toxicology* 18(3): 399-406.
- Newbold RR, Padilla-Banks E, Jefferson WN (2006). Adverse effects of the model environmental estrogen diethylstilbestrol are transmitted to subsequent generations. *Endocrinology*, 147(6 Suppl):S11-17.
- Newbold RR (2010). Impact of environmental endocrine disrupting chemicals on the development of obesity. *Hormones (Athens)*, 9(3):206-217.
- Noguerol T, Boronat S, Jarque S, Barceló D, Piña B. Detection of hormone receptor ligands in yeast by fluorogenic methods. *Talanta* (2006); 69:351–8.
- Olea Serrano, N., Fernández Cabrera, M.F., Martín Olmgeio, P. Disruptores endocrinos. El caso particular de los xenobióticos estrogénicos II. Estrogénicos sintéticos, *Salud Ambiental* (2001) 1, 64-72.
- Orden Pre/1954/2004, de 22 de junio, por la que se modifica el Anexo I del Real Decreto 1406/1989. Nonilfenol, nonilfenol etoxilados y cemento.
- Palmer, P.M., Wilson, L.R. , O’Keefe, P., Sheridan, R., King, T., and Chen, C.-Y. (2008). Sources of pharmaceutical pollution in the New York City Watershed. *Sci. Total Environ.* 394: 90–102.
- Patrolecco L, Capri S, De Angelis S, Pagnotta R, Polesello S, Valsecchi S (2006) Partition of nonylphenol and related compounds among different aquatic compartments in Timber River (Central Italy). *Water Air Soil Poll* 172:151–166
- Pawlowski S, Ternes T, Bonerz M, Kluczka T, van der Burg B, Nau H, et al. Combined *in situ* and *in vitro* assessment of the estrogenic activity of sewage and surface water samples. *Toxicological Sciences* 2003;75(1):57–65.
- Pawlowski S, Ternes TA, Bonerz M, Rastall AC, Erdinger L, Braunbeck T. Estrogenicity of solid phase-extracted water samples from two municipal sewage treatment plant effluents and river Rhine water using the yeast estrogen screen. *Toxicol In Vitro* 2004;18(1):129–38.
- Penga, X., Yua, Y., Tanga, C., Tan. J., Huang, Q., and Wang, Z. 2008. Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China. *Sci. Total Environ.* 397: 158–166.

- Peré-Trepát, E., Hildebrandt, A., Barceló, D., Lacorte, S., Tauler, R. Fast chromatography of complex biocide mixtures using diode array detection and multivariate curve resolution. *Chemometrics and intelligent Laboratory systems*, 74 (2004) 293-303
- Peré-Trepát, E., Petrovic, M., Barceló, D., Tauler, R. Application of chemometric methods to the investigation of main microcontaminant sources of endocrine disruptors in coastal and harbour waters and sediments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378 (2004) 642-654.
- Perez-Palacios, D.; Fernandez-Recio, M. A.; Moreta, C.; Tena, M. T. Determination of Bisphenol-Type Endocrine Disrupting Compounds in Food-Contact Recycled-Paper Materials by Focused Ultrasonic Solid-Liquid Extraction and Ultra Performance Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry. *Talanta*. 2012, 99, 167-174.
- Petrovic, M., Barceló, D., 2000. The stability of non-ionic surfactants and linear alkylbenzene sulfonates in a water matrix and on solid-phase extraction cartridges. *Fresenius J. Anal. Chem.* 368, 676-683.
- Petrovic, M., Eljarrat, E., López de Alda, M.J., Barceló, D. Analysis and environmental levels of endocrine-disrupting compounds in freshwater sediments, *TrAC-Trends Anal Chem* (2001) 20, 637-648.
- Petrovic M, Barcelo D. 2001. Analysis of ethoxylated nonionic surfactants and their metabolites by liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 36:1173-1185.
- Petrovic M, Diaz A, Ventura F, Barcelo D. 2001. Simultaneous determination of halogenated derivatives of alkylphenol ethoxylates and their metabolites in sludges, river sediments, and surface, drinking, and
- Petrovic M, Eljarrat E, Lopez de Alda MJ, Barcelo, D. 2002a. Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples. *J Chromatogr A* 974:23-51.
- Petrovic M, Lacorte S, Viana P, Barcelo D. 2002b. Pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of alkylphenolic compounds in river sediment. *J Chromatogr A* 959:15-23.
- Petrovic M, Tavazzi S, Barcelo D. 2002c. Column-switching system with restricted access pre-column packing for an integrated sample cleanup and liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of alkylphenolic compounds and steroid sex hormones in sediment. *J Chromatogr A* 971:37-45.
- Petrovic, M., Rodríguez Fernández-Alba, A., Borrull, F., Marce, R., González Mazo, E., Barceló, D., 2002b. Occurrence and distribution of nonionic surfactants, their degradation products, and linear alkylbenzene sulfonates in coastal waters and sediments in Spain. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 37-46.
- Petrovic, M., Sole, M., de Alda, M.J.L., Barcelo, D. Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: Integration of chemical analysis and biological effects on feral carp, *Environ. Toxicol. Chem.* (2002c) 21, 2146-2156.
- Petrovic M, Barcelo D, Diaz A, Ventura F. 2003a. Low nanogram per liter determination of halogenated nonylphenols, nonylphenol carboxylates, and their non-halogenated precursors in water and sludge by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 14:516-527.
- Petrovic M, Diaz A, Ventura F, Barcelo D. 2003b. Occurrence and removal of estrogenic short-chain ethoxy nonylphenolic compounds and their halogenated derivatives during drinking water production. *Environ Sci Technol* 37:4442-4448.
- Petrovic M, Schroeder HF, Barcelo D. 2003c. Atmospheric pressure ionization mass spectrometry-III. Non-ionic surfactants liquid chromatographic mass spectrometry and LC-MS-MS of alkylphenol ethoxylates and their degradation products. *Compr Anal Chem* 40:163-189.
- Petrovic, M., Barceló, D., Díaz, A., Ventura, F. Low nanogram per liter determination of halogenated nonylphenols, nonylphenol carboxylates, and their non-halogenated precursors in water and sludge by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry, *J Amer Soc Mass Spectrom* (2003) 14, 516.
- Petrovic, M., Ginebreda, A., Acuña, V., Batalla, R.J., Elosegui, A., Guasch, H., López de Alda, M., Marcé, R, Muñoz, I., Navarro-Ortega, A., Navarro, E., Vericat, S., Sabater, S., Barceló, D. Combined scenarios of chemical and ecological quality under water scarcity in Mediterranean rivers. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry* (2011) 30 (8), 1269-1278
- Platikanov, S., Puig, X., Martin, J., Tauler, R. (2007). Chemometric modelling and prediction of trihalomethane formation in Barcelona's water works plant. *Water Research* 41, 3394-3406.
- Plotan, M., Elliott, C.T., Frizzell, C., Connolly, L. Estrogenic endocrine disruptors present in sports supplements. A risk assessment for human health, *Food Chem* (2014) 159, 157-165.

- Pojana, G., Gomiero, A., Jonkers, N., & Marcomini, A. (2007). Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. *Environment International*, 33(7), 929–936. doi:10.1016/j.envint.2007.05.003.
- Pojana, G., Gomiero, A., Jonkers, N., Marcomini, A. Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon, *Environ Int* (2007) 33, 929.
- Porcel, M. (2001). Memoria de Tesis Doctoral: Aplicación de técnicas quimiométricas para el desarrollo de nuevos métodos cinético-espectrofotométricos de análisis.
- Porter, A.J., Hayden, N.J., 2003. Nonylphenol in the environment: A critical review. University of Vermont: Department of Civil and Environmental Engineering.
- Preuss, T.G., Gehrhardt, J., Shirmer, K., Coors, A., Rubach, M., Russ, A., Jones, P.D., Giesy, J.P., Ratte, H.T., 2006. Nonylphenol isomers differ in estrogenic activity. *Environ. Sci. Technol.* 40, 5147–5153.
- Postigo, C.; Kuster, M.; Villagrasa, M.; Rodríguez-Mozaz, S.; Brix, R.; Farré, M.; de Alda, M. L.; Barceló, D. Liquid Chromatography— Mass Spectrometry Methods for Analysis of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wastewaters. In *Biosensors for the Environmental Monitoring of Aquatic Systems: Bioanalytical and Chemical Methods for Endocrine Disruptors*; Barceló, D.; Hansen, P. D., Eds.; Springer: New York, 2009; pp 227–271.
- Priac, A., Morin/Crini, N., Druart, C., Gavaille, S., Bradu, C., Lagarrigue, C., Torri, G., Winterton, P., Crini, G. (2017). Alkylphenol and alkylphenol polyethoxylates in water and wastewater: A review of options for their elimination. *Arabian Journal of Chemistry*. V. 10. 3749-3773.
- Prieto, A., Schrader, S., Moeder, M. Determination of organic priority pollutants and emerging compounds in wastewater and snow samples using multiresidue protocols on the basis of microextraction by packed sorbents coupled to large volume injection gas chromatography-mass spectrometry analysis., *J Chromatogr A* (2010) 1217, 6002-6011.
- Prieto, A.; Vallejo, A.; Zuloaga, O.; Paschke, A.; Sellergen, B.; Schillinger, E.; Schrader, S.; Moeder, M. Selective Determination of Estrogenic Compounds in Water by Microextraction by Packed Sorbents and a Molecularly Imprinted Polymer Coupled with Large Volume Injection-in-Port-Derivatization Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2011, 703, 41–51
- Prieto, A., Rodil, R., Olivares, M., Fernandez, L.-A., Zuloaga, O. Membrane-assisted solvent extraction coupled to large volume injection-gas chromatography-mass spectrometry for the determination of a variety of endocrine disrupting compounds in environmental water samples, *Anal Bioanal Chem* (2012) 402, 2897-2907.
- Psillakis E, Kalogerakis N (2003) Hollow-fibre liquid-phase microextraction of phthalate esters from water. *J Chromatogr A* 999(1):145–153
- Purdum, C.E., Hardiman, P.A., Bye, V.J., Eno, N.C., Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.* 8, 275–285.
- Puy-Azurmendi, E., Olivares, A., Vallejo, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Piña, B., Zuloaga, O., Cajaraville, M.P.. Estrogenic effects of nonylphenol and octylphenol isomers in vitro by recombinant yeast assay (RYA) and in vivo with early life stages of zebrafish. *Science of the Total Environment* 466–467 (2014) 1–10
- Quintana, J.B., Rodil, R., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D. Multiresidue analysis of acidic and polar organic contaminants in water samples by stir-bar sorptive extraction-liquid desorption-gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr A* (2007) 1174, 27-39.
- Quirós, L., Céspedes, R., Lacorte, S, Viana, P., Barceló, D Piña, B.D Detection and Evaluation of Endocrine Disruption Activity in Water Samples from Portugal Rivers. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 24 (2005) 389-395.
- Racz, L. A., Goel, R.K.(2010) Fate and removal of estrogens in municipal wastewater. *J. Environ. Monit.*, 12, 58–70
- Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y al uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos. BOE, nº 178.
- Real Decreto 1802/2008, de 3 de noviembre, por el que se modifica el Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, aprobado por el Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo, con la finalidad de adaptar disposiciones al Reglamento 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo (Reglamento REACH). BOE, nº 266.
- Real Decreto 60/2011, de 21 de enero, sobre las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas. BOE, nº 19.

Real Decreto 866/2008, de 23 de mayo, por el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo. BOE, nº 131.

Real Decreto 874/2011, de 17 de junio, por el que se establece la lista positiva de sustancias permitidas para la fabricación de materiales poliméricos destinados a entrar en contacto con los alimentos. BOE, nº 164.

Reddy S, Brownawell BJ. Analysis of estrogens in sediment from a sewage-impacted urban estuary using high-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2005;24(5):1041–7.

Reemtsma, T. The use of liquid chromatography-atmospheric pressure ionization- mass spectrometry in water analysis Part II: Obstacles. *Trends Anal. Chem.* **20**: 533–42 (2001).

Reglamento (CE) Nº1097/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 18 de diciembre de 2006 relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH)

Reglamento 10/2011 de la Comisión de 14 de enero de 2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. DOUE, L 12/1.

Reglamento de Ejecución (UE) Nº 321/2011 de la Comisión de 1 de abril de 2011 que modifica el Reglamento (UE) nº 10/2011 por lo que respecta a la restricción del uso del bisfenol A en biberones de plástico para lactantes. DOUE, L 87/1.

Rezaee, M., Assadi, Y., Hosseini, M.-R., Aghaee, E., Ahmadi, F., Berijani, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *J Chromatogr A* (2006) 1116, 1-9.

Rezaee, M., Yamini, Y., Shariati, S., Esrafil, A., Shamsipur, M. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography-UV detection as a very simple, rapid and sensitive method for the determination of bisphenol A in water samples, *J Chromatogr A* (2009) 1216, 1511-1514.

Ribeiro, C., Pardal, M. A., Martinho, F., Margalho, R., Tiritan, M. E., Rocha, E., et al. (2009). Distribution of endocrine disruptors in the Mondego River estuary, Portugal. *Environmental Monitoring and Assessment*, 149 (1–4), 183–193.

Ribeiro, C., Pardal, M., Tiritan, M. E., Rocha, E., Margalho, R., & Rocha, M. J. (2009). Spatial distribution and quantification of endocrine-disrupting chemicals in Sado River estuary, Portugal. *Environmental Monitoring and Assessment*, 159(1–4), 415–427. doi:10.1007/s10661-008-0639-1.

Ribeiro, C., Tiritan, M.E., Rocha, E., Rocha, M.J. (2009). Seasonal and Spatial Distribution of Several Endocrine-Disrupting Compounds in the Douro River Estuary, Portugal. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56: 1-11.

Ribeiro, A.R., Nunes, O.C., Pereira, M.F.R., Silva, A.M.T., 2015 Feb. An overview on the advanced oxidation processes applied for the treatment of water pollutants defined in the recently launched Directive 2013/39/EU. *Environ. Int.* 75, 33–51.

Rice, C., Schmitz-Afonso, I., Loyo-Rosales, J., Link, E., Thoma, R., Fay, L., Altfater, D., Camp, M.J. Alkylphenol and alkylphenol-ethoxylates in Carp, Water, and Sediment from the Cuyahoga River, Ohio, *Environ Sci Technol* (2003) 37, 3747-3754.

Richiardi Letal. (2004). Testicular cancer incidence in eight northern European countries: secular and recent trends. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 13(12):2157–2166.

Richter, P., Leiva, C., Choque, C., Giordano, A., Sepulveda, B. Rotating-disk sorptive extraction of nonylphenol from water samples, *J Chromatogr A* (2009) 1216, 8598-8602.

Rocha, M. J., & Rocha, E. (2015). Estrogenic compounds in estuarine and coastal water environments of the Iberian western atlantic coast and selected locations worldwide — relevancy, trends and challenges in view of the EU water framework directive (*Toxicology Studies - Cells, Drugs and Environment*).

Rocha, M. J., Cruzeiro, C., & Rocha, E. (2013a). Development and validation of a GC-MS method for the evaluation of seventeen endocrine disruptor compounds, including phytoestrogens and sitosterol, in coastal waters - their spatial and seasonal levels in Porto coastal region (Portugal). *Journal of Water & Health*, 11, 281–296.

Rocha, M. J., Cruzeiro, C., & Rocha, E. (2013d). Quantification of seventeen endocrine disruptor compounds and their spatial and seasonal distribution in the Iberian Ave River and its coastline. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 95, 386–399.

Rocha, M. J., Cruzeiro, C., Peixoto, C., Rocha, E. (2014). Annual fluctuations of endocrine disrupting compounds at a lower end of the Lima River, Portugal and in adjacent coastal waters. *Arch Environ Contam Toxicol*, 67: 389-401.

- Rocha, M. J., Cruzeiro, C., Reis, M., Pardal, M. A., & Rocha, E. (2014). Spatial and seasonal distribution of seventeen endocrine disruptor compounds in an urban estuary (Mondego River, Portugal): evaluation of the estrogenic load of the area. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186, 3337–3350.
- Rocha, M. J., Cruzeiro, C., Reis, M., Pardal, M. A., & Rocha, E. (2015). Toxicological relevance of endocrine disruptors in the Tagus River estuary (Lisbon, Portugal). *Environ Monit Assess* 187:483.
- Rocha, M. J., Cruzeiro, C., Reis, M., Pardal, M.A. & Rocha, E. (2016). Pollution by endocrine disruptors in a southwest European temperate coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal). *Environmental Monitoring Assessment* (2016) 188: 101
- Rocha, M. J., Cruzeiro, C., Reis, M., Rocha, E., & Pardal, M. (2013c). Determination of seventeen endocrine disruptor compounds and their spatial and seasonal distribution in Ria Formosa Lagoon (Portugal). *Environmental Monitoring and Assessment*, 185, 8215–8226.
- Rocha, M. J., Cruzeiro, C., Reis, M., Rocha, E., & Pardal, M. A. (2013b 2013a). Determination of seventeen endocrine disruptor compounds and their spatial and seasonal distribution in the Sado River estuary (Portugal). *Toxicological & Environmental Chemistry*, 95, 237–253
- Rocha, M. J., Ribeiro, M., Ribeiro, C., Couto, C., Cruzeiro, C., & Rocha, E. (2012). Endocrine disruptors in the Leça River and nearby Porto Coast (NW Portugal): presence of estrogenic compounds and hypoxic conditions. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 94, 262–274.
- Rocha, M.J., Cruzeiro, C., Ferreira, C., Rocha, E. Occurrence of endocrine disruptor compounds in the estuary of the Iberian Douro River and nearby Porto Coast (NW Portugal), *Toxicol Environ Chem* (2012) 94, 252-261.
- Rocha, M.J., Cruzeiro, C., Reis, M., Pardal, M.A., Rocha, E. Spatial and seasonal distribution of 17 endocrine disruptor compounds in an urban estuary (Mondego River, Portugal): evaluation of the estrogenic load of the area, *Environ. Monit. Assess.* (2014) 186, 3337-3350.
- Rocha, S., Domingues, V.F., Pinho, V., Fernandes, V.C., Delerue-Matos, C., Gameiro, P., Mansilha, C. (2013). Occurrence of Bisphenol A, Estrone, 17 β -Estradiol and 17 α Ethinylestradiol in Portuguese Rivers. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 90: 73-78.
- Rodgers-Gray TP, Jobling S, Kelly C, Morris S, Brighty G, Waldock MJ, et al. Exposure of juvenile roach (*Rutilus rutilus*) to treated sewage effluent induces dose-dependent and persistent disruption in gonadal duct development. *Environmental Science & Technology* 2001;35(3):462–70.
- Rodil, R., Benito Quintana, J., Concha-Graña, E., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D. Emerging pollutants in sewage, surface and drinking water in Galicia (NW Spain), *Chemosphere* (2012) 86, 1040-1049.
- Rodriguez-Mozaz, S., Lopez De Alda, M.J., Barcelo, D., 2004a. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol a in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1045, 85-92.
- Rodriguez-Mozaz, S., Lopez De Alda, M.J., Barcelo, D., 2004b. Picogram per liter level determination of estrogens in natural waters and waterworks by a fully auto-mated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry method. *Analytical Chemistry* 76, 6998-7006.
- Rolland et al. (2012). Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26 609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. *Journal of human reproduction*. Dec 4. [Epub ahead of print].
- Rosas Rodríguez, H., Estudio por contaminación de metales pesados en la cuenca de la cuenca del Llobregat. Tesis doctoral, 2001.
- Rose J, Holbech H, Lindholm C, Norum U, Povlsen A, Korsgaard B, Bjerregaard P. Vitellogenin induction by 17 α -estradiol and 17 α -ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio Rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 2002; 131: 531.
- Routledge EJ, Sumpter JP. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry* 1996;15(3):241–8.
- Routledge EJ, Sumpter JP. Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *J Biol Chem* 1997;272:3280–8.

Routledge, E.J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G.C., Waldock, M., Sumpter, J.P., 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1559–1565.

Rubirola, A., Boleda, M.R., Galcerán, M.T. Multiresidue analysis of 24 Water Framework Directive priority substances by on-line solid phase extraction liquid chromatography tandem mass spectrometry in environmental waters. *Journal of Chromatography A*. 1493 (2017) 64-75.

Rudel, R.A., Camann, D.E., Spengler, J.D., Korn, L.R., Brody, J.G. Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust, *Environ Sci Technol* (2003) 37, 4543-4553.

Russo, M. V.; Notardonato, I.; Cinelli, G.; Avino, P. Evaluation of an Analytical Method for Determining Phthalate Esters in Wine Samples by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography Coupled with Ion-Trap Mass Spectrometer Detector. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, 402, 1373–1381.

Rutishauser BV, Pesonen M, Escher BI, Ackermann GE, Aerni HR, Suter MJF, et al. Comparative analysis of estrogenic activity in sewage treatment plant effluents involving three *in vitro* assays and chemical analysis of steroids. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2004;23(4):857–64.

Sabatini, L., Barbieri, A., Violante, F.S. Development and validation of a capillary high-performance liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometric method for the quantification of bisphenol A in air samples, *Rapid Commun Mass Sp* (2005) 19, 3468-3472.

Sabik, H., Gagne, F., Blaise, C., Marcogliese, D. J., & Jeannot, R. (2003). Occurrence of alkylphenol polyethoxylates in the St. Lawrence River and their bioconcentration by mussels (*Elliptio complanata*). *Chemosphere*, 51(5), 349_356.

Safe, S. H. (2000). Endocrine disruptors and human health—is there a problem? An update. *Environmental Health Perspectives*, 108(6), 487–493.

Saito, I., Onuki, A., Seto, H. Indoor air pollution by alkylphenols in Tokyo, *Indoor Air* (2004) 14, 325-

Salau, J.S., Tauler, R., Bayona, J.M., Tolosa, I. Input Characterization of Sedimentary Organic Contaminants and Molecular Markers in the Northwestern Mediterranean Sea by Exploratory Data Analysis. *Environ. Sci. Technol.*, 1997, 31 (12), pp 3482– 3490

Salgueiro-González, N., Concha-Graña, E., Turnes-Carou, I., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D. Determination of alkylphenols and bisphenol A in seawater samples by dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry for compliance with Environmental Quality Standards (Directive 2008/105/EC), *J Chromatogr A* (2012) 1223, 1-8.

Salgueiro-González, N., López de Alda, M., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D., Barceló, D. Determination of 13 estrogenic endocrine disrupting compounds in atmospheric particulate matter by pressurised liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem* (2013) 405, 8913-8923.

Salgueiro-González, N., Turnes-Carou, I., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D. Membrane assisted solvent extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry applied to the analysis of alkylphenols in water samples, *J Chromatogr A* (2013) 1281, 46-53.

Salgueiro-González, N., Turnes-Carou, I., Muniategui-Lorenzo, S., Lopez-Mahia, P., Prada-Rodríguez, D. Fast and selective pressurized liquid extraction with simultaneous in cell clean up for the analysis of alkylphenols and bisphenol A in bivalve molluscs, *J Chromatogr A* (2012) 1270, 80-87.

Salgueiro-González, N.; Concha-Grana, E.; Turnes-Carou, I.; Muniategui-Lorenzo, S.; López-Mahía, P.; Prada-Rodríguez, D. Determination of Alkylphenols and Bisphenol A in Seawater Samples by Dispersive Liquid–Liquid Microextraction and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry for Compliance with Environmental Quality Standards (Directive 2008/105/EC). *J. Chromatogr. A* 2012, 1223, 1–8.

Samsonova, J. V., Rubtsova, M. Y., & Franek, M. (2003). Determination of 4-n-nonylphenol in water by enzyme immunoassay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 375(8), 1017_1019.

Samsonova, J. V., Uskova, N. A., Andresyuk, A. N., Franek, M., & Elliott, C. T. (2004). Biacore biosensor immunoassay for 4-nonylphenols: Assay optimization and applicability for shellfish analysis. *Chemosphere*, 57(8), 975_985.

- Sánchez-Avila, J., Fernandez-Sanjuan, M., Vicente, J., Lacorte, S. Development of a multi-residue method for the determination of organic micropollutants in water, sediment and mussels using gas chromatography-tandem mass spectrometry, *J Chromatogr A* (2011) 1218, 6799.
- Schmitt M, Gellert G, Lichtenberg-Frate H. The toxic potential of an industrial effluent determined with the *Saccharomyces cerevisiae*-based assay. *Water Res* 2005;39 (14):3211–8.
- Schmitt, S.; Reifferscheid, G.; Claus, E.; Schlüsener, M.; Buchinger, S. Effect Directed Analysis and Mixture Effects of Estrogenic Com-pounds in a Sediment of the River Elbe. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2012, 19, 3350–3361.
- Schneider JC, Guarente L. Vectors for expression of cloned genes in yeast: regulation, overproduction, and underproduction. *Methods Enzymol* 1991; 194:373–88.
- Scrimshaw MD, Lester JN. Fate and behaviour of endocrine disrupters in sludge treatment and disposal. In: Brikett JW, Lester JN, editors. *Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes*. Boca Raton, USA: CRC Press Inc.; 2002.
- Seifert M, Brenner-Weiß G, Haindl S, Nusser M, Obst U, Hock B. A new concept for the bioeffects-related analysis of xenoestrogens: hyphenation of receptor assays with LC-MS. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1999; 363: 767.
- Serôdio P, Nogueira JMF (2006) Considerations on ultra-trace analysis of phthalates in drinking water. *Water Res* 40:2572–2582. doi:10.1016/j.watres.2006.05.002
- Servos, M.R., 1999. Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Water Qual. Res. J. Can.* 34, 123–177.
- Servos MR, Maguire RJ, Bennie DT, Lee HB, Cureton PM, Davidson N, et al. An ecological risk assessment of nonylphenol and its ethoxylates in the aquatic environment. *Hum Ecol Risk Assess* 2003;9:569–87.
- Servos MR, Bennie DT, Burnison BK, Jurkovic A, McInnis R, Neheli T, et al. Distribution of estrogens, 17 β -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. *Science Total Environ* 2005; 336:155–70.
- Shao, B., Hu, J., Yang, M., An, W., Tao, S., 2005. Nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in river water, drinking water, and fish tissues in the area of Chongqing, China. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 467–473.
- Shao, B., Han, H., Li, D.M., Ma, Y., Tu, X.M., Wu, Y.G. Analysis of alkylphenol and bisphenol A in meat by accelerated solvent extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *Food Chem* (2007) 105, 1236-1241.
- Shang DY, Macdonald RW, Ikononou MG. Persistence of nonylphenol ethoxylate surfactants and their primary degradation products in sediments from near a municipal outfall in the strait of Georgia, British Columbia, Canada. *Environ Sci Technol* 1999;33:1366–72.
- Sharma, V.K., Anquandh, G.A.K., Yngard, R.A., Kim, H., Fekete, J., Bouzek, K., Ray, A., Golovko, D., 2009. Nonylphenol, octylphenol, and bisphenol A, in the aquatic environment: a review on occurrence, fate, and treatment. *J. Environ. Sci. Health, Part A* 44, 423–442.
- Silva E, Rajapakse N, Kortenkamp A (2002). Something from “nothing” - Eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environmental Science and Technology*, 36(8):1751-1756.
- Simeonova, P., Simeonov, V., 2006. Chemometrics to evaluate the quality of water sources for human consumption. *Microchimica Acta* 156 (3-4), 315-320.
- Singh, B.; Kumar, A.; Kumar Malik, A. Recent Advances in Sample Preparation Methods for Analysis of Endocrine Disruptors from Various Matrices. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2014, 44:255–269.
- Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos (2015). <http://snirh.apambiente.pt/>
- Smilde, A.K., Three-way analysis. *Problems and projects, Chemom Intell Lab Syst*, 15, 143-157, 1992.
- Smith KR, Corvalán CF, Kjellström T. 1999. How much global ill health is attributable to environmental factors? *Epidemiology* 10:573–584.
- Šnuderl, K., Simonič, M., Mocak, J., Brodnjak-Voncina, D. Multivariate data analysis of natural mineral waters. *Acta Chimica*. 2007. Vol. 54, nº1, pp. 33-39

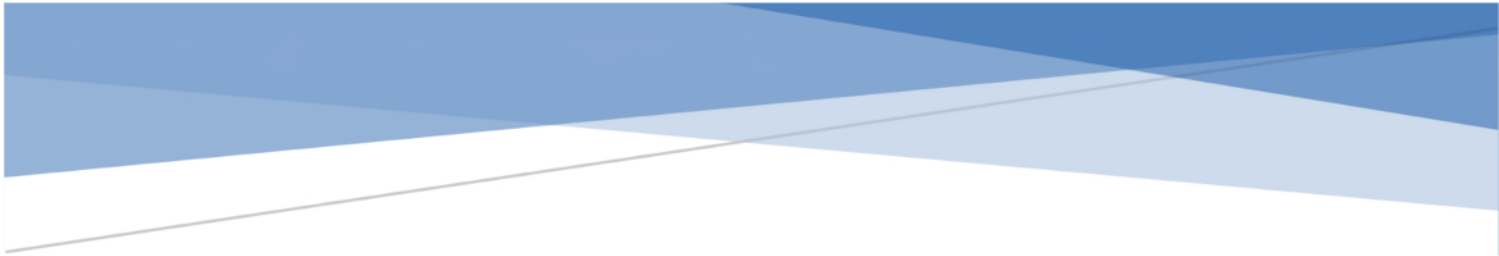
- Snyder, S.A., Keith, T.L., Naylor, C.G., Staples, C.A., Giesy, J.P. Identification and quantitation method for nonylphenol and lower oligomer nonylphenol ethoxylates in fish tissues, *Environ. Toxicol. Chem.* (2001) 20, 1870-1873.
- Snyder, S.A., Wert, E.C., Rexing, D.J., Zegers, R.E., Drury, D.D., 2006. Ozone oxidation of endocrine disruptors and pharmaceuticals in surface water and wastewater. *Ozone: Sci. Eng.* 28, 445-460.
- Soares, A., Murto, M., Guieysse, B., Mattiasson, B., 2006. Biodegradation of nonylphenol in a continuous bioreactor at low temperatures and effects on the microbial population. *Environ. Biotechnol.* 69, 597-606.
- Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E., Lester, J.N., 2008. Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environ. Int.* 34, 1033-1049.
- Solé, M., López de Alda, M.J., Castillo, M., Porte, C., Ladegaard-Pedersen, K., Barceló, D., 2000. Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from the Catalanian area (NE Spain). *Environ. Sci. Technol.* 34, 5076-5083.
- Sole M, Barcelo D, Porte C. Seasonal variation of plasmatic and hepatic vitellogenin and EROD activity in carp, *Cyprinus carpio*, in relation to sewage treatment plants. *Aquat. Toxicol.* 2002;60(3-4):233-48.
- Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C. p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ Health Perspect* (1991); 92:167-73.
- Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Olea Serrano F. The E-screen assay as a tool to identify estrogens an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 1995; 103:113-22.
- Soto AM, Michaelson CL, Prechtl NV, Weill BC, Sonnenschein C. In-vitro endocrine disruptor screening. In: *Environmental Toxicology and Risk Assessment: Standardization of Biomarkers for Endocrine Disruption and Environmental Assessment*, Vol 8 (Henshel D, Harrass MC, Black MC, eds). ASTM STP 1364. West Conshohocken, PA: American Society for Testing and Materials, 1999.
- Sumpter, J.P., Jobling, S., 1995 Oct. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect.* 103 (Suppl. 7), 173-178.
- Stanford, B.D. and Weinberg, H.S. 2007. Isotope dilution for quantitation of steroid estrogens and nonylphenols by gas chromatography with tandem mass spectrometry in septic, soil, and groundwater matrices. *J. Chromatogr. A* 1176: 26-36 (2007).
- Staples, C., Dorn, P., Klecka, G., S., O.B., Harris, L. A review of the environmental fate, effects and exposures of bisphenol A, *Chemosphere* (1998) 36, 2149-2173.
- Staples C (2003) Observed concentrations in the environment. In *phthalate esters*. Springer, Berlin
- Staples CA, Guinn R, Kramarz K, Lampi M (2011) Assessing the chronic aquatic toxicity of phthalate ester plasticizers. *Hum Ecol Risk Assess* 17:1057-1076
- Takasu, T., Iles, A., & Hasebe, K. (2002). Determination of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates by reversed-phase high-performance liquid chromatography and solid phase extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372(4), 554-561.
- Tan, B.L.L., Hawker, D.W., Mueller, J.F., Tremblay, L.A., Chapman, H.F. Stir bar sorptive extraction and trace analysis of selected endocrine disruptors in water, biosolids and sludge samples by thermal desorption with gas chromatography-mass spectrometry, *Water Research* (2008) 42, 404-412.
- Tanghe, T., Devriese, G., Verstraete, W., 1999. Nonylphenol and estrogenic activity in aquatic environmental samples. *J. Environ. Qual.* 28 (2), 702.
- Tauler R, de Azevedo D, Lacorte S, Céspedes R, Viana P, Barcelo D. (2001). Organic pollutants in surface waters from Portugal using chemometric interpretation. *Environ Technol* 22:1043-1054.
- Tauler R, Lacorte S, Guillamón M, Céspedes RPV, BarcelóD. (2004). Chemometrics modeling of main contamination sources in surface waters of Portugal. *Environ Toxicol Chem* 23:565-575.
- Tauler, R., A.K. Smilde and B.R. Kowalski, Selectivity, local rank, three-way data analysis and ambiguity in multivariate curve resolution, *J Chemom*, 9:31-58, (1995).

- Tauler, R., Barceló, D., Thurman, E.M. Multivariate Correlation between Concentrations of Selected Herbicides and Derivatives in Outflows from Selected U.S. Midwestern Reservoirs. *Environ. Sci. Technol.*, 2000, 34 (16), pp 3307–3314
- Tauler, R., De Almeida-Azevedo, D., Lacorte, S., Céspedes, R., Viana, P., Barceló, D. Organic Pollutants in Surface Waters from Portugal using Chemometric Interpretation. *Environmental Technology*, Vol. 22: 1043-1054 (2001)
- Tauler, R., Lacorte, S., Guillamón, M., Céspedes, R., Viana, P., Barceló, D. Chemometric modelling of main contamination sources in surface waters of Portugal. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 23 (2004).
- Tauler, R., Lacorte, S., Guillamón, M., Céspedes, R., Viana, P., Barceló, D. Resolution of main environmental contamination sources of semivolatile organic compounds in surface waters of Portugal using chemometric compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, (2004), 565-575.
- Tauler, R., Multivariate curve resolution applied to second order data, *Chemom Intell Lab Syst*, 30, 133-146, (1995).
- Tauler, R., Viana, M., Querol, X., Alastueta, A., Flight, R.M., Wentzell, P.K. Comparison of the results obtained by four receptor modelling methods in aerosol source apportionment studies. *Atmospheric Environment*. Vol. 43, Issue 26, August 2009, Pages 3989–3997
- Tavazzi, S., Benfenati, E., Barcelo, D. Accelerated solvent extraction then liquid chromatography coupled with mass spectrometry for determination of 4-t-octyl phenol, 4-nonylphenols, and bisphenol A in fish liver, *Chromatographia* (2002) 56, 463-467.
- Ternes TA, Kreckel P, Mueller J. Behaviors and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants—II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Science Total Environ* 1999;225:91–9.
- Terrado, M., Barceló, D., Tauler, R. Quality Assessment of the Multivariate Curve Resolution
- Terrado, M.; Kuster, M.; Raldúa, D.; López de Alda, M. J.; Barceló, D.; Tauler, R. Use of chemometric and geostatistical methods to evaluate pesticide pollution in the irrigation and drainage channels of the Ebro river delta during the rice-growing season. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 387, 1479–1488.
- Thayer KA, Heindel JJ, Bucher JR, Gallo MA. 2012. Role of environmental chemicals in diabetes and obesity: a National Toxicology Program workshop review. *Environ Health Perspect* 120:779–789.
- Thiele, B., Günther, K., Schwuger, M.J., 1997 Dec 18. Alkylphenol ethoxylates: trace analysis and environmental behavior. *Chem. Rev.* 97 (8), 3247–3272.
- Thiele, B., Heinke, V., Kleist, E., Guenther, K., 2004 Jun. Contribution to the structural elucidation of 10 isomers of technical *p*-nonylphenol. *Environ. Sci. Technol.* 38 (12), 3405–3411.
- Tsuda, T., Suga, K., Kaneda, E., Ohsuga, M. Determination of 4-nonylphenol, nonylphenol monoethoxylate, nonylphenol diethoxylate and other alkylphenols in fish and shellfish by high performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J Chromatogr B* (2000) 746, 305-309.
- UNEP Global Chemicals Outlook 2012. www.unep.org/pdf/Synthesis%20Report_CBDTIE_UNEP_September5_2012.pdf
- UNEP/WHO (2012). State of the science of endocrine disrupting chemicals—2012. Geneva, Switzerland, United Nations Environment Programme/World Health Organization.
- UNEP/WHO (2013) State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals 2012. Una declaración del estado de la ciencia sobre disruptores endocrinos preparada por un grupo de expertos del PNUMA y la OMS. Editado por Åke Bergman, Jerrold J. Heindel, Susan Jobling, Karen A. Kidd y R. Thomas Zoeller
- United States Environmental Protection Agency, 2010. Nonylphenol (NP) and Nonylphenol Ethoxylates (NPEs) [RIN 2070-ZA09].
- U.S. Environmental Protection Agency. 2012. Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP). Available: <http://www.epa.gov/endo/index.htm>.
- USEPA (2010b) Nonylphenol (NP) and nonylphenol ethoxylates (NPEs) action plan. RIN 200-ZA09. Technical report. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC
- Urbatzka, R., Rocha, E., Reis, B., Cruzeiro, C., Monteiro, R. A. F., & Rocha, M. J. (2012). Effects of ethinylestradiol and of an environmentally relevant mixture of xenoestrogens on steroidogenic gene expression and specific transcription factors in zebrafish. *Environmental Pollution*, 164, 28–35. doi:10.1016/j.envpol.2012.01.018.

- US EPA. (1996). Environmental indicators of water quality in the United States (US EPA 841-R-96-02). In O. o. w. (4503F). Washington, D.C: US Government Printing Office.
- US EPA (2010). Endocrine disruptor screening program; Second list of chemicals for Tier 1 screening. Environmental Protection Agency (EPA)
- Vaccaro, E., Meucci, V., Intorre, L., Soldani, G., Di Bello, D., Longo, V., . . . Pretti, C. (2005). Effects of 17beta-estradiol, 4-nonylphenol and PCB 126 on the estrogenic activity and phase 1 and 2 biotransformation enzymes in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Toxicology* (Amsterdam, Netherlands), 75(4), 293_305.
- Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs Jr DR, Lee DH, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose-responses. *Endocr Rev.* 2012; 33:378–455.
- Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs Jr DR, Lee DH, et al. Regulatory decisions on endocrine disrupting chemicals should be based on the principles of endocrinology. *Reprod Toxicol.* 2013; 38:1–15.
- Vandenberg, L.; Schaeberle, N.; Rubin, C. M.; Sonnenschein, B. S.; Soto, C.; Frederick, A. M.; vom Saal, S.; Wade, V.; Welshons, R.; Zoeller, T. Regulatory Decisions on Endocrine Disrupting Chemicals Should Be Based on the Principles of Endocrinology. *Reprod. Toxicol.* 2013, 37, 15–23.
- Vazquez-Duhalt R, Marquez-Rocha F, Ponce E, Licea AF, Viana MT. Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. *Scientific review. Appl Ecol Environ Res* 2005;4:1–25.
- Vega Morales, T., Torres Padrón, M.E., Sosa Ferrera, Z., Santana Rodríguez, J.J. Determination of alkylphenol ethoxylates and their degradation products in liquid and solid samples, *Trac-Trend Anal Chem* (2009) 28, 1186-1200.
- Vega-Morales, T., Sosa-Ferrera, Z., & Santana-Rodríguez, J. J. (2010). Determination of alkylphenol polyethoxylates, bisphenol-A, 17alpha-ethynylestradiol and 17beta-estradiol and its metabolites in sewage samples by SPE and LC/MS/MS. *Journal of Hazardous Materials*, 183(1_3), 701_711.
- Vega-Morales, T.; Sosa-Ferrera, Z.; Santana-Rodríguez, J. J. Develop-ment and Optimisation of an On-line Solid Phase Extraction Coupled to Ultra-High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Methodology for the Simultaneous Determination of Endocrine Disrupting Compounds in Wastewater Samples. *J. Chro-matogr. A* 2012, 1230, 66–76.
- Vitali M, Ensabella F, Stella D, Guidotti M (2004) Nonylphenols in freshwaters of the hydrologic system of an Italian district: associa-tion with human activities and evaluation of human exposure. *Chemosphere* 57:1637–1647
- Vom Saal FS, Hughes C. 2005. An extensive new literature concerning low dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ Health Perspect* 113:926–933.
- Vousta D, Hartmann P, Schaffner C, Giger W (2006) Benzotriazoles, alkylphenols and bisphenol A in municipal wastewaters and in the Glatt River, Switzerland. *Environ Sci Pollut R* 13(5):333–341
- Walczak, B., and D.L. Massart, Dealing with missing data, Parts I and II. *Chemom Intell Lab Syst.*, 58, 15-27 and 29-42, (2001)..
- Wang, B., Huang, B., Jin, W., Zhao, S.M., Li, F.R., Hu, P., Pan, X.J. Occurrence, distribution, and sources of six phenolic endocrine disrupting chemicals in the 22 river estuaries around Dianchi Lake in China, *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2013) 20, 3185-3194.
- Wang L, Ying GG, Chen F, Zhang LJ, Zhao JL, Lai HJ, et al. Monitoring of selected estrogenic compounds and estrogenic activity in surface water and sediment of the Yellow River in China using combined chemical and biological tools. *Environ Pollut* 2012;165: 241–9.
- Warhust, M., An Environmental Assessment of Alkylphenol Ethoxylates and Alkylphenols. Edinburgh, Scotland: Friends of the Earth (1995).
- Watanabe H, Suzuki A, Goto M, Lubahn DB, Handa H, Iguchi T. Tissue-specific estrogenic and non-estrogenic effects of a xenoestrogen, nonylphenol. *J Mol Endocrinol* 2004;33:243–52.
- Wheeler TF, Heim JR, LaTorre MR, Janes AB. Mass spectral characterization of *p*-nonylphenol isomers using high-resolution capillary GC-MS. *J Chroma-togr Sci* 1997;35:19–30.
- White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP, Parker MG. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 1994; 135:175–82.
- WHO/IPCS. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. In: Damstra T, Barlow S, Bergman A, Kavlock R, Van der Kraak G, editors. World Health Organization (WHO/IPCS/EDC/02.2), Geneva, Switzerland; 2002.

- WHO. 2011. Toxicological and health aspects of bisphenol A. Joint FAO/WHO expert meeting to review toxicological and health aspects of bisphenol A: final report, including report of stakeholder meeting on bisphenol A, 1-5 November 2010, Ottawa, Canada. World Health Organization, Geneva, Switzerland
- WHO (World Health Organization)/UNEP (United Nations Environment Programme). 2013. The State-of-the-Science of Endocrine Disrupting Chemicals 2012 (Bergman Å, Heindel JJ, Jobling S, Kidd KA, Zoeller RT, eds). Geneva:UNEP/WHO. Available: <http://www.who.int/ceh/publications/endocrine/en/index.html>
- WHO-UNEP. State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals. In: Bergman A, Heindel JJ, Jobling S, Kidd KA, Zoeller RT, editors. An assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts. 2012. Available at: <http://www.who.int/ceh/publications/endocrine/en/index.html>
- WHO (World Health Organization). 2012. Possible developmental early effects of endocrine disruptors on child health. Geneva
- Wie, S.I., Hammock, B.D., 1982. The use of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for the determination of Triton X nonionic detergents. *Anal. Biochem.* 125, 168–176.
- Wold, S.; Esbensen, K., Geladi, P. Principal Component Analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2, 37-52 (1987)
- Wu, Q.; Liu, M.; Ma, X.; Wang, W.; Wang, C.; Zang, X.; Wang, Z. Extraction of Phthalate Esters from Water and Beverages Using a Graphene-Based Magnetic Nanocomposite Prior to Their Determination by HPLC. *Microchim. Acta* 2012, 177, 23–30.
- Wu ZB, Zhang Z, Chen SP, He F, Fu GP, Liang W (2007) Nonylphenol and octylphenol in urban eutrophic lakes of the subtropical China. *Fresen Environ Bull* 16:227–234
- Wu, Z. Y., & Marriott, P. J. (2011). One- and comprehensive two-dimensional highperformance liquid chromatography analysis of alkylphenol polyethoxylates. *Journal of Separation Science*, 34(23), 3322_3329.
- Wu M, Wang L, Xu G, Liu N, Tang L, Zheng J, Bu T, Lei B (2013) Seasonal and spatial distribution of 4-tert-octylphenol, 4-nonylphenol and bisphenol A in the Huangpu River and its tributaries, Shanghai, China. *Environ Monit Assess* 185:3149–3161
- Xiao, J.; Shao, B.; Wu, X.-Y.; Sun, X.-J.; Wu, Y.-N. A Study on Bisphenol A, Nonylphenol, and Octylphenol in Human Urine Samples Detected by SPE-UPLC-MS. *Biomed. Environ. Sci.* 2011, 24, 40–46.
- Xu, J.; Wu, L.; Chen, W.; Chang, A. C. Simultaneous Determination of Pharmaceuticals, Endocrine Disrupting Compounds and Hormone in Soils by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2008, 1202, 189–195.
- Yakovleva J., Zeravik J., Michura I.V., Formanovsky A.A., Franek M., Eremin S.A. (2003): Hapten design and development of polarization fluoroimmunoassay for nonylphenol. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 83, 597–607.
- Yamamoto H, Liljestrand HM (2003) The fate of estrogenic compounds in the aquatic environment: sorption onto organic colloids. *Water Sci Technol* 47(9):77–84
- Yamamoto, A., Kakutani, N., Yamamoto, K., and Myiakoda, H. (2006). Steroid hormone profiles of urban and tidal rivers using LC/MS/MS equipped with electrospray ionization and atmospheric pressure photoionization sources. *Environ. Sci. Technol.* 40: 4132–37.
- Yang M, Wang K, Shen Y, Wu M. Evaluation of estrogenic activity in surface water and municipal wastewater in Shanghai, China. *Bull Environ Contam Toxicol* 2011; 87:215–9. Yu Y, Zhai H, Hou S, Sun H. Nonylphenol ethoxylates and their metabolites in sewage treatment plants and rivers of Tianjin, China. *Chemosphere.* 2009;77(1):1–7.
- Ying, G.-G., Kookana, R. S., & Ru, Y.-J. (2002a). Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment International*, 28(6), 545–551. doi:10.1016/S0160-4120(02)00075-2.
- Ying, G.-G., Williams, B., & Kookana, R. (2002b). Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates—a review. *Environment International*, 28(3), 215–226. doi:10.1016/S0160-4120(02)00017-X.
- Ying, G.G., Williams, B., Kookana, R. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates - a review, *Environ Int* (2002) 28, 215-226.
- Ying, G.G., 2006. Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environ. Int.* 32, 417–431.
- Yu, Y.; Wu, L. Analysis of Endocrine Disrupting Compounds, Pharmaceuticals and Personal Care Products in Sewage Sludge by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Talanta* 2012, 89, 258–263.

- Yuan SY, Yu CH, Chang BV. Biodegradation of nonylphenol in river sediment. *Environ Pollut* 2004;127:425–30.
- Zacharewski T. *In vitro* bioassays for assessing estrogenic substances. *Environ Sci Technol* 1997; 31:613–23.
- Zacharewski T. Identification and assessment of endocrine disruptors: limitations of in vivo and in vitro assays. *Environ Health Perspect* 106(suppl 2):577-582 (1998).
- Zafra-Gómez, A.; Ballesteros, O.; Navalón, A.; Vílchez, J. L. Determination of Some Endocrine Disrupter Chemicals in Urban Wastewater Samples Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Microchem. J.* 2008, 88, 87–94.
- Zeng, Y. and P. Hopke, Methodological study applying three-mode factor analysis to threeway chemical data sets. *Chemom Intel Lab Syst*, t 7, 237, 1990.
- Zeravik J., Ruzgas T., Franek M. (2003): A highly sensitive flow-through amperometric immunosensor based on the peroxidase chip and enzyme-channeling principle. *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 1321–1327.
- Zeravik, J., Skryjová, K., Nevoranková, Z., & Fraňek, M. (2004). Development of direct ELISA for the determination of 4-nonylphenol and octylphenol. *Analytical Chemistry*, 76(4), 1021_1027.
- Zgola-Grzeskowiak, A. Dispersive liquid-liquid microextraction applied to isolation and concentration of alkylphenols and their short-chained ethoxylates in water samples, *J Chromatogr A* (2010) 1217, 1761-1766.
- Zhang, X., Gao, Y., Li, Q., Li, G., Guo, Q., Yan, C. Estrogenic Compounds and Estrogenicity in Surface Water, Sediments, and Organisms from Yundang Lagoon in Xiamen, China, *Arch Environ Contamin Toxicol* (2011) 61, 93.
- Zhang, Z., Ren, N., Kannan, K., Nan, J., Liu, L., Ma, W., Qi, H., Li, Y. Occurrence of Endocrine- Disrupting Phenols and Estrogens in Water and Sediment of the Songhua River, Northeastern China, *Arch Environ Contam Toxicol* (2014) 66, 361-369.
- Zhang, Z., Rhind, S.M., Kerr, C., Osprey, M., Kyle, C.E. Selective pressurized liquid extraction of estrogenic compounds in soil and analysis by gas chromatography-mass spectrometry, *Anal Chim Acta* (2011) 685, 29-35.
- Zhou, Q., Gao, Y., Xie, G. Determination of bisphenol A, 4-n-nonylphenol, and 4-tert-octylphenol by temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction combined with high performance liquid chromatography-fluorescence detector, *Talanta* (2011) 85, 1598.
- Zhou H, Huang X, Wang X, Zhi X, Yang C, Wen X, et al. Behaviour of selected endocrine-disrupting chemicals in three sewage treatment plants of Beijing, China. *Environ Monit Assess* 2010; 161:107–21.
- Zoeller RT, Brown TR, Doan LL, Gore AC, Skakkebaek NE, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from the Endocrine Society. *Endocrinology*. 2012; 153:4097–110.
- Zoller, U. (2006). Estuarine and coastal zone marine pollution by the nonionic alkylphenol ethoxylates endocrine disruptors: Is there a potential ecotoxicological problem? *Environment International*, 32(2), 269–272. doi:10.1016/j.envint.2005. 08.023.
- Zoller, U., Plaut, I., & Hushan, M. (2004). The case of the nonionic alkylphenol ethoxylates in the Mediterranean Sea region: is there a problem? *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 50(5), 79–84.
- Zoeller RT, Brown TR, Doan LL, Gore AC, Skakkebaek NE, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from the Endocrine Society. *Endocrinology*. 2012; 153:4097–110.
- Zou, Y.; Lin, S.; Chen, S. Determination of Bisphenol A Diglycidyl Ether, Novolac Glycidyl Ether and Their Derivatives Migrated from Can Coatings into Foodstuff by UPLC-MS/MS. *Eur. Food Res. Tech-nol.* 2012, 235, 231–244.
- Wang L, Ying GG, Zhao JL, Liu S, Yang B, Zhou LJ, et al. Assessing estrogenic activity in surface water and sediment of the Liao River system in northeast China using combined chemical and biological tools. *Environ Pollut* 2011;159(1):148–56.
- Wang L, Ying GG, Chen F, Zhang LJ, Zhao JL, Lai HJ, et al. Monitoring of selected estrogenic compounds and estrogenic activity in surface water and sediment of the Yellow River in China using combined chemical and biological tools. *Environ Pollut* 2012;165: 241–9.



ANEXOS

ANEXO 1

Tablas resumen:

***Legislación europea, nacional y comunitaria
relativa a la calidad del agua***

A 1. Tablas resumen de normativa COMUNITARIA, ESTATAL Y AUTONÓMICA



Tabla A.1.1. Principal legislación comunitaria (UE) relativa al control de aguas.

Texto descriptivo	Publicación	Observaciones
Directiva (UE) 2015/1787		Directiva 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.
Decisión de ejecución (UE) 2015/495/EC del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de agosto de 2015.	DOUE 25/06/2015	Directiva por la que se establece una lista de observación de sustancias (<i>The Watch List</i>) 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.
Directiva (UE)2014/101/UE del Parlamento Europeo y del Consejo		Directiva 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 uno de los tipos generados para efectuar el seguimiento del estado ecológico del agua
Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de agosto de 2013.	DOUE 24/08/2013	Directiva 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, obliga a revisar el Real Decreto 60/2011, de 21 de enero, para adaptarlo a las nuevas exigencias derivadas de dicha modificación.
Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008	DOUE 24/12/2008	Directiva relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la que se modifican y derogan ulteriormente las Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE y 86/280/CEE del Consejo, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE DOCE L 348, 24-12-2008.
Directiva 2008/56/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 17 de junio de 2008.	DOUE 25/06/2008	Directiva por la cual se establece un marco de acción comunitaria para la política del medio marino (Directiva marco sobre la estrategia marina)
Directiva 2008/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 11 de marzo de 2008.	DOUE 20/03/2008	Directiva que modifica la Directiva 2000/60/CE por la cual se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas, respecto a las competencias de ejecución atribuidas a la Comisión
Directiva 2006/118/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de diciembre de 2006	DOUE 17/7/2006	Directiva relativa a la protección de las aguas subterráneas contra la contaminación y el deterioro
Directiva 2006/11 , de la Comisión y el Parlamento Europeo, de 15 de febrero de 2006		Directiva sobre la polución causada por ciertas sustancias peligrosas en el medio acuático de la Comunidad.
Directiva 2006/7/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de febrero de 2006		Directiva relativa a la gestión de la calidad de las aguas de baño y por la que se deroga la Directiva 76/160/CEE.
Directiva 2003/53/EC		Directiva 2003/53/EC por el que 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
Decisión núm. 2455/2001/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de novi. de 2001.	DOUE 15/12/2001	Decisión por la cual se aprueba la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de Aguas, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE.
Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de octubre de 2000.	DOUE 22/12/2000	Directiva de Aguas por la cual se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. La Decisión núm. 2455/2001/CE incorpora la lista de sustancias prioritarias contemplada en los apartados 2 y 3 de la Directiva 2000/60/CE.

Tabla A.1.1. Principal legislación comunitaria (de la Unión Europea) relativa al control de aguas. (CONTINUACIÓN)

Texto descriptivo	Publicación	Observaciones
Posición comunes (CE) 41/1999 , de 22 de octubre de 1999.	DOUE 30/11/1999	Posición comunes (CE) , aprobada por el Consejo de conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 251 del Tratado constitutivo de la Comunidad Europea, con vistas a la adopción de una Directiva del Parlamento Europeo y del Consejo por la cual se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas (1999/C 343/01).
Directiva 98/83/CE , del Consejo, de 3 de noviembre de 1998	DOUE	Directiva relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. DOCE nºL.330, 05-12-1998.
Directiva 98/15/CE de febrero de 1998.	DOUE 7/02/1998	Directiva que modifica la Directiva 91/271/CEE sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas .
Directiva 96/61/CEE octubre de 1996.	DOCE 10/10/1996	Directiva sobre el Control Integrado de la Prevención de la Contaminación . Exige el estudio y control de las sustancias vertidas por los diferentes sectores de la industria.
Directiva 91/676/CEE diciembre de 1991.	DOCE 31/12/1991	Directiva relativa a la protección de las aguas contra la contaminación producida por nitratos utilizados en agricultura . Establece una serie de medidas, el objetivo de las cuales es la reducción en las aguas de nitratos procedentes de la aplicación de fertilizantes en la agricultura.
Directiva 91/271/CEE del 21 de mayo de 1991.	DOCE 30/05/1991	Directiva sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas . Su objetivo es regular la recogida, el tratamiento y el vertido de las aguas residuales urbanas, y el tratamiento y el vertido de aguas residuales procedentes de determinadas actividades industriales. Distingue grados de tratamiento en función de la sensibilidad de las aguas receptoras y del número de habitantes equivalentes de la población de origen del vertido. Fija los plazos para el establecimiento de estos sistemas de tratamiento y de redes de colectores según el número de habitantes equivalentes de la población.
Directiva 80/280/CEE julio de 1980.	DOCE 04/07/1986	Directiva relativa a los valores límite y a los objetivos de calidad para los residuos de determinadas sustancias peligrosas comprendidas en la lista 1 del anexo de la Directiva 76/464/CEE . Fija entre otros: a) los valores límite de las normas sobre emisiones DDT, tetraclorocarbonyo y pentaclorofenol para los vertidos procedentes de industrias, b) los objetivos de calidad referentes a estas sustancias por lo que hace referencia al medio acuático, c) los métodos de medida, y d) el plazo para el cumplimiento de las condiciones de las autorizaciones.
Directiva 80/278/CEE julio de 1986.	DOCE 04/07/1986	Directiva relativa al impacto de las plantas de tratamiento de aguas residuales sobre el medio ambiente . Hace referencia a la producción de fangos de depuradora aptos como abono para su uso en agricultura.
Directiva 80/778/CEE agosto de 1980.	DOCE 20/08/1980	Directiva relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano . Fija las exigencias que ha de satisfacer la calidad de las aguas destinadas a consumo humano; quedan excluidas del ámbito de aplicación de la Directiva las aguas medicinales y determinadas aguas utilizadas en las industrias alimenticias.
Directiva 80/68/CEE enero de 1980.	DOCE 26/01/1980	Directiva relativa a la protección de las aguas subterráneas contra la contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas . Tiene por objeto impedir la introducción de sustancias de la lista 1 (tóxicas) y limitar tanto como sea posible la de sustancias de la lista 2 (de efecto perjudicial) en las aguas subterráneas. Excluye los vertidos que, aunque contengan estas sustancias, las tienen en muy bajas concentraciones.

DOUE: Diario Oficial de la Unión Europea / DOCE: Diario Oficial de la Comunidad Europea



Tabla A.1.2. Principal legislación estatal en materia de aguas.

Texto descriptivo	Publicación	Observaciones
Real Decreto 902/2018,		Real Decreto 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.
El Real Decreto 314/2016,		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
Real Decreto 817/2015, de 11 de Septiembre,		Real Decreto por el que se 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 y ecológico de las aguas superficiales.
Real Decreto 1290/2012, de 7 de setiembre.	BOE 20/09/2012	Real Decreto por el cual se modifica el Reglamento del Dominio Público Hidráulico aprobado por el Real Decreto 849/1986, de 11 de abril, y el Real Decreto 509/1996, de 15 de marzo, de desarrollo del Real Decreto-Ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el cual se establecen las normas aplicables a las aguas residuales urbanas.
Real Decreto 60/2011, de 21 de enero.	BOE 16/01/2011	Real Decreto sobre las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, traspuso la Directiva 2008/105/CE, relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, 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.
Real Decreto 9/2008, de 11 de enero	BOE 16/01/2008	Real Decreto por el cual se modifica el Reglamento del Dominio Público Hidráulico aprobado por el Real Decreto 849/1986, de 11 de abril.
Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre,		Real Decreto por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas.
Real Decreto 1341/2007, de 11 de octubre		Real Decreto sobre la gestión de la calidad de las aguas de baño.
Real Decreto-Ley 4/2007, de 13 de abril.	BOE 14/04/2007	Real Decreto por el cual se modifica el texto refundido de la Ley de Aguas aprobado por el Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio.
Ley 11/2005, de 22 de junio.	BOE 22/06/2004	Incorpora el Real Decreto-Ley 2/2004 y algunos principios básicos de la nueva política del agua en la que se basa e, Programa A.G.U.A. Refuerza las funciones y competencias de I Policía de Agua, determina el concepto de caudal ecológico, etc.
Real Decreto-Ley 2/2004, de 18 de junio.	BOE 05/07/2004	Real Decreto por el cual se modifica la Ley 10/2001, de 5 de julio, del Plan Hidrológico Nacional, derogando la transferencia de agua desde el Ebro a las cuencas de Cataluña, del Júcar, Segura y del Sur.
Real Decreto 606/2003, de 23 de mayo.	BOE 06/06/2003	Real Decreto por el cual se modifica el Real Decreto 849/1986, del 11 de abril, por el cual se aprueba el Reglamento del Dominio Público Hidráulico, que desarrolla los Títulos preliminares, I, IV, V, VI i VIII de la Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas,
Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero.	BOE 07/02/2003	Real Decreto en el cual se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.

Anexo 1. Tablas de legislación -calidad del agua

Texto descriptivo	Publicación	Observaciones
Ley 16/2002 , del 1 de julio.	BOE 02/07/2002	Ley de prevención y control integrados de la contaminación.
Real Decreto Legislativo 1/2001 , de 20 de julio.	BOE 24/07/2001	Real Decreto Legislativo por el cual se aprueba el Texto refundido de la Ley de Aguas . Establece, entre otras medidas, el sometimiento a autorización previa a aquellas actividades susceptibles de provocar contaminación del dominio público hidráulico o del marítimo-terrestre.
Ley 10/2001 , de 5 de julio.	BOE 05/07/2001	Plan Hidrológico Nacional . Tiene como objetivo principal la correcta gestión y aprovechamiento de los recursos hídricos en el territorio español.
Ley 46/1999 , de 13 de diciembre.	BOE 14/12/1999	Ley modificación de la Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas. Derogada por el Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio, por el cual se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas, excepto la disposición adicional primera (BOE 176 de 24/07/01).
Real Decreto 2116/1998 , de ¿? de octubre.	BOE 20/10/1998	Real Decreto por el cual se modifica el Real Decreto 509/1996 referente a aguas residuales urbanas.
Real Decreto 509/1996 , de ¿? de octubre.	BOE 15/03/1996	Real Decreto de desarrollo del Real Decreto-Ley 11/1995 , por el cual se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas. Desarrolla el Real Decreto-Ley 11/1995, donde se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas, y lo complementa en lo que hace referencia a la recogida, el tratamiento y el vertido de estas aguas.
Real Decreto-Ley 11/1995 , de 30 de diciembre.	BOE 28/12/1995	Real Decreto Ley por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas . Complementa los títulos V de la Ley 29/1985 de aguas, y III de la Ley 22/1988 de costas, con la finalidad de proteger la calidad de las aguas continentales y marítimas de los efectos negativos de los vertidos de las aguas residuales urbanas.
Real Decreto 1315/1992 , de 30 de octubre.	BOE 01/12/1992	Real Decreto por el cual se modifica parcialmente el Reglamento del Dominio Público Hidráulico, que desarrolla los Títulos Preliminar I, IV, VI i VII de la Ley 29/1985, de 2 de agosto, de aguas, aprobado por el Real Decreto 849/1986, del 11 de abril
Real Decreto 1112/1992 , de 18 de septiembre.	BOE 06/10/1992	Real Decreto por el que se modifica parcialmente el Reglamento General para el desarrollo y ejecución de la Ley 22/1988, de 28 de julio, de Costas, aprobado por el Real Decreto 1471/1989, del 1 de diciembre.
Real Decreto 1138/1990 , de 14 de septiembre.	BOE 14/09/1992	Real Decreto por el que se traslada 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.
Real Decreto 1471/1989 del 1 de diciembre.	BOE 12/12/1989	Real Decreto que aprueba el Reglamento General para el desarrollo y ejecución de la Ley 22/88, de 28 de julio.
Real Decreto 927/1988 , de 29 de julio.	BOE 31/08/1988	Real Decreto por el que se aprueba el Reglamento de la Administración Pública del Agua y de la Planificación Hidrológica, en desarrollo de los títulos II y III de la Ley de Aguas.
Ley 22/1988 , de 28 de julio.	BOE 29/07/1988	Ley de Costas . Prevé la regularización básica de las autorizaciones de vertidos.
Real Decreto 849/1986 , de 11 de abril.	BOE 30/04/1986	Real Decreto por el cual se aprueba el Reglamento del Dominio Público Hidráulico, que desarrolla los títulos Preliminar I, IV, V, VI i VII de la Ley 29/1985, de 2 de agosto, de aguas.
Real Decreto 2473/1985 , de 27 de setiembre.	BOE 02/01/1986	Real Decreto por el cual se aprueba la tabla vigencia a la cual hace referencia el apartado 3 de la Disposición Derogatoria de la Lei 29/1985, de 2 de agosto, de aguas
Ley 29/1985 , de 2 de agosto.	BOE 08/08/1985	Ley de Aguas . Establece competencias en materia de aguas continentales y en materia de costas.



Tabla A.1 3. Principal legislación autonómica de Cataluña en materia de aguas.

Texto descriptivo	Publicación	Observaciones
Decreto 50/2005 , de 29 de marzo.	DOGC 31/03/2005	Decreto por el cual se despliega la Ley 4/2004, del 1 de julio, reguladora del proceso de adecuación de las actividades existentes a la Ley 3/1998, de 27 de febrero, y de modificación del Decreto 220/2001, de gestión en las deyecciones ganaderas.
Ley 4/2004 , del 1 de julio.	DOGC 05/07/2004	Ley reguladora del proceso de adecuación de las actividades de incidencia ambiental al que establece la Ley 3/1998, de 27 de febrero de la intervención integral de la Administración ambiental.
Decreto Legislativo 3/2003 , de 4 de noviembre.	DOGC 21/11/2003	Decreto Legislativo por el cual se aprueba el Texto refundido de la legislación en materia de aguas de Cataluña.
Decreto 143/2003 , de 10 de junio.	DOGC 25/06/2003	Decreto de modificación del Decreto 136/1999, de 18 de mayo, por el cual se aprueba el Reglamento general de despliegamiento de la Ley 3/1998, de 27 de febrero, de la intervención integral de la administración ambiental, y se adaptan los anexos.
Decreto 130/2003 , de 13 de mayo.	DOGC 29/05/2003	Decreto por el cual se aprueba el Reglamento de los servicios públicos de Saneamiento
Ley 13/2001 , de 13 de julio.	DOGC 24/07/2001	Ley de modificación de la Ley 3/1998, de 27 de febrero, de la intervención integral de la Administración Ambiental.
Decreto 119/2001 , de 2 de mayo.	DOGC 17/05/01	Decreto por el que se aprueban medidas ambientales de prevención y corrección de la contaminación de las aguas por nitratos.
Ley 6/1999 , de 12 de julio.	DOGC 22/07/1999	Ley de ordenación, gestión y tributación del agua. Derogada por el Decreto Legislativo 3/2003, de 4 de noviembre, por la cual se aprueban el Texto refundido de la legislación en materia de aguas de Cataluña (DOGC 4015 de 21.11.03).
Decreto 136/1999 , de 18 de mayo.	DOGC 21/05/1999	Decreto por el cual se aprueba el Reglamento general de despliegamiento de la Ley 3/1998, de 27 de febrero, de la intervención integral de la administración ambiental, i se adaptan sus anexos.
Ley 3/1998 , de 27 de febrero.	DOGC 13/03/1998	Ley de la intervención integral de la Administración Ambiental
Decreto 83/1996 de marzo.	DOGC 11/03/1996	Decreto sobre medidas de regulación de vertidos de aguas residuales. Regula el procedimiento para la obtención de la autorización de vertidos, tanto de los que se producen en el dominio público hidráulico como los que se efectúan de tierra a mar, y establece las normas de adaptación de carácter transitorio.
Ley 4/1991 de junio.	DOGC 27/03/1991	Ley por la cual se crea el Departamento de Medio Ambiente de la <i>Generalitat</i> de Cataluña.
Ley 5/1981 de junio.	DOGC 08/06/1981	Ley de Saneamiento (Plà de Sanejament)

DOGC: Diario Oficial de la Generalidad de Cataluña

Tabla A.1.4. Principal legislación comunitaria relativa a los LODOS de depuradora



Texto descriptivo	Publicación	Observaciones
Directiva 2006/12/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 5 de abril de 2006	DOUE 05/04/2006	Directiva 2006/12/CE relativa a los residuos. GESTIÓN DE LOS FANGOS EN EUROPA Y LOS EUA La legislación europea directamente implicada en la gestión de los fangos incluye -como mínimo-. Además, existe una variada normativa propia de cada país.
Decisión del Consejo de 19 de diciembre de 2002	DOUE 19/12/2002	Decisión por la cual se establecen los criterios y procedimientos de admisión de residuos en los vertederos de acuerdo con el artículo 16 y el anexo II de la Directiva 1993/31/CEE.
Directiva 2000/76/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 4 de diciembre de 2000	DOUE 04/12/2000	Directiva 2000/76/CE relativa a la incineración de residuos.
Directiva 1999/31/CE de 26 de abril de 1999	DOUE 26/04/1999	Directiva 1999/31/CE relativa al depósito controlado de los residuos
Directiva 96/61/CE de 24 de septiembre de 1996 .	DOUE 24/09/1996	Directiva 96/61/CE de 24, relativa a la prevención y al control integrado de la contaminación.
Directiva 91/676/CEE , de 12 de diciembre	DOUE 12/12/1991	Directiva 91/676/CEE, relativa a la protección de las aguas contra la contaminación producida por nitratos utilizados en agricultura.
Directiva 91/271/CEE del Consejo, de 21 de mayo de 1991	DOCE 21/05/1991	Directiva 91/271/CEE sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas.
Directiva 86/278/CE , de 12 de junio de 1986	DOCE 12/06/1986	Directiva de aplicación de lodos de depuradora a usos agrícolas.



Tabla A.1.5. Principal legislación estatal en materia de aguas.

Texto descriptivo	Publicación	Observaciones
R.D. 824/ 2.005 de 8 de julio	BOE 07/07/2005	R.D. 824/ 2.005 sobre productos fertilizantes
R.D. 1310/ 1.990 de 29 de octubre	BOE 07/10/1990	R.D. 1310/ 1.990 por el que se regula la utilización de los lodos de depuración en el sector agrario

ANEXO 2

Enfermedades o disfunciones endocrinas en seres humanos

Tabla A.2.1. Resumen de enfermedades o disfunciones endocrinas que se sospecha que son causadas por EDCs en seres humanos, y sus tendencias.

	Enfermedad o disfunción endocrinas	Descripción	Tendencias de Incidencia/ prevalencia	EDCs asociados	
PROBLEMAS DE FERTILIDAD	Problemas de fertilidad humana – calidad del esperma	La calidad del esperma ha descendido un 50% en los últimos 50 años	La calidad del esperma ha descendido un 50% en los últimos 50 años		
	Infertilidad humana – incapacidad para procrear	Una de seis parejas busca ayuda para tener un hijo. La demanda de ART está creciendo del 1% al 2% al año en Europa está creciendo del 1% al 2% al año en Europa	Una de seis parejas busca ayuda para tener un hijo. La demanda de ART está creciendo del 1% al 2% al año en Europa está creciendo del 1% al 2% al año en Europa		
MALFORMACIONES CONGÉNITAS de los órganos sexuales masculinos	Criptorquidismo (no descenso testicular) e hipospadias	Las malformaciones congénitas, como las hipospadias (defecto congénito del pene) o el criptorquidismo (testículos no descendidos) se están incrementando o alcanzando niveles desfavorablemente elevados. Un niño de cada 15 nace con criptorquidismo (22) Los casos anuales se han doblado en 10 años	Las malformaciones congénitas, como las hipospadias (defecto congénito del pene) o el criptorquidismo (testículos no descendidos) se están incrementando o alcanzando niveles desfavorablemente elevados. Un niño de cada 15 nace con criptorquidismo. Los casos anuales se han doblado en 10 años		
DESÓRDENES INMUNO		Varios estudios con animales han demostrado que existen fuertes conexiones entre la exposición a ftalatos y el aumento de incidencia del asma infantil. Los mecanismos en humanos son muy verosímiles pero no siempre han sido investigados o demostrados.		Ftalatos	
CÁNCERES HORMONALES	Cancer de mama	1 de 8 mujeres en Europa desarrollarán esta patología a lo largo de su vida (25) 90 por 100.000 – 28UE (23)	- En Europa 1 de cada 8 mujeres desarrollarán esta patología a lo largo de su vida 90 por 100.000 – 28UE Su incidencia ha aumentado; - En EE. UU. en 1% anual desde 1940. y - En Dinamarca un 50% entre los años 1945 y 1980 -En el Reino Unido durante las últimas décadas	Relación de DDT, dioxinas y PCB con el cáncer de mama.-Ftalatos, BPA y Parabenos	
	Cáncer endometrial dependiente de estrógeno	Las tasas de incidencia han aumentado, específicamente el tipo dependiente de estrógeno.	Las tasas de incidencia han aumentado, específicamente el tipo dependiente de estrógeno.		
	Cáncer de tiroides	En mujeres, incidencia aumenta al 7% anual en Europa (25) Carga alta y creciente particularmente en mujeres, niños y adolescentes (3) En hombres, incidencia de 2,5 por 100.000 en UE-28 (ratios estándar por edad) (23)	En mujeres, incidencia aumenta al 7% anual en Europa (25) Carga alta y creciente particularmente en mujeres, niños y adolescentes (3) En hombres, incidencia de 2,5 por 100.000 en UE-28 (ratios estándar por edad) (23)		
	Cáncer de próstata	Cáncer de próstata 1 de cada 7 hombres en Reino Unido lo desarrollará durante su vida (29) Incidencia del 61 por 100.000 en UE-28 (ratios estándar de edad) (23) Niños ingleses: triple riesgo en 2015 comparados con los nacidos en 1990 (29)	Cáncer de próstata 1 de cada 7 hombres en Reino Unido lo desarrollará durante su vida (29) Incidencia del 61 por 100.000 en UE-28 (ratios estándar de edad) (23) Niños ingleses: triple riesgo en 2015 comparados con los nacidos en 1990 (29)		
	Cáncer testicular	Incidencia de 5 por 100.000 en UE-28 (ratios estándar de edad) (23) Incidencia doble en 25 años	Incidencia de 5 por 100.000 en UE-28 (ratios estándar de edad) (23) Incidencia doble en 25 años		

Tabla A.2.1. Resumen de enfermedades o disfunciones endocrinas que se sospecha que son causadas por EDCs en seres vivos, y sus tendencias (continuación).

	Enfermedad o disfunción endocrinas	Descripción	Tendencias de Incidencia/ prevalencia	EDCs asociados
ALTERACIONES EN EL DESARROLLO DEL SISTEMA NEUROLÓGICO: trastornos neurológicos que afectan al desarrollo del cerebro y comportamiento en niños		La alteración del desarrollo neurológico está relacionada con las siguientes trastornos cognitivos: Autismo, Trastorno de déficit de atención e hiperactividad (ADHD), retraso mental y parálisis cerebral, déficits neurofisiológicos, función cognitiva y problemas del comportamiento, deterioro motor, pérdida de memoria, déficits importantes del cociente intelectual (IQ), agresividad, etc.	-En USA en los últimos años se ha observado un incremento de trastornos neurológicos durante el desarrollo embriológico y se cree que pueden ser debidos en un 25% a la combinación de factores genéticos y ambientales.	
	Autismo o Trastornos del espectro autista (ASD)	El mecanismo endocrino relacionado más comúnmente con la neurotoxicidad del desarrollo es la alteración tiroidea. Una serie de estudios recientes muestra un aumento de la incidencia y la prevalencia del autismo en los últimos 50 años, en parte por la inclusión de casos más leves o la reducción de la edad de diagnóstico en este periodo de tiempo. Sin embargo, no se descartan otros factores, como los EDCs	-Ha habido un aumento de la incidencia y la prevalencia del autismo en los últimos 50 años, llegando actualmente a alrededor de 20 por 10.000 habitantes. -La OMS estima que los ASD ascienden al 0,3% de la cantidad total de enfermedades (WHO, ASD, 2013). -Estudios en varios países muestran un índice de 1/500	Contaminantes organoclorados.....
	Trastorno de déficit de atención e hiperactividad (ADHD)	El ADHD es actualmente el trastorno neurológico más común del desarrollo en niños en Europa.	-La prevalencia a nivel mundial se estima en el 5,3% -En EE.UU una tasa del 11% (equivalente a 6,4 mill.de niños) Incidencia en países de la UE: 2% - 10% -En el Reino Unido, 3,62% de niños y 0,85% de niñas entre 4 y 15 años (1 de cada 20 niños en edad escolar en Inglaterra y Gales) está afectado por alguna forma de ADHD.	
ENFERMEDADES o DESÓRDENES METABÓLICOS		El control del metabolismo implica muchos componentes del sistema endocrino, incluyendo el tejido adiposo, cerebro, músculo del esqueleto, hígado, páncreas, glándula tiroide y tracto gastrointestinal. Actualmente existen datos en animales que muestran que la exposición embrionaria a EDCs como el BPA, ftalatos, plomo, tributiltin, pesticidas organoclorados y organofosfatos, etc, conduce a un metabolismo del colesterol alterado, posible ganancia de peso y diabetes tipo 2 en la edad adulta. Existe información epidemiológica limitada que apoya la idea de que la exposición de los EDCs durante el embarazo puede afectar al aumento de peso infantil La obesidad y la diabetes son epidemias en la UE. 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. Un estudio para estimar 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		BPA, ftalatos, plomo, tributiltin, pesticidas organoclorados y organofosfatos
	Obesidad	Prevalencia de obesidad en UE más del doble en 20 años Más del 50% de hombres y mujeres tiene sobrepeso; 20% hombres y 23% mujeres son obesos	En Europa, la obesidad afecta a 150 millones de adultos y 15 millones de niños (20% y 10% de la población adulta e infantil respectivamente) Más del 50% de hombres y mujeres tiene sobrepeso; 20% hombres y 23% mujeres son obesos	Plaguicidas y biocidas Ftalatos (diabetes y resistencia a la insulina) BPA (diabetes.y obesidad)
	Diabetes	La diabetes tipo 2 es más común	30 millones de personas en UE = 6% población edad 20-79 Tendencia al alza: prevalencia sube 1% cada 3 años	

Referencias: (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)

ANEXO 3

Tablas de concentraciones de EDCs del PVA en PORTUGAL

Tabla A.3.1. Concentraciones mínimas, máximas y medianas de de APs, APEOs, BPA, HOBT y ftalatos obtenidas mediante SPE y LC-MS en aguas de Portugal

Compuestos	PNB			Fz			PM			RA			PF		
	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med
NP ₁ EO	0.22	1.12	0.31	0.20	3.62	0.63	0.33	27.75	3.24	0.19	11.90	1.40	0.24	0.92	0.15
NP ₂ EO	0.12	1.29	0.44	0.07	5.24	1.11	0.06	6.11	1.44	0.07	2.16	0.38	0.07	1.41	0.28
NP	0.15	0.48	0.11	0.15	0.62	0.14	0.16	12.97	2.61	0.05	9.48	0.89	0.16	0.38	0.07
OP	0.09	0.77	0.08	0.10	0.81	0.10	0.09	12.34	0.91	0.07	0.91	0.12	0.09	0.13	0.03
BPA	0.09	0.24	0.04				0.09	5.03	0.81	0.12	0.95	0.10	0.12	0.16	0.01
HOBT	0.02	0.19	0.02	0.02	0.13	0.02	0.02	0.65	0.11	0.02	0.13	0.04	0.02	0.11	0.01
DMP															
DEP	0.20	5.05	0.60	0.05	2.29	0.33	0.24	1.08	0.29	0.22	3.35	0.51	0.20	4.39	0.48
DBP	0.21	1.09	0.14	0.18	1.65	0.33	0.18	4.96	0.74	0.31	13.05	1.02	0.25	2.57	0.34
BBP	0.02	0.02	0.00	0.11	0.28	0.03	0.04	0.04	0.01	0.02	0.27	0.02	0.06	0.06	0.01
DEHP	0.38	60.06	4.74	0.45	50.69	4.16	0.52	102.26	7.70	0.33	53.80	4.70	0.35	128.39	12.39

Compuestos	PRP			PC			MdV			PdS			ES		
	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med
NP ₁ EO	0.22	1.42	0.38	0.22	1.20	0.22	0.10	0.92	0.28	0.58	18.92	3.35	0.26	1.45	0.29
NP ₂ EO	0.06	1.11	0.32	0.07	0.66	0.16	0.07	0.86	0.23	0.12	12.64	1.89	0.07	2.05	0.54
NP	0.01	0.64	0.12	0.11	0.29	0.07	0.14	2.69	0.25	0.27	25.53	3.78	0.15	1.13	0.22
OP	0.13	1.66	0.15	0.10	0.85	0.11	0.09	2.22	0.40	0.09	30.23	1.92	0.09	2.73	0.18
BPA	0.11	2.62	0.22	0.90	1.36	0.11	0.09	1.08	0.09	0.10	4.67	0.83	0.10	0.80	0.05
HOBT	0.03	0.32	0.06	0.03	0.07	0.01	0.02	0.35	0.04	0.03	3.68	0.25	0.02	0.04	0.01
DMP										0.18	0.18	0.01	0.18	0.18	0.01
DEP	0.18	3.18	0.43	0.23	2.26	0.40	0.18	2.28	0.35	0.19	28.37	2.20	0.21	2.44	0.38
DBP	0.20	6.37	0.61	0.28	2.75	0.37	0.03	6.70	0.75	0.28	18.48	1.82	0.03	4.99	0.95
BBP	0.08	0.49	0.04	0.15	0.15	0.02	0.03	1.26	0.11	0.08	0.27	0.03	0.02	0.32	0.03
DEHP	0.34	51.47	4.69	0.12	82.30	5.94	0.01	19.92	1.85	0.36	47.00	3.92	0.38	41.12	4.26

Tabla A.3.2. Concentraciones de APs, APEOs, BPA y HOBT y ftalatos obtenidas mediante SPE y LC-MS en muestras de agua de Portugal

		AP01	MY01	JN01	AU01	SP01	OC01	NV01	DC01	JN02	FB02	MR02	AP02	MY02
NP ₁ EO	PNB	0.24	0.24	0.83	bdl	0.33	0.28	bdl	bdl	0.67	0.35	bdl	bdl	1.12
	Fz	0.93	1.09	3.62	0.95	0.41	1.26	0.22	0.32	0.22	0.20	bdl	bdl	0.89
	PM	1.04	1.47	27.75	11.90	0.56	2.89	0.35	5.38	1.27	0.99	1.40	bdl	3.38
	RA	nd	0.32	bdl	11.90	bdl	0.28	4.69	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	9.32
	PF	bdl	0.89	bdl	bdl	bdl	0.28	bdl	bdl	bdl	0.24	bdl	0.60	0.92
	PRP	bdl	nd	1.42	0.22	0.25	0.52	0.37	0.22	0.25	bdl	bdl	1.06	0.99
	PC	0.29	bdl	0.42	bdl	bdl	0.26	0.31	X	bdl	bdl	bdl	0.64	1.20
	MdV	0.71	bdl	0.29	bdl	0.71	X	0.26	bdl	bdl	0.22	0.90	0.44	0.92
	PdS	2.30	3.31	3.46	1.16	18.92	2.59	1.68	X	3.86	3.64	1.15	1.00	15.15
ES	0.26	0.96	0.36	0.29	0.31	0.38	0.33	bdl	bdl	bdl	bdl	1.45	0.30	
NP ₂ EO	PNB	1.20	1.29	0.95	0.80	0.61	0.79	0.20	bdl	0.60	0.35	0.12	bdl	0.65
	Fz	4.42	3.82	5.24	2.7	0.84	1.71	0.45	0.28	0.11	0.10	0.07	bdl	0.43
	PM	3.10	3.16	6.11	2.16	1.04	2.00	0.49	2.14	0.35	0.64	0.52	0.06	0.72
	RA	0.88	1.10	bdl	2.16	0.33	0.59	1.12	bdl	0.14	0.08	0.07	bdl	0.32
	PF	0.18	1.31	bdl	0.81	0.76	0.50	0.30	bdl	0.07	0.21	bdl	bdl	1.41
	PRP	0.31	0.25	1.11	0.36	0.09	0.41	0.50	0.62	0.17	0.06	0.07	0.47	0.39
	PC	0.08	0.39	0.23	0.66	0.09	0.47	0.14	X	0.07	bdl	bdl	0.18	0.28
	MdV	0.15	0.25	0.41	0.56	0.56	X	0.86	0.15	b	0.10	0.41	0.08	0.18
	PdS	2.44	1.25	1.82	1.61	12.64	1.00	1.15	X	3.17	2.08	0.69	0.94	4.34
ES	1.13	1.44	0.93	2.05	0.62	0.52	0.43	bdl	0.07	bdl	bdl	0.99	0.25	
NP	PNB	0.15	0.23	0.32	nd	0.20	bdl	0.23	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl
	Fz	0.36	0.15	0.28	0.20	0.44	0.62	0.37	bdl	bdl	nd	0.15	bdl	bdl
	PM	0.45	0.27	5.58	6.41	0.16	1.82	0.37	0.92	0.64	2.29	2.28	0.16	2.29
	RA	0.50	0.23	0.16	6.41	0.21	0.31	9.48	bdl	nd	bdl	nd	bdl	0.05
	PF	0.25	nd	0.16	bdl	0.38	0.26	0.36	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl
	PRP	0.28	0.15	0.29	nd	0.26	0.30	0.64	0.26	bdl	0.01	bdl	bdl	bdl
	PC	0.24	0.16	0.24	nd	bdl	0.17	0.21	X	nd	nd	0.29	bdl	bdl
	MdV	0.25	0.21	0.29	nd	0.44	X	0.62	0.24	nd	bdl	2.69	bdl	bdl
	PdS	0.89	0.27	2.07	1.73	25.53	2.66	4.58	X	4.34	0.43	0.70	1.64	6.93
ES	0.49	0.28	0.23	nd	1.13	1.03	0.82	bdl	bdl	bdl	0.15	bdl	bdl	

Tabla A.3.2. Concentraciones de APs, APEOs, BPA y HOBT y ftalatos obtenidas mediante SPE y LC-MS en muestras de agua de Portugal (continuación).

		AP01	MY01	JN01	AU01	SP01	OC01	NV01	DC01	JN02	FB02	MR02	AP02	MY02
OP	PNB	nd	nd	bdl	nd	nd	nd	bdl	bdl	bdl	bdl	0.17	bdl	0.09
	Fz	nd	nd	bdl	nd	nd	nd	0.11	bdl	bdl	bdl	0.10	bdl	0.10
	PM	0.10	0.65	0.09	0.17	bdl	nd	bdl	bdl	0.10	bdl	0.16	bdl	bdl
	RA	nd	nd	0.09	0.17	nd	bdl	bdl	bdl	bdl	nd	0.07	bdl	0.10
	PF	0.13	nd	0.09	nd	bdl	nd	0.12	bdl	bdl	nd	0.12	bdl	0.12
	PRP	nd	0.16	0.17	nd	bdl	nd	bdl	bdl	bdl	bdl	0.15	bdl	0.13
	PC	0.10	nd	bdl	nd	nd	nd	bdl	X	bdl	nd	0.17	bdl	0.12
	MdV	nd	nd	0.09	nd	nd	X	bdl	0.11	bdl	bdl	0.17	bdl	0.14
	PdS	0.11	0.63	0.13	0.12	0.21	0.11	0.10	X	0.44	0.27	0.10	0.60	0.63
ES	nd	0.30	bdl	nd	bdl	bdl	bdl	0.09	bdl	bdl	bdl	bdl	0.16	
BPA	PNB	bdl	0.11	0.09	bdl	0.24	bdl	0.10	bdl	bdl	nd	nd	bdl	bdl
	Fz	bdl	nd	bdl	bdl	nd	nd	nd	bdl	bdl	nd	nd	nd	nd
	PM	0.19	0.22	0.20	0.23	0.12	0.11	1.30	bdl	0.09	0.31	0.12	bdl	0.26
	RA	bdl	nd	0.12	0.23	bdl	bdl	0.72	bdl	nd	nd	bdl	nd	bdl
	PF	bdl	nd	0.12	bdl	bdl	bdl	bdl	0.16	nd	nd	bdl	bdl	bdl
	PRP	bdl	bdl	0.11	nd	bdl	0.15	2.62	bdl	bdl	nd	bdl	bdl	bdl
	PC	bdl	0.90	bdl	bdl	nd	bdl	bdl	X	bdl	nd	nd	bdl	bdl
	MdV	0.09	0.09	bdl	bdl	bdl	X	bdl	0.54	nd	bdl	0.09	nd	bdl
	PdS	0.44	1.87	0.36	0.25	bdl	4.67	0.44	X	1.51	nd	1.55	0.41	0.23
ES	bdl	bdl	nd	nd	bdl	bdl	0.19	0.10	bdl	nd	nd	bdl	bdl	
HOBT	PNB	0.02	nd	bdl	nd	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	0.19
	Fz	bdl	nd	bdl	nd	0.02	bdl	bdl	bdl	bdl	0.02	0.02	bdl	0.02
	PM	bdl	0.18	bdl	0.13	0.12	bdl	bdl	0.03	0.02	0.06	0.02	0.04	0.65
	RA	0.02	nd	nd	0.13	0.03	bdl	nd	bdl	nd	nd	bdl	bdl	0.13
	PF	0.02	nd	nd	nd	0.03	bdl	bdl	nd	nd	bdl	0.02	bdl	0.11
	PRP	0.04	bdl	bdl	bdl	0.07	0.04	0.03	0.06	0.19	bdl	bdl	0.08	0.05
	PC	bdl	nd	bdl	nd	bdl	bdl	bdl	X	bdl	nd	bdl	bdl	0.03
	MdV	bdl	nd	bdl	nd	0.04	X	bdl	bdl	0.02	0.02	0.03	bdl	0.18
	PdS	0.03	bdl	bdl	bdl	0.03	nd	0.08	X	nd	3.68	0.04	nd	nd
ES	0.03	nd	nd	nd	0.04	bdl	bdl	nd	0.03	nd	bdl		0.02	

Tabla A.3.3. Concentraciones de Ftalatos (DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP) obtenidas mediante SPE y LC-MS en muestras de agua de Portugal.

		AP01	MY01	JN01	AU01	SP01	OC01	NV01	DC01	JN02	FB02	MR02	AP02	MY02	JN02	JL02	AU02
DMP	PNB	nd	bdl	bdl	nd	nd	nd	nd	nd	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl
	Fz	bdl	bdl	bdl	nd	bdl	nd	bdl	nd	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	nd
	PM	nd	bdl	bdl	bdl	bdl	nd	nd	nd	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	nd	nd
	RA	nd	bdl	bdl	nd	nd	bdl	bdl	nd	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl
	PF	nd	nd	nd	bdl	bdl	bdl	nd	bdl	nd	bdl	bdl	nd	bdl	X	X	X
	PRP	nd	bdl	bdl	nd	bdl	bdl	nd	nd	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	nd
	PC	nd	bdl	bdl	nd	bdl	bdl	bdl	X	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl
	MdV	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	X	nd	bdl	nd	bdl	bdl	nd	nd	bdl	bdl	bdl
	PdS	0.18	bdl	bdl	bdl	nd	bdl	nd	X	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl
ES	nd	0.18	bdl	bdl	bdl	bdl	nd	bdl	bdl	bdl	nd		bdl	bdl	nd	nd	
DEP	PNB	0.20	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	1.33	0.65	1.02	1.33	5.05	bdl	bdl	bdl
	Fz	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	1.08	0.42	0.35	1.08	2.29	bdl	bdl	0.05
	PM	bdl	0.24	bdl	bdl	bdl	bdl	0.54	bdl	0.98	0.55	0.28	0.98	1.08	bdl	bdl	bdl
	RA	0.22	bdl	bdl	bdl	bdl	0.35	0.93	0.31	1.16	0.38	0.36	1.16	3.35	bdl	bdl	bdl
	PF	bdl	bdl	bdl	0.20	nd	0.24	0.24	bdl	0.96	0.41	0.22	0.96	4.39	X	X	X
	PRP	0.23	bdl	bdl	bdl	bdl	0.21	0.72	0.21	0.70	0.77	0.18	0.70	3.18	bdl	bdl	bdl
	PC	0.90	0.67	0.23	bdl	bdl	bdl	0.26	X	0.78	0.34	0.24	0.78	2.26	bdl	bdl	bdl
	MdV	0.32	0.22	bdl	bdl	0.37	X	0.52	bdl	0.65	0.36	0.18	0.65	2.28	bdl	bdl	bdl
	PdS	0.47	1.87	bdl	bdl	0.36	0.54	0.38	X	0.81	0.53	0.19	0.81	28.37	bdl	0.27	0.54
ES	0.46	0.40	bdl	0.52	nd	0.41	0.45	0.21	0.55	0.38	0.30		2.44	bdl	bdl	bdl	
DBP	PNB	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	1.09	bdl	bdl	bdl	bdl	0.46	bdl	0.21	bdl	bdl	0.54
	Fz	bdl	0.21	bdl	0.26	0.21	1.65	0.49	bdl	0.53	0.61	0.32	0.53	0.18	bdl	bdl	0.27
	PM	bdl	0.21	bdl	bdl	bdl	1.85	4.96	bdl	bdl	bdl	0.26	bdl	bdl	4.32	bdl	0.18
	RA	0.31	bdl	bdl	bdl	bdl	2.29	13.05	0.31	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	0.32
	PF	bdl	0.27	0.51	0.47	1.29	2.57	bdl	bdl	bdl	bdl	0.25	bdl	bdl	X	X	X
	PRP	bdl	bdl	bdl	0.23	0.36	1.95	6.37	0.21	bdl	bdl	bdl	bdl	0.20	bdl	0.24	0.23
	PC	0.45	0.28	0.56	bdl	bdl	1.41	2.75	X	bdl	bdl	bdl	bdl	0.40	bdl	bdl	bdl
	MdV	bdl	3.81	bdl	bdl	0.71	X	6.70	bdl	bdl	0.18	bdl	bdl	0.03	bdl	0.24	0.27
	PdS	bdl	0.50	1.33	bdl	0.84	18.48	5.35	X	0.38	0.62	bdl	0.38	0.68	bdl	0.28	0.34
ES	0.92	0.26	0.65	bdl	1.55	4.99	4.48	0.21	0.21	1.95	bdl		0.03	bdl	bdl	bdl	

Tabla A.3.3. Concentraciones de Ftalatos (DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP) obtenidas mediante SPE y LC-MS en muestras de agua de Portugal (continuación).

		AP01	MY01	JN01	AU01	SP01	OC01	NV01	DC01	JN02	FB02	MR02	AP02	MY02	JN02	JL02	AU02
BBP	PNB	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	0.02	bdl	bdl	0.02	bdl	bdl	bdl	bdl
	Fz	bdl	bdl	nd	bdl	bdl	0.28	bdl	bdl	0.11	bdl	bdl	0.11	bdl	bdl	bdl	bdl
	PM	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	nd	bdl	0.04	bdl	bdl	0.04	bdl	bdl	bdl	bdl
	RA	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	0.27	bdl	0.02	bdl	bdl	0.02	bdl	bdl	bdl	bdl
	PF	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	0.06	bdl	bdl	0.06	bdl	X	X	X
	PRP	bdl	bdl	bdl	bdl	nd	bdl	0.49	bdl	0.08	bdl	bdl	0.08	bdl	bdl	bdl	bdl
	PC	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	nd	X	0.15	bdl	bdl	0.15	bdl	bdl	bdl	bdl
	MdV	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	X	0.37	bdl	0.03	1.26	bdl	0.03	bdl	bdl	bdl	bdl
	PdS	bdl	bdl	bdl	bdl	nd	0.27	bdl	X	0.08	bdl	bdl	0.08	bdl	bdl	bdl	bdl
	ES	bdl	bdl	bdl	bdl	bdl	0.32	0.21	bdl	0.02	bdl	bdl		bdl	bdl	bdl	bdl
DEHP	PNB	0.93	1.83	0.38	0.43	nd*	60.06	3.47	nd*	2.20	0.87	0.83	2.20	0.38	0.93	0.63	0.62
	Fz	bdl	2.38	0.49	0.52	nd*	50.69	4.60	nd*	2.23	0.61	0.64	2.23	0.45	0.45	0.69	0.63
	PM	1.33	2.66	0.52	0.76	nd*	102.26	5.85	nd*	2.50	0.91	0.64	2.50	1.04	0.65	1.07	0.53
	RA	1.60	1.91	0.33	0.36	nd*	53.80	7.63	nd*	2.34	0.76	0.60	2.34	0.88	0.96	0.85	0.79
	PF	0.91	2.64	0.40	1.19	nd*	59.33	128.39	nd*	1.97	0.59	0.57	1.97	0.35	X	X	X
	PRP	1.06	1.33	0.44	0.59	nd*	51.47	8.20	nd*	2.05	0.52	0.46	2.05	0.34	0.67	5.23	0.66
	PC	0.61	2.08	0.41	0.42	nd*	82.30	0.12	X	2.31	0.82	0.54	2.31	0.52	0.57	1.01	0.98
	MdV	0.64	1.54	0.33	0.39	nd*	X	19.92	nd*	1.55	0.01	0.41	1.55	0.80	0.61	1.03	0.83
	PdS	1.22	3.50	0.40	0.36	nd*	47.00	1.36	X	2.04	0.75	0.52	2.04	1.23	0.81	0.83	0.65
	ES	0.86	3.24	0.63	0.38	nd*	41.12	9.40	nd*	4.00	1.34	0.60		1.64	0.76	3.00	1.21

ANEXO 4

Estudio QUIMIOMÉTRICO

del PVA D. 2000/60/CE en PORTUGALL

A.4.1. ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO DE LOS DATOS DEL PVA DE LA D. 2000/60/CE EN PORTUGAL

En el apartado 4.3. de la memoria, se incluyen los resultados obtenidos de la determinación de EDCs en 186 muestras de aguas de ríos de la geografía portuguesa, correspondientes a los 10 puntos de muestreo seleccionados a lo largo del periodo establecido. Con los datos generados en las muestras analizadas en esta tesis mediante LC-MS, se realizó el estudio quimiométrico, dentro del mismo grupo de investigación.

Los **objetivos del análisis quimiométrico** mediante el modelo PCA de los datos generados en el **PVA de la D. 2000/60/CE** fueron:

- Determinar la distribución ambiental de los 5 EDCs prioritarios estudiados.
- Establecer las correlaciones entre los 5 contaminantes.
- Establecer relaciones geográficas y temporales entre los EDCs detectados en cada punto de muestreo
- Determinar los puntos de contaminación puntual y difusa.

Los EDCs, seleccionados por estar presentes en la mayoría de las muestras, fueron: los alquilfenoles NP y OP, los alquilfenoles etoxilados NP₁EO, NP₂EO y el BPA. A continuación, se resumen los principales resultados obtenidos para cada compuesto.

Los límites de detección obtenidos a partir del cálculo de aguas fortificadas a una concentración de 0.3 µg/L (ppb) y con una relación S/N=3 para cada uno de los compuestos evaluados, fueron 0.060 µg/L para NP₂EO, 0.090 µg/L para OP y BPA, 0.150 µg/L para NP y 0.220 µg/L para NP₁EO. Cuando los valores detectados fueron inferiores a los respectivos LODs para cada compuesto, se introdujo el valor correspondiente a LOD/2 en las tablas de datos. En la tabla A.4.3.4. se observa el intervalo de concentración en que aparece cada uno de los compuestos estudiados.

Tabla A.4.1. Intervalos de concentración de los compuestos estudiados

COMPUESTO	OP	NP	BPA	NPE ₁ O	NPE ₂ O
Límite mínimo (µg/L)	0,05	0,09	0,05	0,12	0,03
Límite máximo (µg/L)	30,23	25,52	5,03	27,75	12,64

Los 5 compuestos estudiados aparecen mayoritariamente de forma generalizada en todas las muestras analizadas, pero las concentraciones más elevadas se detectaron en los núcleos urbanos de Lisboa y Porto. En segundo término, se observa la aparición diferenciada de los nonilfenoles etoxilados (NP₁EO y NP₂EO) preferentemente cerca del núcleo urbano de Porto, frente los alquilfenoles (OP, NP) y BPA, que aparecen más frecuentemente en los alrededores de Lisboa. Finalmente, también se refleja la aparición de los NPEO y su producto de degradación NP en la zona de Porto frente al BPA y el OP, que aparecen mayoritariamente en la zona de Lisboa.

4. 1.1. Análisis Estadístico Univariante

Se realizó un primer análisis estadístico de los datos de los siguientes parámetros estadísticos: media, mediana, moda, desviación estándar, varianza, máximo, mínimo, suma y cuenta.

Diagrama de cajas (boxplot): la Figura A.4.3.1. muestra el diagrama de cajas o *boxplot* correspondiente, señalando sus características principales y los *outliers*.

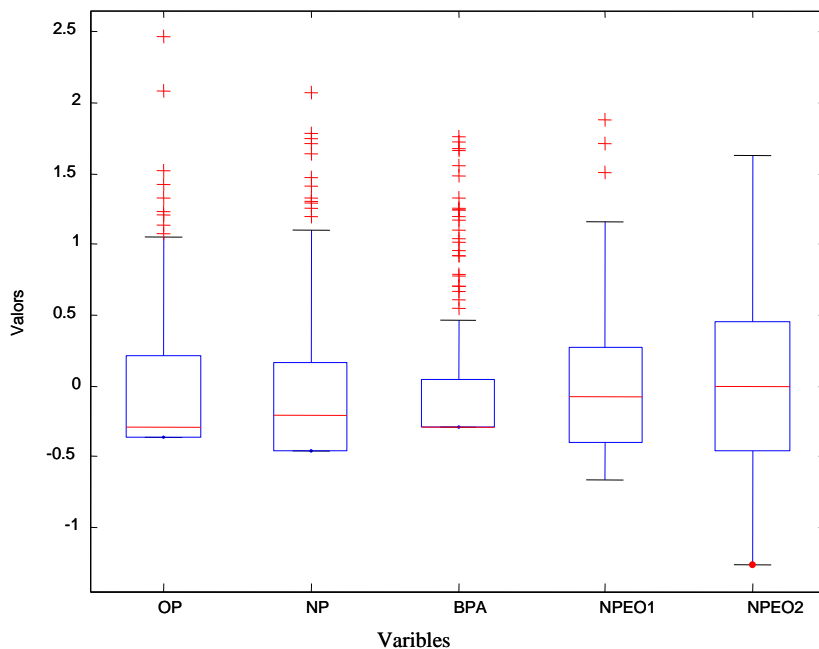


Figura. A.4.3.1. Diagrama de cajas o *boxplot* donde las variables son los contaminantes estudiados

Una vez realizado este análisis estadístico univariante y descriptivo de los datos, estos se importaron al entorno de programación, análisis numérica y visualización MATLAB (*Release 12, The Mathworks, Natick MA, USA*). En este entorno se realizaron las manipulaciones numéricas y representaciones gráficas posteriores. Se utilizó el software PLS Toolbox v2.1: Eigen vector Research, Mason, WA, USA, que es una de las herramientas o *toolbox* quimiométricas más desarrolladas y utilizadas en ese momento en el entorno MATLAB®. Contiene numerosas funciones que permiten resolver multitud de problemas relacionados con el tratamiento y análisis multivariante de datos y se utilizó fundamentalmente para realizar los análisis de componentes principales (PCA).

La Figura A.4.3.2. muestra la suma de la concentración total de cada uno de los contaminantes estudiados en todos los puntos de muestreo y en todos los meses a la vez.

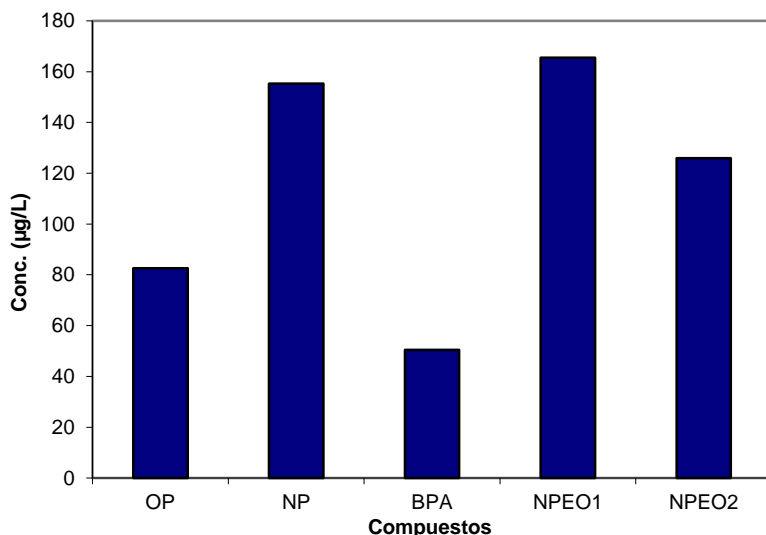


Figura. A.4.3.2. Suma de las concentraciones obtenidas en todos los puntos de muestreo para cada EDC.

El cálculo de la suma de las concentraciones obtenidas en todos los puntos de muestreo para cada EDC muestra en la Fig. A.4.3.3. que las concentraciones de los compuestos nonilfenólicos (NP₁EO, NP₂EO y NP) son claramente más altas, siendo 2 y 3 veces superiores respecto a la concentración de OP y BPA respectivamente. Esta conclusión concuerda con el uso masivo de los nonilfenoles etoxilados en la industria y la agricultura.

- **Distribución geográfica:** la suma de la concentración total de contaminantes para cada punto de muestreo durante todo el periodo estudiado permite evaluar las zonas más contaminadas.

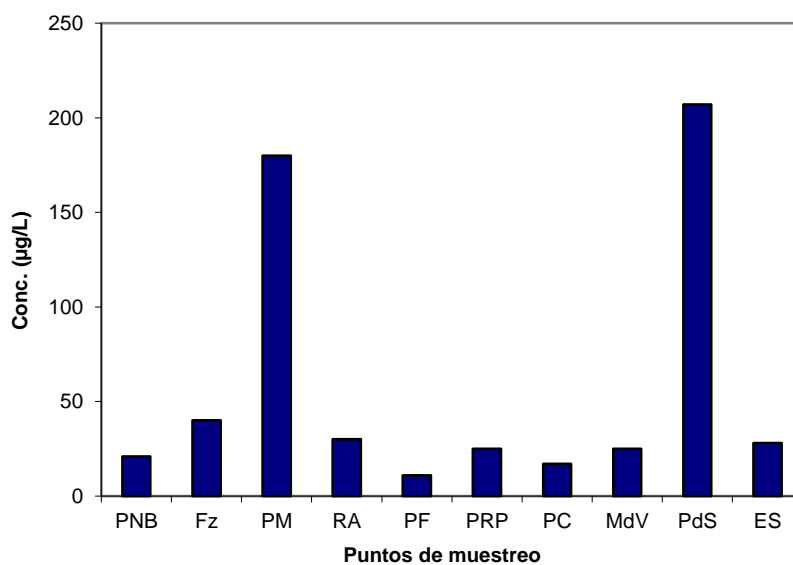


Figura. A.4.3. 3. Suma de la concentración total de contaminantes para cada punto de muestreo

*No se dispone de muestras de PF a partir de junio 2002 debido a que el río se secó en este punto de muestreo.

En la Figura A.4.3.3. se observa que hay una gran acumulación de compuestos disruptores endocrinos en los puntos de muestreo correspondientes a zonas próximas a los núcleos urbanos de Lisboa y Porto (Ponte do Sacavém y Ponte Moreira, respectivamente). La concentración de estos contaminantes en el resto de puntos de muestreo baja considerablemente poniendo de manifiesto una concentración de EDCs 6 veces inferior en el resto de puntos de muestreo respecto a la encontrada en los núcleos urbanos.

A pesar de la ausencia de muestras de Ponte Formoselha (PF) a partir de junio de 2002, la media de las concentraciones obtenida se considera representativa, ya que la concentración de EDCs es muy baja en este punto de muestreo.

- Distribución temporal: finalmente, en la Figura A.4.3.4. se refleja la concentración total mensual de los 5 EDCs determinados durante el intervalo de tiempo que se llevó a cabo el estudio ambiental (abril 2001-diciembre 2002).

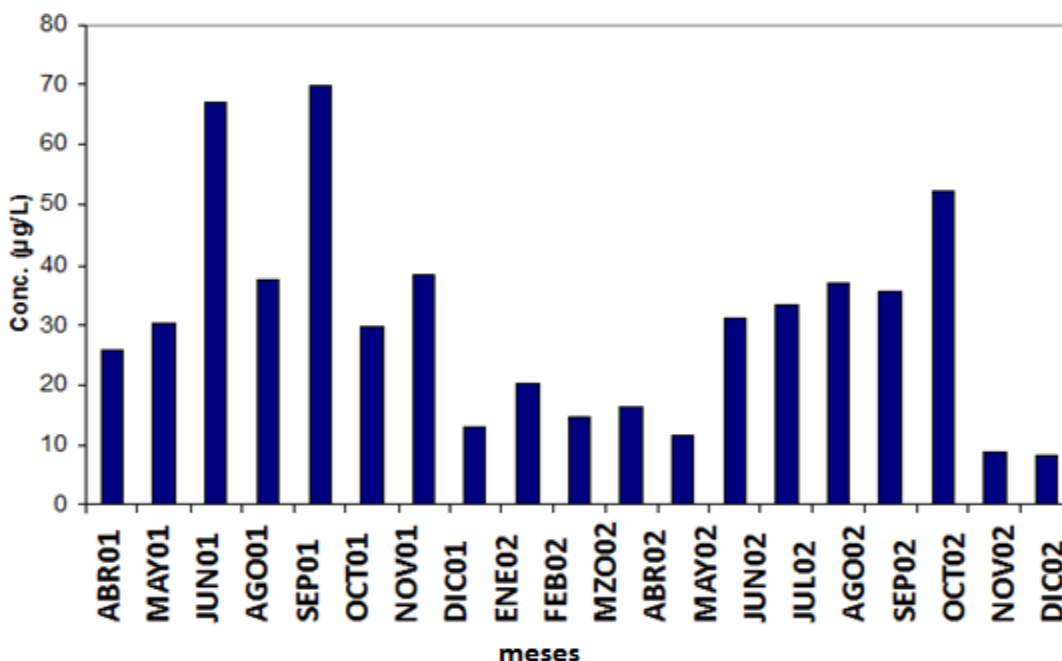


Figura. A.4.3.4. Suma de la concentración total de EDCs (OP, NP, BPA, NPE₁0 y NPE₂0) obtenida mensualmente en del PVA (Abril 2001-Diciembre 2002). *No se dispone de muestras de PF a partir de junio 2002.

Se observa una contaminación acentuada en los meses de verano, mientras que el contenido de EDCs en invierno disminuye considerablemente, reflejado en los meses de enero de 2002 a abril de 2002. Las concentraciones más elevadas de EDCs en los meses de primavera y verano son probablemente consecuencia de una disminución de los caudales de los ríos que comportaría una concentración de los EDCs.

Por otra parte, la interpretación de los diagramas de cajas o *boxplot* permitió evaluar el comportamiento de los datos sin pretratamiento (Fig.A.4.3.5.) y con autoescalado de éstos (Fig.A.4.3.6.). En ambos casos se observa una distribución de la concentración de los diferentes EDCs muy asimétrica debido a la poca longitud

de las cajas que representan a cada una de las variables y a la presencia de valores de concentración altos de los compuestos analizados.

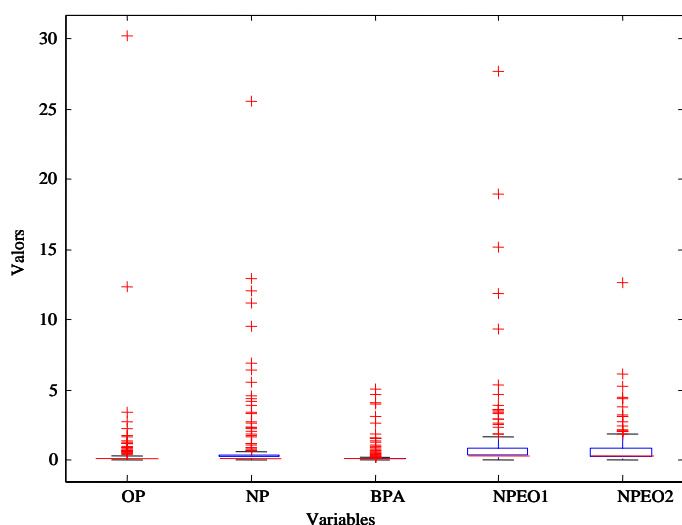


Figura. A.4.3.5. Diagrama de cajas sin pre-tratamiento de los datos

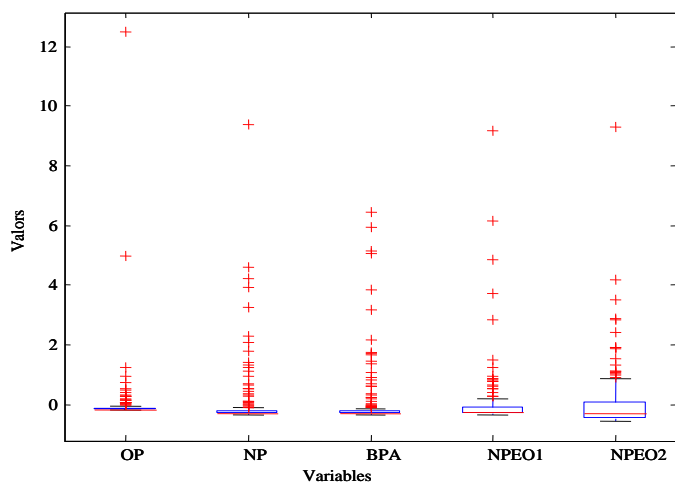


Figura. A.4.3.6. Diagrama de cajas con autoescalado de los datos

El hecho de que la mediana tome un valor muy cercano a cero para todas las variables, indica a su vez que un elevado porcentaje de muestras presentan concentraciones de estos contaminantes muy bajas. El hecho de que el límite superior de las líneas exteriores de cada caja (*whiskers*) sea extremadamente corto, muestra la tendencia de los disruptores endocrinos a no presentarse en concentraciones elevadas en las muestras de aguas. Al mismo tiempo, puede señalarse la presencia de algunos datos atípicos (*outliers*), representadas por un signo positivo y que corresponden a muestras con concentraciones de EDCs muy elevadas y que por tanto se desvían de la mayor parte de la población.

4.1.2. Análisis Estadístico Multivariante

Se aplicaron a los datos obtenidos 2 modelos distintos de PCA, autoescalado de los datos y transformación logarítmica:

Modelo PCA. Autoescalado de los datos: la determinación de las correlaciones entre las diferentes variables para formar la matriz de covarianzas (Cx), base del modelo PCA, muestra una elevada correlación entre el NP₁EO y NP₂EO y al mismo tiempo de estos compuestos con el NP:

Tabla A.4.2.. Matriz diagonal de las covarianzas de las variables:

	OP	NP	BPA	NP ₁ EO	NP ₂ EO
OP	1.0000				
NP	0.3462	1.0000			
BPA	0.2690	0.3518	1.0000		
NP ₁ EO	0.0064	0.6032	0.0766	1.0000	
NP ₂ EO	0.0075	0.6383	0.0808	0.7400	1.0000

Se obtienen valores similares para el NP₁EO y NP₂EO, compuestos correspondientes a la misma estructura química con tan solo una unidad etoxi de diferencia. Se observa también una buena correlación entre los NPnEOs y su producto de degradación, NP. Aunque únicamente se observa una ligera diferencia en la interpretación de los datos con el autoescalado de éstos, se continuó el resto del estudio quimiométrico con datos autoescalados como es práctica habitual en este tipo de estudios. Los valores propios de la matriz de covarianzas de las variables Cov (x) nos ayudan a decidir el número de componentes principales que tomaremos para explicar la varianza de los datos. (ver Figura A.4.3.7.).

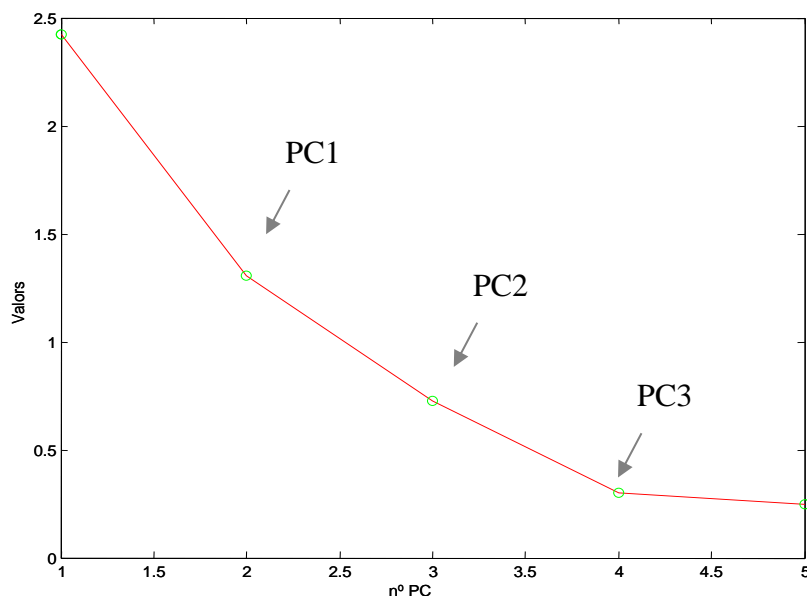


Figura A.4.3.7. Porcentaje de variación explicada mediante los componentes principales. Representación gráfica de la determinación del número de PC.

En la Fig. A.4.3.8.se observa que con el primer componente principal (PC1) podemos explicar prácticamente el 50% de la varianza, con el segundo (PC2) el 25% aproximadamente y con el tercero (PC3) un 15% de la varianza. A partir del cuarto PC ya se observa que el porcentaje de varianza explicada tiende a un nivel prácticamente constante y por tanto consideramos que serán los 3 primeros componentes principales los que proporcionarán información relevante en la interpretación de los resultados y que a partir del cuarto componente únicamente se proporcionará ruido. Así con estas 3 nuevas variables o PCs, encontradas de la combinación lineal de las variables o datos originales, se consigue explicar aproximadamente el 90% de la varianza de los datos.

LOADINGS: en la Fig. A.4.3.8.se representan los *loadings*, obteniendo el “mapa de las variables”, en el cual se observa la importancia de cada una de las variables (5 EDCs estudiados) respecto a cada PC, pudiendo verse también como covarían las variables entre sí.

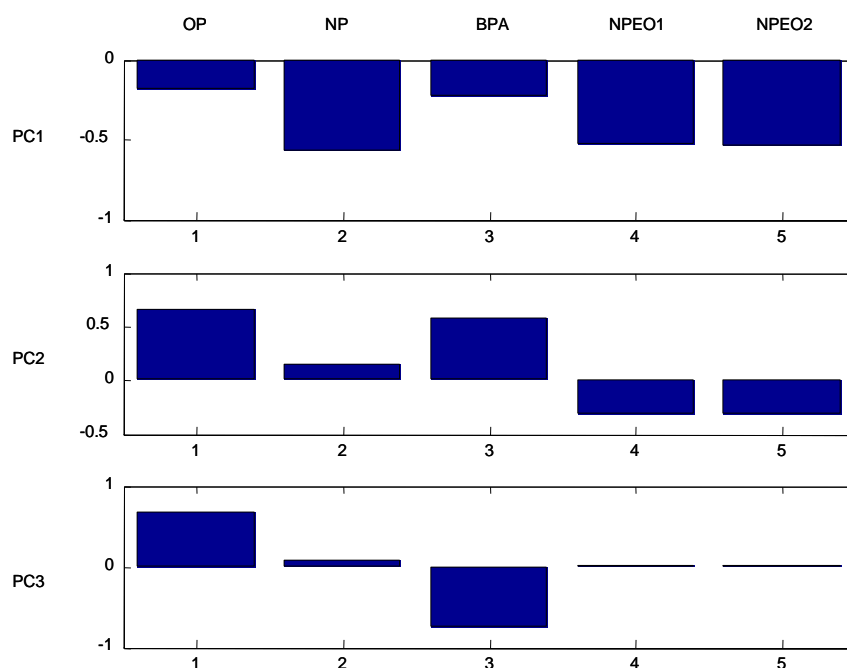


Figura. A.4.3.8. Mapa de las variables – *LOADINGS*

- PC1: se observa que el primer componente principal (PC1) describe una fuente de contaminación generalizada con correlación positiva de todas las variables, adquiriendo una especial importancia la presencia del NP y de los NPEOs de cadena corta. Por tanto, puede asignarse un origen común de contaminación difusa de estos compuestos por esta fuente principal. Este PC1 permite poner de manifiesto la elevada correlación entre el NP y el NP₁EO y NP₂EO. Este hecho indica que el contenido de NP probablemente es debido a la degradación de los derivados etoxilados.

- PC2: se observa una segunda fuente de contaminación en la que los orígenes de la presencia de los nonilfenoles etoxilados y del NP vienen marcados por motivos diferentes y por tanto la presencia de NP no está relacionada con la degradación del NP₁EO y NP₂EO. De esta forma y teniendo en cuenta los usos de los 3 compuestos que están correlacionados positivamente, el origen de esta segunda fuente de contaminación esta probablemente causada por los vertidos de la industria de los plastificantes, siendo el BPA un monómero para la síntesis de policarbonato y resinas epoxi y el OP y del NP aditivos de plásticos.
- PC3: la tercera fuente de contaminación, explicada por el tercer PC, muestra unos orígenes de contaminación debidos básicamente a la presencia de BPA y OP, aunque estos 2 compuestos se encuentran correlacionados negativamente en esta fuente de contaminación y por tanto son debidos a causas diferentes.

SCORES: en la Fig.A.4.3.9. se presenta el llamado "mapa de las muestras", en el cual están representados los Scores de los componentes principales PC1 vs PC2, el más utilizado por dar una mayor dispersión o varianza de las muestras.

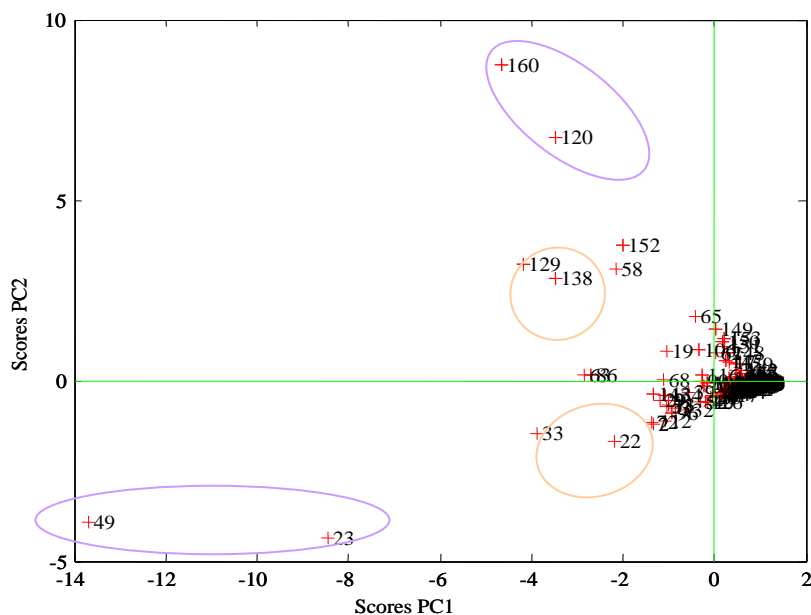


Figura. A.4.3.9. Mapa de las muestras – SCORES (PC1 vs PC2)

En este gráfico se observa un conjunto de muestras similares a la mediana situadas alrededor del origen de coordenadas (los datos han sido centrados). También puede diferenciarse entre 3 conjuntos de muestras que presentan las concentraciones más elevadas de los diferentes contaminantes :

- Un primer conjunto de muestras con contenidos de EDCs importantes corresponde a los puntos 49 (PdS-SET 01) y 23 (PM-JUN 01), que presentan un elevado score PC1. Por tanto estas muestras estan especialmente contaminadas por los compuestos alquilfenólicos: NP₁EO, NP₂EO y NP.
- El segundo conjunto de muestras con elevados contenidos en EDCs está formado por los puntos nº 160 (PdS-OCT 02) y 120 (PM-JUN 02) que tienen un elevado score por el PC2 y que por tanto, presentan una

mayor contaminación por plastificantes (BPA, OP y NP). Por tanto el NP observado en ambos conjuntos de muestras, tiene un origen diferente en cada uno de ellos.

○ También puede asignarse un tercer conjunto de muestras que sobresalen de la mediana y que corresponden a muestras con unos *scores* aproximadamente iguales para el PC1 y PC2 y que corresponden a los puntos nº 33 (PM-AGO 01), 22 (Fz-JUN 01), 129 (PM-JUL 02), 138 (PM-AGO 02), etc. En estas muestras existe el efecto conjunto de la contaminación generalizada y la proveniente de la industria de los plastificantes.

Al asociar a cada una de las muestras su punto de muestreo se observa que los 3 conjuntos de muestras descritos corresponden mayoritariamente a puntos de muestreo cercanos a los núcleos urbanos de Lisboa y Porto.

La Figura A.4.3.10. representa los *Scores* respecto a los componentes principales PC1 y PC3. Este gráfico permite diferenciar entre un conjunto de muestras "normales" o similares a la mediana que presentan una baja concentración de los contaminantes estudiados y otro conjunto de muestras con concentraciones más elevadas de estos contaminantes.

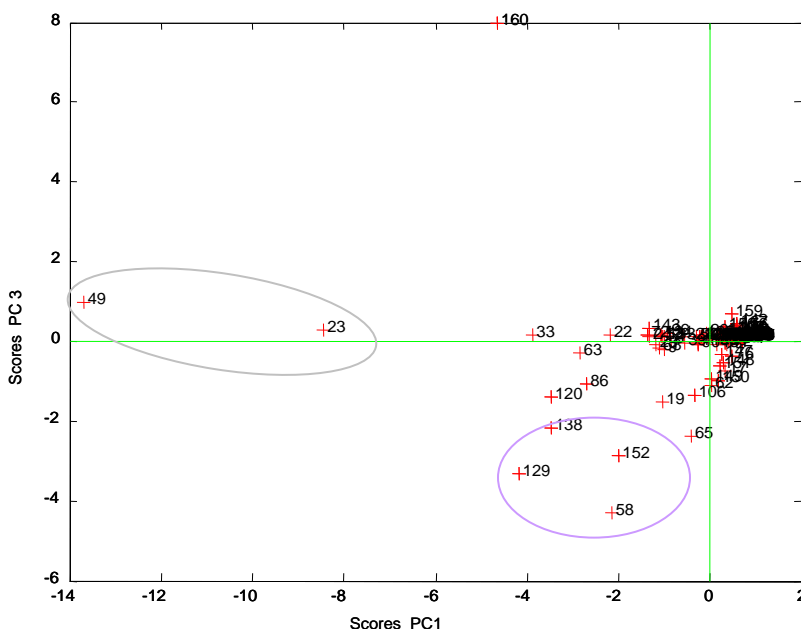


Figura A.4.3.10. Mapa de las muestras – SCORES (PC1 vs PC3)

○ Entre las muestras con mayor concentración de EDCs pueden señalarse las muestras 49 (PdS-SET 01) y 23 (PM- JUN 01), en las cuales se observa el fenómeno de la contaminación generalizada para los 5 EDCs estudiados, mayoritariamente para los compuestos nonilfenólicos.

○ También se identifica otro grupo de muestras, correspondientes a los números 129 (PM-JUL 02), 152 (PM-SET 02), 58 (PM-OCT 01), 138 (PM-AGO 02), etc, donde se observa una contaminación basada en el foco generalizado de contaminación y en la presencia de BPA.

○ Finalmente, el gráfico refleja la muestra nº 160 (PdS-OCT 02), a la que puede asignarse una contaminación basada en la presencia del OP.

La asignación del punto de muestreo a los puntos característicos del gráfico muestra la diferenciación, otra vez, entre las muestras correspondientes a puntos cercanos a Lisboa y Porto (PdS y PM) y el resto de puntos de muestreo.

Modelo PCA– Transformación Logarítmica: para obtener más información se analizaron los datos posteriormente a su transformación logarítmica. De esta forma al evaluar el modelo PCA se pretendió aumentar el peso de los valores de concentración bajos y disminuir el peso de los valores de concentración altos. Se calcularon las correlaciones entre los 5 compuestos estudiados observando, igual que en el caso del autoescalado de los datos, que existe una fuerte correlación entre el NP₁EO y el NP₂EO y a su vez de estos con el NP. Al mismo tiempo se realizó el centrado y autoescalado de los datos, pero debido a que las diferencias obtenidas al aplicar el modelo PCA fueron mínimas, únicamente se analizaron los datos con la transformación logarítmica sin pre-tratamiento.

Estadística descriptiva. En el análisis de los datos con la transformación logarítmica (Figura A.4.3.11.) se observa un alargamiento significativo de las cajas y de las líneas correspondientes a los *whiskers* que permitirá distinguir más entre las diferentes muestras.

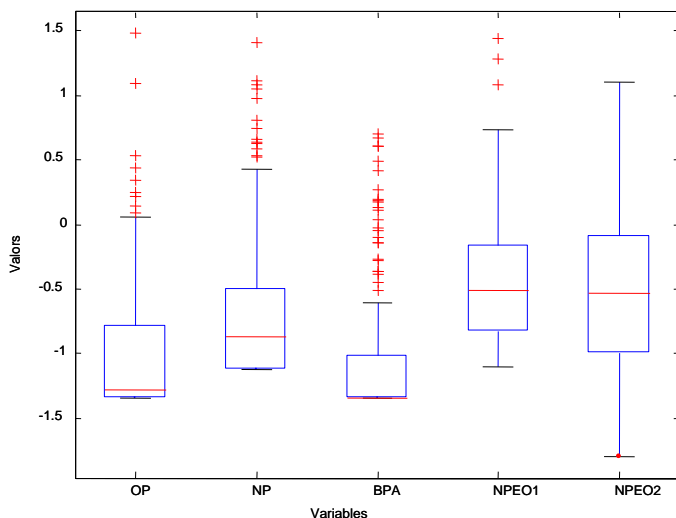


Figura.A.4.3.11. Diagrama de cajas con transformación logarítmica

La transformación logarítmica muestra también una mediana muy próxima a cero y permite llegar a conclusiones muy similares a las encontradas con el autoescalado de los datos, es decir, la observación de una distribución asimétrica de las concentraciones de los compuestos estudiados en las muestras de agua y la tendencia de estos contaminantes a presentarse a bajas concentraciones.

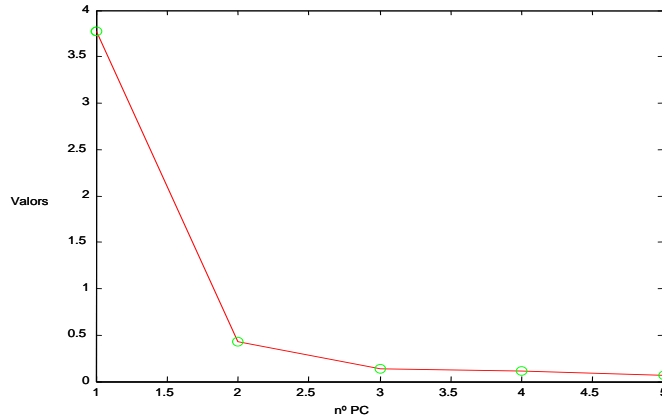


Figura A.4.3.12. Porcentaje de variación explicada con los componentes principales

La representación de los valores propios de la matriz de covarianza de las variables (Fig. 4.18) muestra una varianza para el primer PC (PC1) de aproximadamente el 85% y de un 10% para el PC2. De esta forma únicamente con 2 variables o componentes principales se podrá explicar un 93% de la variabilidad de los datos.

Loadings: Al evaluar el "mapa de las variables", es decir, la representación gráfica de los *loadings* (Fig. A.4.3.13.), se observa:

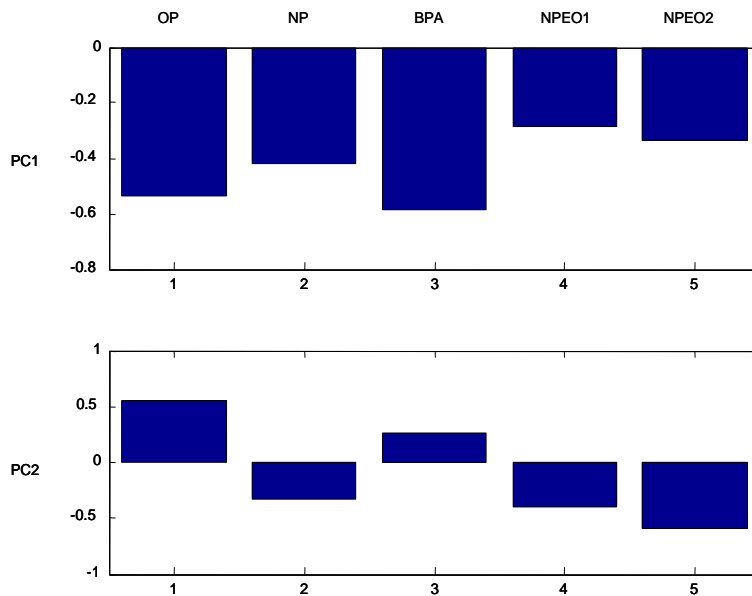


Figura A.4.3.13. Mapa de las variables – *LOADINGS*

- PC1, el primer componente principal, describe una fuente de contaminación generalizada con correlaciones positivas de todas las variables, aunque BPA, OP y NP son los contaminantes que más contribuyen a esta fuente de contaminación.

- PC2, el segundo componente principal, describe una fuente de contaminación de orígenes diferentes, mostrando por una parte la correlación entre el plastificante BPA y el aditivo OP y por otra parte la correlación entre los NPEOs y su producto de degradación NP.

Scores: el análisis del "mapa de las muestras" o representación de los Scores (Fig. A.4.3.14.) respecto a PC1 y PC2 permite distinguir más entre las diferentes muestras que con el autoescalado de los datos (Figura A.4.3.9.) ya que con la transformación logarítmica se consigue una mayor dispersión de las muestras.

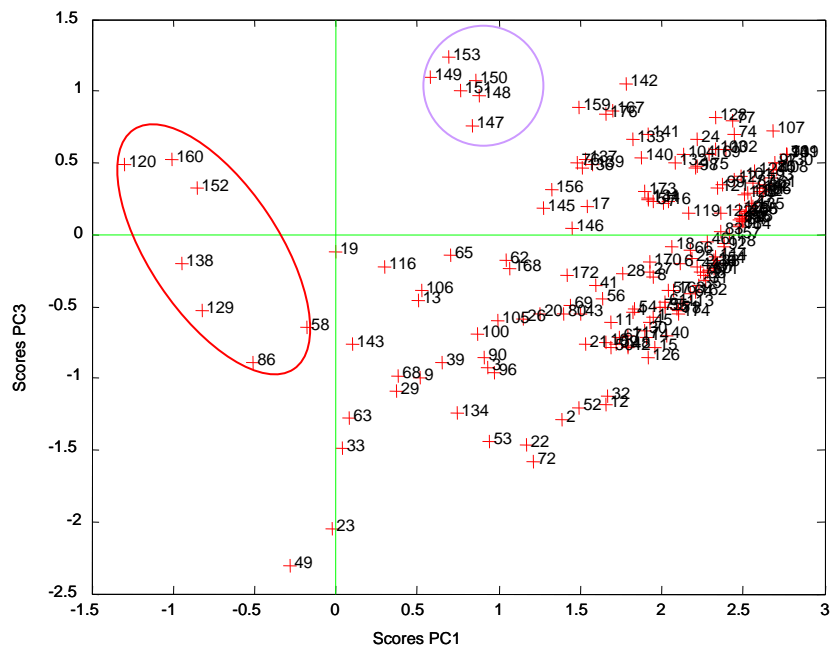


Figura.A.4.3.14. Mapa de las muestras – SCORES

- En el gráfico de los Scores se observa la presencia de muestras en las que su contaminación se explica por una fuente de contaminación generalizada por parte de los 5 EDCs, correspondientes a 120 (PM-AGO 02), 152 (PdS-SET 02), 29 (PdS-JUN 01), 86 (PdS-ENE 02, etc). Estas muestras coinciden con el entorno de los núcleos urbanos de Lisboa y Porto.
- Se indica un conjunto numeroso de muestras contaminadas principalmente por NPEOs y NP que corresponden a las muestras cercanas al núcleo urbano de Lisboa.
- También se observa un conjunto de muestras cuya contaminación viene dada básicamente por la presencia del plastificante BPA y el aditivo OP. Estas muestras corresponden a nº 153 (PdS-SET 02), 149 (PRP-SET 02), 150 (PC-SET 02), 148 (RA-SET 02), etc.
- Finalmente, se ve un conjunto de muestras "concentradas" correspondientes a muestras donde su contaminación proviene de un foco generalizado de contaminación y al mismo tiempo a la presencia de plastificantes. Este hecho confirma la hipótesis de que muchos contaminantes orgánicos están distribuidos en el medio ambiente de forma difusa.

La contaminación difusa es la más difícil de remediar, ya que aunque normalmente está ocasionada por la presencia de contaminantes a niveles muy bajos (niveles de ng/L o incluso ng/mL), es muy difícil poder

controlar cuales son las fuentes de contaminación que ocasionan la liberación continuada de contaminantes en el ambiente. Además, no se descarta que parte de esta contaminación sea por deposición atmosférica. La presencia de EDCs en el ambiente puede ocasionar enfermedades de tipo crónico, como se ha demostrado en diversas especies de invertebrados expuestas a aguas altamente contaminadas.

A. 4.2. CONCLUSIONES del estudio quimiométrico del PVA de la D. 2000/60/CE -----

Las principales conclusiones extraídas del **análisis quimiométrico** de los datos del **PVA para el cumplimiento de la Directiva 2000/60/CE son:**

- ✓ Existe una distribución muy asimétrica de la concentración de los compuestos disruptores endocrinos analizados en ríos de Portugal.
 - ✓ En todas las muestras de agua se ha detectado al menos un EDC. Están presentes en el intervalo de concentraciones de 0,03-30,2 µg/L, con mayor concentración de NP₁EO, NP₂EO y el NP.
 - ✓ Existe una elevada correlación entre el NP₁EO y el NP₂EO, así como de estos dos contaminantes con su producto de degradación, el NP.
 - ✓ La concentración de EDCs es superior en las zonas próximas a los núcleos urbanos de Porto y Lisboa (con una concentración media de 0.78, 0.91, 1.16, 0.88 y 0.19 µg/L en PM y 2.36, 0.24, 2.43, 1.25 y 0.38 µg/L en PdS para el NP, OP, NP₁EO, NP₂EO y BPA respectivamente) respecto a la encontrada en el resto de puntos de muestreo.
 - ✓ Se han aplicado 2 modelos de **Análisis de Componentes Principales (PCA):**
 - (i) PCA-autoescalado: la fuente de contaminación principal es generalizada (mayoritariamente por el NP), y se necesitan 3 componentes principales (PC) para explicar el origen de la contaminación:
 - PC1 explica el 50% de la varianza ⇒ Fuente contaminación generalizada (NPs)
 - PC2 25% varianza ⇒ Fuente contaminación plastificantes
 - PC3 15% varianza ⇒ Fuente contaminación diversos orígenes
 - (ii) PCA-transformación logarítmica de los datos: permite identificar el origen de la contaminación con 2 PC, siendo el 85% la principal fuente de contaminación generalizada (principalmente debida al OP y BPA)
 - PC1 85% varianza ⇒ Fuente contaminación generalizada ⇒ OP, BPA
 - PC2 10% varianza ⇒ Fuente contaminación diversos orígenes
- Contaminación centralizada en Lisboa y Porto.
- ✓ Por tanto, el modelo más acertado es el de PCA con transformación logarítmica, ya que la contaminación por EDCs en Portugal es mayoritariamente generalizada.

it
Always
seems
impossible
until it's
Done.

- Nelson Mandela -