

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INGENIERÍA AMBIENTAL

PRODUCTOS DE CUIDADO PERSONAL EN EL MEDIO AMBIENTE: PRESENCIA, DESTINO Y EFECTOS

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por la Universitat Politècnica de Catalunya

Tesis por compendio de publicaciones

Autor:

Daniel Molins Delgado

Directores:

Dra. M. Silvia Díaz Cruz

Científico Titular

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

Dr. Damià Barceló Cullerés

Profesor de Investigación

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

Tutor:

Dr. Alejandro Josa García-Tornel

Catedrático

Departamento de Ingeniería Geotécnica y Geociencias
Escuela de Ingeniería Civil
Universitat Politècnica de Catalunya

Barcelona, 2017

Esta Tesis Doctoral se ha realizado con la ayuda financiera del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad de España a través de los proyectos NANOTROJAN (CTM2011-24051) e INTEGRA-COAST (CGL2014-56530-C4-1-R). También ha sido financiada por la Generalitat de Catalunya (Grup de Recerca Consolidat: 2014 SGR 418 – Unitat de qualitat de l'aigua i sòls).

Alle Dinge sind verkettet, verfädel, verliebt.
Friedrich Nietzsche

Agradecimientos

Quien me conoce sabe que, de todas las páginas y páginas que he escrito, esta es tal vez la que más me ha costado redactar. No quiero parecer desagradecido, pero me faltan palabras de agradecimiento para toda la gente que aquí menciono.

Agradezco a la Dra. Silvia Díaz su continuo apoyo y confianza durante todos estos años, las innumerables reuniones en su despacho y todo lo que he aprendido bajo su dirección. Al Dr. Damià Barceló le agradezco igualmente la confianza depositada en mí y la libertad de acción a la hora de llevar a buen puerto los estudios de los que me he hecho cargo. A ambos les debo la oportunidad de haber podido iniciarme en el mundo de la investigación.

Agradezco también al Dr. Alejandor Josa por su soporte en todo lo relativo a la universidad y su burocracia, tan necesario cuando se trabaja fuera de sus muros.

A toda la gente del laboratorio les agradezco las incontables charlas en los tiempos muertos, el apoyo en los días más negros del analista a nivel traza, la feroz competencia por los turnos de análisis en los diferentes instrumentos y su ayuda en todo lo que ha sido necesario. Un agradecimiento especial a Pablo Gago, el predecesor, a Božo Zonja, Señor del Orbitrap, a Kike Barón y a Josep Sanchís, los sabios del consejo, y a Òscar Aznar, traductor y showman. Buscarles un epíteto a todos los otros compañeros del laboratorio se me hace complicado, pero no por ello mi agradecimiento es menor. A Álex Margareto, Cristina Bosch, Cayo Corcellas, Jaume Azeña, Cristina Postigo, Mar Olmos, Daniel Rivas, Marta Llorca, Paqui Pérez, Núria Guillén, Nicola Mastroianni, Gabriella Schirinzi y Maja Kuzmanovic. A los que estuvieron de paso, como Rodrigo Hoff, Alinne Mizukawa, Roberta Vallero y Michael Hannemann. A mis quince números, entre ellos a Aurélie “I” Robin, Ramón “VI” Muñoz, João “VIII” Távora, Maria Pau “XI” Serra, María del Mar “XII” Olmo y Ana Cristina “XIV” Soler. A Roser Chaler y Dori Fanjul por sus reprimendas y continua asistencia en el pabellón de masas. Y a todos los que me he dejado.

No puedo olvidarme de incluir unas palabras para las personas que han estado más próximas a mí durante todo este tiempo. A mis padres y abuelos por su apoyo incondicional durante esta larga travesía. A mis hermanos Sergio y Raquel por aguantar mis quejas, mis bromas (a veces pesadas), alegrarme el día al llegar a casa y echarme una mano de vez en cuando cuando más lo necesitaba. A Giselle Santín, cuya falta de emoción, pragmatismo y calculadora lógica no impiden que sea una gran amiga en toda clase de situación, y que además es la culpable de que esté hoy aquí escribiendo esto. A Jennifer Valle, mí paciente Mefisto, con quien comparto

demasiados momentos absurdos, macabros y tremendamente divertidos en nuestra sempiterna búsqueda de frío, lluvia, tranquilidad y sinsentido, y con quien espero compartir muchos más. Y a Yana Hollenfeltz, la Señora del Norte, quien me acogió en Käl aquel invierno, quien tantas cosas me ha enseñado sobre mí y con quien tantos buenos momentos he compartido estos últimos años.

También quiero agradecerle al Lobo Blanco, a los Cuervos en el frío norte, al Jardinero de las Flores del Mal, a Schwammerl y sus *lieder*, al Augusto estoico, al Ermitaño de Sils Maria, y al creciente Caos que repta hacia mí con una sonrisa por todos aquellos largos ratos de entretenimiento e introspección proporcionados durante la realización de este trabajo.

¡Gracias a todos!

Resumen

En esta Tesis Doctoral se presentan los resultados de once estudios sobre la presencia, distribución y efectos de los productos de cuidado personal (PCPs) en el medio ambiente, con el objetivo de dar una visión consolidada y ampliar el conocimiento en el tema. A lo largo de esta memoria se presentan los resultados y conclusiones derivadas del estudio de aguas superficiales y residuales, sedimentos y biota.

Se discute el efecto de las actividades humanas y la densidad poblacional como origen de la contaminación. Las emisiones de aguas residuales constituyen la principal entrada de estos contaminantes al medio natural, ya que los resultados demuestran que la eliminación de los PCPs en las plantas de tratamiento de aguas residuales en (EDARs) es incompleta. Debido a las características fisicoquímicas de estas sustancias, gran parte de los PCPs pueden quedar adsorbidos en los lodos de las EDARs. El tratamiento de esos lodos contaminados con la ayuda del hongo *Trametes versicolor* se discute como un tratamiento respetuoso con el medio ambiente y económico.

La bioacumulación de PCPs, es decir, su presencia en tejido vivo, se analiza en peces, huevos de aves y muestras de origen humano. Los resultados de todos estos estudios sugieren que los contaminantes son metabolizados en el hígado y los metabolitos formados son parcialmente excretados y en parte retenidos en los diferentes tejidos del organismo. Se presentan también varios estudios que investigan el potencial de biomagnificación de los PCPs a través de la cadena trófica y la transferencia madre – feto y madre – neonato.

Además de la presencia y destino de los PCPs también es interesante conocer si ello puede representar una amenaza para los ecosistemas acuáticos. Para investigar dicho tema, se ha incluido un estudio de ecotoxicidad de estos compuestos individualmente y en mezclas binarias mediante bioensayos estandarizados con diferentes organismos acuáticos. De los resultados obtenidos de estos estudios, se puede concluir que las concentraciones de PCPs observadas en los estudios llevados a cabo en el marco de esta Tesis no suponen un riesgo para el medio ambiente en la mayor parte de los casos.

Palabras clave: aguas residuales; aguas superficiales; bioacumulación; cromatografía de líquidos; ecotoxicidad; EDAR; eliminación; espectrometría de masas; matriz biológica; matriz humana; productos de cuidado personal; riesgo ambiental; sedimento.

Abstract

In this PhD. Thesis the results of eleven studies about the presence, distribution, and effects of personal care products (PCPs) in the environment are presented with the intention of giving a consolidated vision and to expand the knowledge about the subject. Through this document, the results and conclusions derived from the analysis of surface waters and wastewaters, sediments, and biota are presented.

The effects of human activities and population density as the pollution source are discussed. Wastewater emissions to the environment constitute the main pathway for these compounds to enter the natural environment, given that the results reported demonstrate the incomplete removal of PCPs in wastewaters treatment plants (WWTPs). Due to the substances' physico-chemical properties, a large number of PCPs can be retained in the sludge of the WWTPs. The treatment of these polluted sludges with the fungus *Trametes versicolor* is discussed as an alternative low-cost treatment respectful with the environment.

The bioaccumulation, or presence, of PCPs in biological tissues is analysed in fish, bird eggs and samples of human origin. The results from the included studies suggest that these pollutants are metabolised in the liver, and the newly formed metabolites are partially excreted and partially retained in the different living tissues of the organisms. The potential PCPs' biomagnification through the food web, and mother – foetus and mother – newborn transfer of these pollutants are shown through the discussed studies.

Additionally to the occurrence and fate of PCPs, a special focus is placed upon the potential risk that these compounds might pose to the aquatic ecosystems. In order to investigate this subject, an ecotoxicity study through standardised bioassays for aquatic organisms consisting of single and binary substance mixtures has been included. From the obtained results, it is safe to conclude that the observed PCPs' concentrations in the discussed studies included within this PhD Thesis framework do not pose a major risk to the environment in most cases.

Keywords: bioaccumulation; biological matrix; ecotoxicity; environmental risk; human matrix; liquid chromatography; mass spectrometry; personal care products; removal; sediment; surface waters; wastewaters; WWTP.

Prefacio

Objetivos Generales

Esta Tesis Doctoral aporta una visión amplia y consolidada del conocimiento existente sobre la presencia, destino y efectos de los productos de cuidado personal (PCPs) en el medio ambiente. Se pretende evaluar el impacto ambiental de estos compuestos en los ecosistemas acuáticos y conectarlo con la dimensión humana.

Para llevar a cabo esta tarea fue necesario el desarrollo de nuevas metodologías de análisis químico altamente sensible y selectivo para la determinación de estos compuestos y sus productos de transformación en una gran variedad de matrices. Estas metodologías están basadas en la aplicación de la cromatografía de líquidos de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS). Ello permitió la caracterización de estos compuestos en muestras de agua superficial, aguas residuales, sedimentos, peces, huevos de aves, e incluso matrices humanas, en concreto, placenta y leche materna.

La introducción de estos compuestos en el medio ambiente a través de las estaciones de tratamiento de aguas residuales (EDARs) debido a su incompleta eliminación, se estudia con el fin de conocer la relativa efectividad de los procesos involucrados en los tratamientos y su correlación con los diferentes PCPs. Se discute también el uso del hongo *Trametes versicolor* para el tratamiento de los lodos que contienen estos compuestos adsorbidos. Esta eliminación es importante ya que la utilización de lodos de EDAR como fertilizante en agricultura es una práctica habitual extendida en todo el mundo.

Por otra parte, la caracterización del riesgo ambiental de los PCPs es otra de los temas centrales de esta Tesis Doctoral. Se amplía el conocimiento existente sobre los posibles efectos ecotóxicos que estos compuestos presentan individualmente y en mezclas binarias para el estudio de los posibles efectos sinérgicos y antagónicos que pueden tener lugar en el medio ambiente puesto que generalmente las aguas contienen un cóctel de contaminantes. Así mismo, se explora la interacción de los PCPs con algunos nanomateriales metálicos y orgánicos. Este tipo de nanomateriales se encuentran cada vez más frecuentemente en productos de uso cotidiano gracias al gran avance y expansión de la nanociencia en un gran número de campos como la biomedicina, la cosmética y la electrónica, entre otros. Finalmente, a partir de las concentraciones ambientales determinadas en estos estudios y de los datos de ecotoxicidad estimados en esta

Tesis, se evalúa y discute el riesgo potencial que la presencia de los PCPs en los niveles actuales representa para el ecosistema acuático.

Estructura

Esta Memoria de Tesis se estructura en cinco capítulos. El Capítulo I incluye una discusión sobre el estado del arte en el tema. Se ponen en contexto el ecosistema acuático, los PCPs, los riesgos que comportan y la legislación vigente que los regula. También se introducen y describen los compuestos estudiados en el marco de la presente Tesis Doctoral.

Los siguientes tres capítulos se centran en el trabajo de investigación realizado. Todos presentan una pequeña introducción sobre el tema en cuestión y los objetivos específicos. Al ser una Tesis por compendio de publicaciones, cada capítulo incluye los estudios publicados, así como una discusión y ampliación de lo que en ellos se presenta.

El Capítulo II recoge los estudios de presencia y distribución de los PCPs en el medio acuático. El Capítulo III engloba aquellos estudios relacionados con la presencia de los PCPs en las aguas residuales y su eliminación. Además, se discuten los efectos ecotóxicos observados, así como las estimaciones del riesgo ambiental en diferentes escenarios. El Capítulo IV incorpora la dimensión correspondiente a los seres vivos, incluyendo los trabajos realizados con muestras biológicas (tanto en peces y aves como en muestras humanas), y se discute su metabolización, bioacumulación y transferencia.

Para finalizar, el Capítulo V recoge brevemente las conclusiones globales de esta Tesis. Seguidamente, se incluyen la bibliografía consultada y los anexos, donde se aporta la relación de los trabajos incluidos en esta memoria, así como todas aquellas publicaciones relacionadas con la presente Tesis, pero que no han podido ser incluidos en la memoria de la misma.

Los estudios publicados en revistas científicas que forman parte de la memoria de esta Tesis Doctoral son, ordenadas por capítulo, las siguientes:

Capítulo II: Presencia y distribución en el medio

D. Molins-Delgado, J. Távora, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, "UV filters and benzotriazoles in urban aquatic ecosystems: the footprint of daily use products," *Science of the Total Environment*, vol. 601 – 602, pp. 975-986, 2017.

D. Molins-Delgado, D. García-Sillero, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, "Development of a new on-line SPE-HPLC-(APPI)-MS/MS method for the determination of insect repellents in European rivers," *Journal of Chromatography A* (enviado).

A. Mizukawa, D. Molins-Delgado; J.C. Rodrigues Azevedo; C.V. Scapulatempo Fernandes; M.S. Díaz-Cruz; D. Barceló, "Sediments as a sink for UV filters and benzotriazoles: The case study of Upper Iguaçú watershed, Curitiba (Brazil)," *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 24, pp. 18284-18294, 2017.

Capítulo III: Eliminación, efectos y riesgo

D. Molins-Delgado, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, "Removal of polar UV Stabilizers in biological wastewater treatments and ecotoxicological implications," *Chemosphere*, vol. 119, pp. S51-S57, 2015.

D. Molins-Delgado, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, "Ecological risk assessment associated to the removal of endocrine-disrupting parabens and benzophenone-4 in wastewater treatment," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 310, pp. 143-151, 2016.

C.E. Rodríguez-Rodríguez, D. Lucas, E. Barón, P. Gago-Ferrero, D. Molins-Delgado, S. Rodríguez-Mozaz, E. Eljarrat, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, G. Caminal, T. Vicent, "Re-inoculation strategies enhance the degradation of emerging pollutants in fungal bioaugmentation of sewage sludge," *Bioresource Technology*, vol. 168, pp.180-189, 2014.

D. Molins-Delgado, P. Gago-Ferrero, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, "Single and joint ecotoxicity data estimation of organic UV filters and nanomaterials toward selected aquatic organisms. Urban groundwater risk assessment," *Environmental Research*, vol.145, pp.126-134, 2016.

Capítulo IV: Presencia en biota y humanos

D. Molins-Delgado, R. Muñoz, S. Nogueira, M.B. Alonso, J.P. Torres, O. Malm, R.L. Ziolli, R.A. Hauser-Davis, E. Eljarrat, D. Barceló, M.S. Díaz-Cruz, "Occurrence of organic UV filters and metabolites in lebranche mullet (*Mugil liza*) from Brazil," *Science of the Total Environment* (enviado).

D. Molins-Delgado, M. Máñez, A. Andreu, F. Hiraldo, E. Eljarrat, M. S. Díaz-Cruz, D. Barceló, "A potential new threat to wild life: presence of UV filters in bird eggs from a preserved area" *Environmental Science and Technology* (en prensa) DOI: 10.1021/acs.est.7b03300.

D. Molins-Delgado, M.M. Olmo-Campos, G. Valeta-Juan, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, "Determination of UV filters in human breast milk using turbulent flow chromatography and babies' daily intake estimation," *Environmental Research* (enviado).

J. Valle-Sistac, D. Molins-Delgado, M. Díaz, L. Ibáñez, D. Barceló, M.S. Díaz-Cruz, "Determination of parabens and benzophenone-type UV filters in human placenta. First determination of the existence of benzylparaben and benzophenone-4," *Environment International*, vol. 88, pp. 243-249, 2016.

Además, en el Anexo IV se incluye la información adicional de cada uno de estos trabajos.

Tabla de Contenidos

Listado de tablas y figuras.....	I
Tablas.....	I
Figuras.....	I
Listado de acrónimos.....	II
Capítulo I: Introducción.....	1
1.1 El medio acuático.....	3
1.2 La actividad antropogénica como la principal amenaza para el medio acuático.....	4
1.2.1 Comportamiento de los contaminantes orgánicos en la biota acuática.....	6
1.3 Productos de cuidado personal.....	9
1.3.1 Biocidas.....	10
1.3.2 Conservantes.....	11
1.3.3 Fragancias.....	11
1.3.4 Repelentes de insectos.....	12
1.3.5 Filtros UV orgánicos.....	12
1.3.6 Nanomateriales.....	13
1.4 Efectos de los productos de cuidado personal en biota y en la salud humana.....	15
1.4.1 Efectos adversos sobre la biota.....	15
1.4.2 Presencia y efectos sobre la salud humana.....	16
1.4.3 PCPs como disruptores endocrinos.....	18
1.4.4 Toxicidad de los PCPs en biota y su uso en estimaciones de riesgo ambiental....	19
1.5 Marco legislativo.....	22
1.5.1 Marco europeo.....	22
1.5.2 Marco internacional no europeo.....	23
1.6 Compuestos considerados en esta Tesis.....	24
Capítulo II: Presencia y distribución en el medio.....	31
2.1 Introducción.....	33
2.1.1 Objetivos.....	33
2.1.2 Estructura.....	34
Publicación N° 1.....	35
Publicación N° 2.....	49
Publicación N° 3.....	71

2.2	Discusión	83
2.2.1	Metodologías analíticas	83
2.2.2	PCPs en aguas superficiales	85
2.2.3	PCPs en sedimentos y particulado en suspensión	91
2.2.4	Distribución y focos de contaminación	95
2.3	Conclusiones	97
Capítulo III: Eliminación, efectos y riesgo		99
3.1	Introducción	101
3.1.1	Objetivos	102
3.1.2	Estructura.....	102
	Publicación N°4.....	105
	Publicación N° 5.....	113
	Publicación N° 6.....	123
	Publicación N° 7.....	135
3.2	Discusión.....	145
3.2.1	Metodologías analíticas	145
3.2.2	Eliminación.....	146
3.2.3	Emisiones al medio acuático a través de la descarga de efluentes de las EDARs ...	150
3.2.4	Biodegradación de PCPs en lodos de EDAR mediante Trametes versicolor	152
3.2.5	Ecotoxicología de los PCPs	155
3.2.6	Mezclas binarias	158
3.2.7	Estimación del riesgo ambiental.....	162
3.3	Conclusiones	169
Capítulo IV: Presencia en biota y humanos		173
4.1	Introducción	175
4.1.1	Objetivos	175
4.1.2	Estructura.....	176
	Publicación N° 8.....	177
	Publicación N° 9.....	195
	Publicación N° 10.....	205
	Publicación N° 11.....	225
4.2	Discusión.....	233

4.2.1 Metodologías analíticas	233
4.2.2 Bioacumulación de PCPs en tejidos de Mugil liza.....	235
4.2.3 Bioacumulación de PCPs en huevos de aves	240
4.2.4 Presencia de PCPs en matrices humanas	243
4.3 Conclusiones	248
Capítulo V. Conclusiones globales	251
5.1 Conclusiones	253
Referencias.....	257
Anexos.....	275
Anexo I. Listado de publicaciones	277
Anexo II. Listado de participación en congresos	279
Anexo III. Otras publicaciones (no incluidas en el cuerpo de la Memoria de Tesis).....	281
Publicación N° A1	281
Publicación N° A2	317
Anexo IV. Información adicional de las publicaciones.....	329
Información adicional - publicación N° 1	329
Información adicional - publicación N° 2.....	343
Información adicional - publicación N° 3.....	355
Información adicional - publicación N°4.....	357
Información adicional - publicación N° 5.....	363
Información adicional - publicación N° 8.....	369
Información adicional - publicación N° 9.....	381
Información adicional - publicación N° 10.....	399



Listado de tablas y figuras

Tablas

Tabla 1. Niveles ambientales de PCPs.....	13
Tabla 2. Concentraciones de PCPs en matrices humanas	17
Tabla 3. Concentraciones de toxicidad de PCPs.	20
Tabla 4. Compuestos considerados en esta Tesis junto a su estructura, sus propiedades fisicoquímicas más relevantes y su categoría.....	26
Tabla 5. Concentraciones máximas y mínimas de PCPs en muestras de agua superficial.....	88
Tabla 6. Concentraciones máximas y mínimas de PCPs en sedimentos.....	93
Tabla 7. Concentraciones de UV-Fs en lodo de EDAR del Prat de Llobregat.....	153
Tabla 8. Valores de EC ₅₀ determinados. En negrita, el valor de ecotoxicidad de referencia del test según las especificaciones del mismo.	157
Tabla 9. Resultados de las mezclas binarias de la Publicación N° 7	160

Figuras

Figura 1. Vías de entrada de los contaminantes al medio ambiente.	7
Figura 2. Procesos y distribución de los PCPs en el medio acuático.	96
Figura 3. Concentraciones de PCPs en aguas residuales de las publicaciones incluidas en la presente Tesis. (a) Influyente; (b) Efluente. Se muestran aquellos compuestos presentes en cada matriz	147
Figura 4. Eliminación (%) de PCPs en EDARs.	149
Figura 5. Cantidades de los contaminantes emitidas anualmente por habitante a través del efluente en las depuradoras de Cataluña.	151
Figura 6. Coeficientes de riesgo (HQ) en aguas superficiales para UV-Fs y biocidas (Publicación N° 1): a) toxicidad aguda, b) toxicidad crónica.....	164
Figura 7. Coeficientes de riesgo (Log HQ) en aguas superficiales para IRs (Publicación N° 2): a) toxicidad aguda, b) toxicidad crónica.....	165
Figura 8. Coeficientes de riesgo (Log HQ) en aguas subterráneas para UV-Fs (Publicación N° 7).....	166
Figura 9. Coeficientes de riesgo (Log HQ) de UV-Fs, biocidas y conservantes en influentes (Publicaciones N° 1, 4 y 5): a) toxicidad aguda, b) toxicidad crónica.	167
Figura 10. Coeficientes de riesgo (Log HQ) de UV-Fs, biocidas y conservantes en efluentes (Publicaciones N° 1, 4 y 5): a) toxicidad aguda, b) toxicidad crónica.	168
Figura 11. Concentración de UV-Fs en Mugil liza.....	238
Figura 12. Concentraciones totales de UV-Fs en tejidos de Mugil liza.....	238
Figura 13. Concentraciones medias de UV-Fs en huevos de distintas especies de aves.	242
Figura 14. Concentraciones de PCPs en placenta humana.....	247

Listado de acrónimos

4DHB	4,4'-dihidroxi-benzofenona
4HB	4-hidroxi-benzofenona
4MBC	4-metilbencilideno-alcanfor
ADBI	Celestolide
AHMI	Phantolide
AHTN	Tonalide
AllyIBZT	2-(2H-benzotriazol-2-il)-4-metil-6-(2-propelil)fenol
APPI	Fotoionización a presión atmosférica
ATII	Traseolide
BP1	Benzofenona 1
BP2	Benzofenona 2
BP3	Benzofenona 3, oxybenzona
BP4	Benzofenona 4
BP8	Benzofenona 8
BuPB	Butil parabeno
bw	Peso corporal
BzPB	Bencil parabeno
BZT	1-H-benzotriazol
DEET	N, N-dietil-m-toluamida
DHMB	Dihidroxi metoxi-benzofenona
DMeBZT	Dimetil benzotriazol
DPMI	Cashmeran o madera de cachemira

dw	Peso seco
EC ₅₀	Concentración efectiva media
ECHA	Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas
EDAR	Estación depuradora de aguas residuales
EHMC	Etilhexil metoxicinamato
ERA	Evaluación del riesgo ambiental
ESI	Ionización mediante electrospray
EtPABA	Etil <i>p</i> -aminobenzoato
EtPB	Etil parabeno
HePB	Heptil parabeno
HHCB	Galaxolide
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficacia
INCI	Nomenclatura internacional de ingredientes cosméticos
IRs	Repelentes de insectos
K _{oc}	Coeficiente de partición suelo – agua
K _{ow}	Coeficiente de partición octanol – agua
LC ₅₀	Concentración letal media
lw	Peso lipídico
MeBZT	Metil-1-H- benzotriazol
MePB	Metil parabeno
MGK-264	N-Octil dicarboxamida piperonilo
MK	Cetona de almízcle
MS	Espectrometría de masas

MWCNT	Nanotubos multicapa
MX	Xileno de almízcle
NOEC	Concentración sin efecto observado
OC	Octocrileno
ODPABA	Etilhexil dimetil-p-aminobenzoato
OTNE	Amberona
PBO	Butóxido de piperonilo
PCPs	Productos de cuidado personal
PK _a	Constante de disociación ácida
PLE	Extracción mediante líquidos presurizados
PNEC	Concentración sin efecto prevista
PrPB	Propil parabeno
QqLIT	Cuadrupolo-trampa de iones lineal
QqQ	Triple cuadrupolo
REACH	Reglamento 1907/2006/EC
SPE	Extracción en fase sólida
TBHPBT	2-(5-tert-Butil-2-hidroxifenil)benzotriazol
TCS	Triclosan
TCC	Triclocarban
TFC	Cromatografía de flujo turbulento
THB	Trihidroxi benzofenona
USE	Extracción asistida por ultrasonidos
UV-Fs	Filtros UV

UVP	2-(2'-Hidroxi-5'-metilfenil)benzotriazol
UV234	2-(2H-Benzotriazol-2-il)-4,6-bis(1-metil-1-feniletil)fenol
UV320	2-(2'-Hidroxi-3',5'-di-tert-butilfenil)benzotriazol
UV326	2-tert-Butil-6-(5-cloro-2H-benzotriazol-2-il)-4-metilfenol
UV328	2-(2H-Benzotriazol-2-il)-4,6-ditertpentilfenol
UV329	2-(2-H-Benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenol
WFD	Directiva marco del agua
ww	Peso húmedo

Capítulo I

Introducción

1.1 El medio acuático

El medio acuático es un sistema y un recurso, y así como la calidad del aire y del suelo son preocupaciones inmediatas para nuestra sociedad, debemos asegurarnos de que nuestra interacción diaria con las aguas, ya sea doméstica, agrícola o industrial, no ponga en compromiso su calidad. El agua es vital para los organismos vivos y los ecosistemas de la cual dependen, además de ser un recurso esencial para todo tipo de actividades económicas. A través de la historia, la relación entre la civilización humana y este recurso ha sido muy estrecha: la antigua Mesopotamia creció alrededor de la cuenca de los ríos Tigris y Éufrates, el antiguo Egipto se vertebró alrededor del Nilo, los romanos construyeron extensas redes de acueductos para abastecer de agua las ciudades y el comercio depende de ríos navegables, canales, mares y océanos.

La humanidad no sólo requiere agua para subsistir o para transportar mercancías, sino que también la usa como medio recreativo, como fuente de energía y como sustento para mantener la producción agrícola e industrial. Administrar bien este recurso es crítico y requiere de las políticas adecuadas para asegurar y proteger la viabilidad de las actividades humanas y la sostenibilidad de los recursos medioambientales. Al fin y al cabo, el agua no es un bien comercial, es un bien común a toda la humanidad que hemos de proteger, defender y cuya importancia hemos de reconocer [1].

El agua cubre más del 70 % de la superficie de la Tierra. Sobre las masas de tierra aparece en forma de ríos, riachuelos, corrientes, lagos y humedales, mientras que en la cercanía de los continentes varía desde mares poco profundos, estuarios, lagunas y bahías hasta océanos. Puesto que la vida depende del agua para subsistir, las masas de agua y su disponibilidad constituyen un factor central en todos los hábitats. Si consideramos los lugares habitables de nuestro planeta, y el volumen total de agua que albergan, el medio acuático comprende cerca del 99 % del hábitat terrestre, siendo en su mayoría las vastas columnas de agua en los mares y océanos, cuyos secretos son en mayor grado desconocidos para nuestra especie.

Existe una creciente preocupación acerca de la capacidad de las acciones humanas para acelerar el cambio climático. Puesto que los climas terrestres están en cambio constante, sólo la magnitud del cambio varía con el tiempo. Mientras la temperatura, magnitud fácil de monitorizar, de la tierra y el aire pueden variar dramáticamente, la temperatura de la superficie del mar cambia sutilmente, principalmente debido al gran volumen de agua y su gran calor latente, confiriendo a las masas

de agua un gran efecto amortiguador frente a los cambios de temperatura. Cuando las temperaturas globales aumentan, el deshielo de los polos y la expansión térmica del agua eleva el nivel del mar, causando otros cambios en el medio ambiente. Un ejemplo de cómo las alteraciones en el medio oceánico pueden afectar fuertemente el clima sería el caso de la corriente del Golfo. Un debilitamiento de dicha corriente podría alterar los patrones de lluvia a nivel global.

La población humana se concentra densamente alrededor de los recursos hídricos, especialmente alrededor de ríos, estuarios y bahías, transformándolos en centros de intensa actividad social y económica. Nuestras actividades son capaces de afectar el ecosistema acuático a través de la eliminación de biomasa, la transformación de hábitats y la introducción de toda clase de elementos originalmente foráneos en el medio. La distribución de los recursos hídricos y de la población no es homogénea, y como resultado la demanda de agua dulce en algunas regiones supera la disponibilidad de ésta en regiones que representan más del 40 % de la población [2]. Adicionalmente, el 70 % del agua dulce es usada en labores de irrigación, representando más del 95 % del suministro de agua explotado [3]. La contaminación originada por los vertidos de aguas residuales, la agricultura y las actividades industriales perturban enormemente el medio acuático, y es necesario llegar a comprender la respuesta ecológica de los organismos acuáticos a este impacto, al fin de poder proteger este preciado y vital recurso.

1.2 La actividad antropogénica como la principal amenaza para el medio acuático

El auge de la industrialización y el rápido crecimiento de la población urbana introdujeron un cambio al paradigma social, transformando un planeta predominantemente rural en uno urbano [4]. Esto trajo consigo un incremento de los desechos de origen industrial y municipal en forma de residuos sólidos y aguas residuales [5]. Ello ha conllevado a que se desarrollen nuevos compuestos químicos para mejorar nuestra calidad de vida y aumentar la productividad de las explotaciones agrícolas, ganaderas y forestales [5, 6, 7].

La calidad química y ecológica del medio acuático depende de procesos naturales y antropogénicos [8]. Problemas como la eutrofización del medio marino, anoxia de las masas de agua, pérdida de biodiversidad, bioabsorción de contaminantes y su posterior bioacumulación (acumulación de contaminantes en tejidos vivos) en organismos vivos han sido ya descritos a nivel global [9, 10]. Cabe la posibilidad de que cambios en los patrones climáticos pudieran magnificar dichos efectos.

Conocida esta problemática, es necesario identificar las fuentes de contaminación. Cuando hablamos de fuentes de contaminación, debemos diferenciar primero entre una fuente discreta de contaminación y una fuente difusa. Los contaminantes provenientes de focos discretos son aquellos cuyo origen es una fuente concreta e identificada y cuya contribución al medio ambiente puede ser medida a través de los residuos químicos hallados en el agua, el sedimento, la biota, y/o a través de otros factores como las incidencias de morbilidad y mortalidad [11]. Las plantas de tratamiento de aguas, la explotación de recursos naturales a través de la minería y la silvicultura y los vertederos son ejemplos de fuentes discretas de contaminación, siendo las plantas de tratamiento de aguas residuales (EDARs) la principal fuente de contaminación de las aguas dulces [12]. La cantidad de aguas residuales generadas ha crecido en paralelo con la expansión urbana y económica [13, 14], y se espera que éstas sigan creciendo [3].

Existe una constante generación de nuevos productos químicos, y por consiguiente de contaminantes potenciales cuyos efectos a corto, medio y largo plazo para los organismos expuestos, incluyendo humanos, son todavía desconocidos. Además, en la mayoría de casos, la ausencia de esta información inhibe la actuación de las autoridades competentes en la materia, para desarrollar regulaciones estableciendo límites máximos permisibles o prohibiciones de uso y presencia tanto en bienes comerciales como en el medio ambiente. La continua descarga al medio ambiente de estos compuestos químicos, su presencia y su persistencia son factores de preocupación creciente [15]. Una mayor demanda de agua por parte de la población implica un incremento en la cantidad de aguas residuales generadas. En lugares donde los recursos hídricos naturales escaseen las aguas residuales regeneradas son una alternativa viable por reutilización por ejemplo en riego agrícola o de jardines. Esta práctica ya es habitual no sólo en regiones áridas y semiáridas, sino también en gran cantidad de países europeos, donde muchos agricultores de pequeña escala en áreas y periferias urbanas dependen de las aguas residuales tratadas para regar sus cultivos [16, 17]. Todo ello implica un mayor riesgo de que los contaminantes presentes en las aguas regeneradas debido a su incompleta eliminación en las EDARs lleguen hasta los acuíferos [18, 19], y además conlleva que los contaminantes más persistentes puedan ser adsorbidos por las plantas, y así ser reintroducidos en la cadena trófica, llegando, en última instancia, a afectar a los humanos.

En cuanto a las fuentes de contaminación difusa el abuso en el uso de compuestos químicos en bienes de consumo diario, junto a las recalificaciones del terreno y la gestión de las actividades que allí se llevan a cabo pueden alterar el ciclo hidrológico pudiendo llevar a vertidos de origen urbano o agrícola y a la remobilización de contaminantes adsorbidos en suelos y sedimentos durante episodios de fuertes tormentas e inundaciones [20, 21, 22, 23, 24], lo que conlleva el

empeoramiento de la calidad de las aguas receptoras [25]. Hay que tener en cuenta, no obstante, que las diferencias entre fuentes discretas y difusas son difíciles de establecer [26].

Los contaminantes polares, aquellos con una separación de cargas eléctricas a lo largo de la estructura de una misma molécula, permanecerán normalmente disueltos en el agua, por lo que su movilidad en el medio ambiente es mayor. Además, tienen poca tendencia a bioacumularse en organismos vivos si la exposición a éstos no es crónica. En áreas donde existe una presencia continua de compuestos polares, pueden llegar a ser un componente común de los influentes de las EDARs. Por otro lado, aquellos compuestos medianamente polares o apolares tienden a asociarse en mayor grado al material particulado en suspensión o a acumularse en el sedimento, lo que transforma a este último en el repositorio ambiental para todo tipo de contaminantes.

Llegados a este punto, los contaminantes se distribuyen entre las distintas fases (sedimento, particulado, agua y biota) y, dependiendo de sus características fisicoquímicas, pueden ser movilizados o desmovilizados desde las fases implicadas. El movimiento de contaminantes entre las fases puede incrementar la biodisponibilidad de éstos, propiciando procesos de bioacumulación en organismos vivos [27]. Los contaminantes tóxicos, aquellos que pueden causar efectos adversos sobre la salud de un organismo, pueden llegar a perder su potencial nocivo por medio de la acción microbiana o por procesos de degradación química y/o fotolítica tanto en el medio acuoso como en el sedimento. No obstante, en determinados casos estos procesos pueden incrementar la peligrosidad de un compuesto tóxico al aumentar su biodisponibilidad en el medio [26]. La principal ruta de exposición a compuestos lipofílicos, aquellos con afinidad a las fases lipídicas, para biota es a través de la dieta, y en el caso de los seres humanos también lo es la aplicación directa sobre la piel.

En la Figura 1 se resume el recorrido de los contaminantes desde su origen hasta su destino final en el medio ambiente.

1.2.1 Comportamiento de los contaminantes orgánicos en la biota acuática

Entre los distintos grupos de contaminantes existentes, los contaminantes emergentes, incluyendo los productos de cuidado personal (PCPs), son sustancias mayoritariamente nuevas que han sido liberadas al medio ambiente durante las últimas décadas debido a los cambios socioeconómicos y que, hasta tiempos recientes, no han sido reconocidos como tales. Estos compuestos pueden suponer un riesgo potencial para el medio acuático debido a las grandes cantidades que son vertidas al medio ambiente diariamente y su generalmente baja biodegradabilidad. Su estudio y control no están incluidos en las diferentes legislaciones

ambientales vigentes en la actualidad, su destino es, en muchos casos, desconocido y sus efectos apenas estudiados [28].

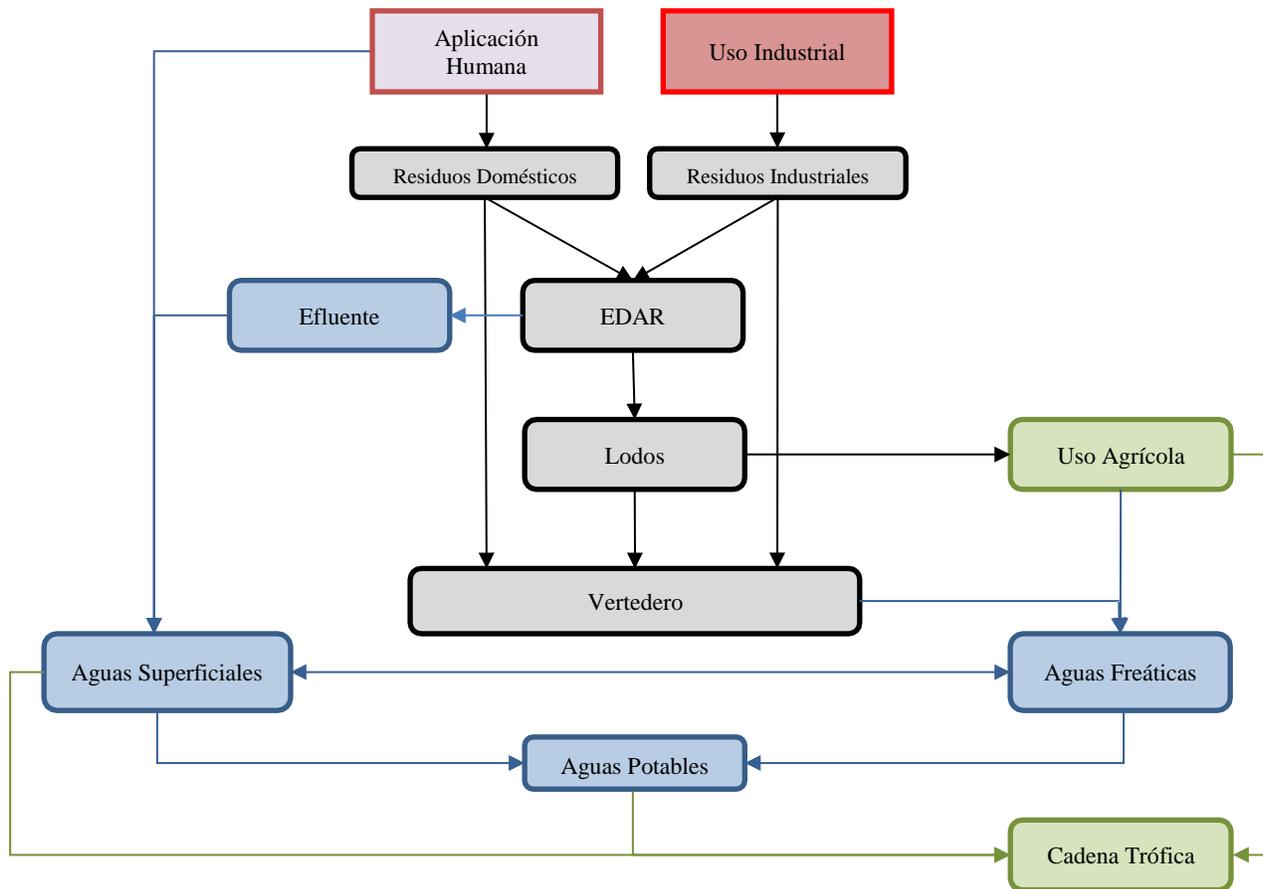


Figura 1. Vías de entrada de los contaminantes al medio ambiente.

No obstante, la dispersión de la humanidad sobre la Tierra ha producido una serie de perturbaciones en el ecosistema acuático cuyas consecuencias son difíciles de estimar [29]. Una de estas perturbaciones es el continuo vertido de contaminantes al medio acuático. La presencia de compuestos xenobióticos, aquellos sintetizados por los seres humanos, en el ecosistema no implica necesariamente un riesgo por sí mismo, puesto que desde su presencia en el medio hasta la aparición de efectos adversos en el ecosistema transcurre un tiempo más o menos significativo dependiendo de las concentraciones y de las propiedades fisicoquímicas de los contaminantes en el cual se establecen los procesos de retención, transformación y bioacumulación [30]. Algunas de las sustancias liberadas al medio ambiente no son solo hidrofílicas, esto es con tendencia a permanecer en la fase acuosa, sino también lipofílicas, y pueden degradarse mediante procesos metabólicos. La transformación de estos compuestos a través de rutas metabólicas puede conllevar una alteración de la lipoficidad de los contaminantes, pudiendo llevar a su rápida eliminación del organismo haciendo que su destino y su ratio de acumulación en los

tejidos vivos sean muy difíciles de determinar [31, 32]. Adicionalmente, las variaciones de temperatura en el medio pueden alterar los procesos de degradación y de distribución de los contaminantes entre las distintas fases, pudiendo incrementar la disponibilidad de éstos [33].

El término bioacumulación se puede definir de diversas maneras. Así, lo encontramos especificado como la absorción total de una sustancia desde el ambiente, o su acumulación en el tiempo, o la retención de dicha sustancia en los tejidos vivos [31]. A pesar de todas estas definiciones, el fenómeno en si puede calcularse como la ratio de la sustancia absorbida por el organismo vivo y la cantidad de la misma que se encuentra en el ambiente en el cual vive [34]. Para poder evaluar este proceso, una determinación rigurosa de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos orgánicos es esencial para predecir y entender su hidrofobicidad, y por ende su potencial de bioacumulación. Esto se puede llevar a cabo mediante la determinación de los coeficientes de partición octanol-agua (K_{ow}), aunque su cálculo puede verse condicionado a la disponibilidad de información sobre las propiedades fisicoquímicas de los contaminantes [35]. Por consiguiente, la creación de modelos que estimen el potencial de bioacumulación de una molécula es difícil y éstos no existen para todos los compuestos químicos [28].

Un proceso estrechamente relacionado con la bioacumulación es el de biomagnificación. Éste es el proceso por el cual una sustancia bioacumulada en un organismo es transferida de organismo a organismo, siendo la concentración del compuesto en el depredador mayor que aquella que se encuentra en la presa. La longevidad y el tamaño del organismo son factores que contribuyen a que las concentraciones de los contaminantes sean mayores cuanto más alta es la posición del organismo en la cadena trófica [36]. Este fenómeno ha sido descrito en peces para algunos compuestos persistentes, resistentes a procesos de transformación (recalcitrantes) e hidrofóbicos [37, 38].

Desde la década de los 60 del siglo veinte, la humanidad es consciente del impacto que los compuestos químicos pueden producir en los ecosistemas acuáticos y terrestres [30]. Cuando un efecto se hace evidente, el daño que el compuesto químico puede haber causado al ecosistema puede encontrarse más allá de un punto de no retorno, en el cual las acciones de remediación pueden no ser suficientes para revertir el problema. Existe una secuencia de respuestas iniciadas por el estrés que los contaminantes causan en los sistemas biológicos; los cambios se inician a nivel molecular, pasan a un nivel subcelular y se van propagando a los tejidos y a nivel orgánico, hasta que la totalidad del organismo se ve afectado. Esto puede producir cambios poblacionales que pueden conllevar a perturbaciones en todo el ecosistema, puesto que algunos contaminantes son capaces de variar los patrones conductuales de los organismos vivos [39]. Estos escenarios

han propiciado la búsqueda de los primeros indicadores de peligro que reflejan la respuesta biológica ante compuestos xenobióticos. Los biomarcadores son toda aquella sustancia utilizada como indicador del estado biológico de un organismo o del medio, y que refleja la interacción entre un ecosistema y un peligro potencial, ya sea químico, físico o biológico [40]. Por otra parte, un bioindicador es un grupo de especies de las cuales se puede extraer información relevante sobre la interacción de los organismos con el ecosistema. Un cambio en el comportamiento de un organismo o incluso su ausencia en el ecosistema pueden servir como bioindicadores de la calidad del mismo [30].

Con el fin de poder evaluar estos cambios, se seleccionan organismos altamente propagados en el ecosistema como control. Los peces son los candidatos ideales, puesto que pueden encontrarse prácticamente en todo el ecosistema acuático y llevan a cabo un papel importante como transportadores de energía desde niveles tróficos bajos a niveles altos y su continua exposición a la posible contaminación del medio [41]. Debido a ello, los peces son considerados los organismos más propicios para el estudio de la contaminación en el agua.

Los organismos más grandes y longevos tienden a mostrar concentraciones mayores de contaminantes que los más pequeños y efímeros; no obstante, la estimación de los procesos de bioacumulación y biomagnificación se ve dificultada por la cantidad de parámetros que la afectan, como lo son la lipofilicidad de la sustancia, la degradación y/o transformación de los compuestos químicos, o la gran variabilidad de organismos que se puede presentar en la cadena trófica, todo ello dificultando la predicción de los efectos de los contaminantes a través de modelos matemáticos o mediante determinaciones experimentales [42].

1.3 Productos de cuidado personal

El término PCP describe un amplio grupo de compuestos químicos incluidos en una gran diversidad de productos extensamente usados en el día a día. Se encuentran presentes en productos tales como pastas de dientes, champús, cosméticos y detergentes, aunque su uso se extiende también a otros ámbitos como lo son la producción de plásticos, la industria textil y la industria alimentaria entre otras. En el año 2015 el mercado de los PCPs movía un capital de 465.000 millones de dólares en todo el mundo, y se espera que siga creciendo hasta los 500.000 millones de dólares para el año 2020 [43].

Tras su aplicación, estos compuestos pueden ser absorbidos a través de la piel, para posteriormente ser excretados, o simplemente eliminados de la piel por la acción del agua de lavado [44]. Los PCPs y sus metabolitos llegan en las aguas residuales urbanas hasta las EDARs

[45], donde son parcialmente eliminados. Una parte de ellos, los más lipofílicos, queda retenida en los lodos de la EDAR y el resto es liberado al medio ambiente a través del efluente [46]. A lo largo de las últimas décadas, la preocupación acerca de los posibles efectos perjudiciales que estos compuestos y sus productos de transformación pueden causar sobre el ecosistema ha ido al alza [47].

Dependiendo de su función, los compuestos que conforman el grupo de los PCPs pueden ser clasificados en las diferentes categorías según su función tales como filtros UV, biocidas (antimicrobianos), conservantes, fragancias y repelentes de insectos. Por otra parte, los avances en nanotecnología comportan la introducción de nanomateriales para la realización de funciones propias de los PCPs clásicos. La nomenclatura internacional de ingredientes cosméticos (INCI) es la guía oficial para ingredientes cosméticos establecida en los años 70 del siglo XX por el “Personal Care Products Council” en los EE.UU., y desde entonces ha sido adoptado por diversos países del mundo. El uso de INCI es requisito en muchos países para la fabricación y distribución de PCPs, así mismo se requiere que cualquier compuesto comercial nuevo que se desee utilizar como ingrediente cosmético ha de ser previamente registrado en la INCI.

Las siguientes secciones consisten en una descripción de las distintas familias de compuestos que conforman los PCPs. En cada sección se mencionarán los usos, algunos de los compuestos más representativos de cada familia y se indicará su destino en el medio ambiente.

1.3.1 *Biocidas*

Los compuestos antisépticos y desinfectantes son ampliamente usados en aquellas actividades que requieren de niveles de higiene exigentes, y cuya aplicación es normalmente tópica. Entre sus usos se encuentran su aplicación como herbicidas y fungicidas. El gran uso que se hace de estos compuestos está generando preocupación debido a su posible rol como inductores de resistencia bacteriana [48].

1-H-benzotriazol (BZT) es un compuesto altamente versátil utilizado como anticorrosivo, anticongelante, refrigerante, biocida y precursor de multitud de otros compuestos [49, 50]. Su extenso uso y su limitada eliminación en las EDARs debido a su alta polaridad [51] hace que pueda ser encontrado en todo tipo de matrices acuáticas, incluida el agua potable [50]. Triclosan (TCS) y triclocarban (TCC) son agentes antimicrobianos presentes en jabones, desodorantes, pastas de dientes, cosméticos, textiles y plásticos. Fueron inicialmente desarrollados para actividades médicas, pero actualmente su rango de aplicación se ha ampliado a todo tipo de actividades. La producción mundial de triclosan era de 1.500 toneladas por año en 1998 [52],

mientras que la producción de triclocarban ascendía a las 500 toneladas por año en 2002 solo en los Estados Unidos [53]. TCS y TCC son relativamente hidrofóbicos, por lo que suelen acabar retenidos en el lodo [54] o en los sedimentos [55].

1.3.2 *Conservantes*

Los conservantes sintéticos son una amplia familia de compuestos cuya función es prevenir el crecimiento microbiano y la oxidación, y también inhibir la descomposición natural de frutos y vegetales. Algunos autores también incluyen los agentes bactericidas en este grupo. Son ampliamente utilizados en bienes comerciales tales como medicamentos, jabones, geles, cremas, comestibles, etcétera.

Los conservantes más utilizados son el grupo de los parabenos, el cual es una familia de compuestos derivados del ácido *p*-hidroxibenzoico. Estos compuestos son incoloros e inodoros y no provocan decoloración ni endurecimiento del material sobre el que se aplican. Su efectividad como antimicrobianos, junto a su bajo coste de producción, su supuestamente baja toxicidad los convierte en compuestos ubicuos en el medio ambiente. Hasta la fecha, solo unos pocos estudios han estudiado parabenos en aguas residuales y superficiales, hallando concentraciones bajas en el efluente [56, 57, 58, 59]. Estos conservantes también se han encontrado en sedimentos, en lodos de EDAR [60] y en biota [61]. Por otra parte, las evidencias experimentales actuales parecen indicar que son disruptores endocrinos [62].

1.3.3 *Fragancias*

Las fragancias son un grupo de compuestos cuya función es la de ofrecer un aroma agradable a cualquier producto siendo especialmente utilizados en PCPs. El uso de las fragancias se puede remontar a la antigüedad, para dotar de un olor agradable a personas y bienes, y consistía mayormente en extractos de aceites vegetales y animales. Estos compuestos se encuentran en aguas superficiales y freáticas localizadas cerca de EDARs, así como en los efluentes de las mismas [63]. Como las fragancias son lipofílicas, tienen tendencia a ser adsorbidas en los fangos de depuradora, sedimentos y biota [64]. Por otro lado, la exposición de los humanos a estos compuestos es elevada dado el contacto cutáneo derivado del uso que les damos.

Las nitrofragancias son un grupo de fragancias sintéticas que obtienen su aroma de la posición de los grupos nitro en su estructura. Tras su paso por las EDARs, son propensas a sufrir procesos de transformación, resultando en compuestos potencialmente más peligrosos [47, 65]. Las fragancias policíclicas fueron desarrolladas como alternativa a las nitrofragancias. Galaxolide (HHCB) y tonalide (AHTN) son los más usados. Ambos se han detectado en aguas superficiales,

aguas residuales [66, 67] y sedimentos y fangos de EDAR [68, 69]. Por otra parte, el uso de fragancias macrocíclicas está en aumento desde hace algunos años [70]. El aroma de estas moléculas es más intenso y son más degradables, pese a ello, se han encontrado en aguas residuales y fangos de EDAR [47, 70, 71]. No obstante, la ausencia de información hace difícil conocer su destino en el medio ambiente.

1.3.4 *Repelentes de insectos*

Los repelentes de insectos (IRs) son sustancias que previenen el acercamiento de los insectos a la superficie en la que se encuentran aplicados [72]. El uso de estas sustancias es crítico en zonas donde los insectos actúan de vectores para enfermedades. Son ampliamente usados en los trópicos, donde su uso puede influenciar enormemente la expansión de patógenos infecciosos [73].

Existe poca información referente a los efectos a largo plazo que estos compuestos puedan ejercer sobre el medio ambiente; no obstante se han detectado en varias matrices en todo el mundo: aguas residuales [74, 75], aguas freáticas, aguas superficiales [75, 76, 77] y agua potable [75], siendo bastante persistentes [77]. *N, N*-dietil-*m*-toluamida (DEET), formulado en los años 50 del siglo XX, es el repelente de insectos de referencia dada su acción contra un amplio espectro de insectos [77]. Se estima que solo en los EE. UU. un tercio de la población usa regularmente esta sustancia [78].

1.3.5 *Filtros UV orgánicos*

Los filtros UV (UV-Fs), también conocidos como pantallas solares, son un grupo de compuestos químicos que protegen de los efectos nocivos de la radiación solar, tales como el fotoenvejecimiento, la fotocarcinogénesis y la fotoinmunosupresión [79, 80, 81]. Su uso se ha extendido a todo tipo de campos más allá de los productos de cuidado personal; se utilizan en textiles, pinturas, pigmentos, fotografía, y en la fabricación de productos plásticos que vayan a ser expuestos al sol para prevenir procesos de fotodegradación o pérdida de color [82]. No obstante, recientemente se ha creado preocupación dado su potencial efecto de disrupción endocrina y ecotoxicológico [83, 84, 85]. Residuos de UV-Fs se han encontrado en todo tipo de matrices acuáticas [86, 87], incluyendo aguas potables [88]. Dada su amplio abanico de lipoficidades y su generalmente pobre biodegradabilidad, estos compuestos acaban retenidos en los lodos de EDAR [89], acumulados en los sedimentos [90, 91], o bioacumulados en la biota [92, 93, 94].

1.3.6 *Nanomateriales*

El uso de los nanomateriales en los productos de cuidado personal es bastante reciente y su uso bastante extendido [95]. Estas sustancias se componen normalmente de pequeñas partículas de tamaño nanométrico, lo que, dada su elevada superficie específica, les confiere una serie de propiedades que no son posibles en la macro escala [96]. El 90% de estos compuestos se usa para proteger de la radiación UV o como vectores para el suministro de vitaminas, mientras que el resto se encuentra en champús, tintes o fragancias para mejorar su efecto y penetración durante su aplicación [95].

Entre los más usados encontramos siloxanos (cadenas poliméricas de silicona) [71, 96], nanomateriales metálicos como TiO₂, ZnO [97, 96] y nano-Ag [98], y nanopartículas de carbono [96]. Hay poca información referente a su presencia en el medio ambiente, pero se sabe que están presentes en aguas superficiales [99, 100], sedimentos [101], aguas residuales [102] y lodos de EDAR [71, 102, 99]. Su potencial toxicidad ha empezado a ser estudiada recientemente, dado que debido a su tamaño son capaces de ser absorbidos a través de la piel [103].

La Tabla 1 recoge algunos de los valores de concentración de los compuestos mencionados reportados en la bibliografía. Se indica la referencia, los compuestos estudiados, su función y la matriz en la que se han estudiado.

Tabla 1. Niveles ambientales de PCPs.

Compuestos	Categoría	Matriz	Concentraciones	Referencia
BZT, MeBZT	Biocidas UV-Fs	Influyente	2,2 – 19,9 µg l ⁻¹	[50]
		Efluente	2,0 – 9,6 µg l ⁻¹	
		Agua superficial	<0,01 – 3,4 µg l ⁻¹	
		Agua freática	<0,01 µg l ⁻¹	
BZT, MeBZT	Biocidas UV-Fs ^a	Influyente	76,5 – 47.142,9 ng l ⁻¹	[51]
		Efluente	26,7 – 10.541,2 ng l ⁻¹	
TCS, TCC	Biocidas	Biosólido	10,0 – 35,0 µg g ⁻¹ dw	[54]
TCS, TCC	Biocidas	Sedimento	0,4 – 822,0 ng g ⁻¹ dw	[55]
MePB, EtPB, PrPB, BuPB, BzPB	Conservantes	Agua superficial	<0,2 – 62,0 ng l ⁻¹	[56]
		Efluente	<0,2 – 31,0 ng l ⁻¹	
MePB, EtPB, PrPB, BuPB, TCS	Conservantes Biocidas	Influyente	0,2 – 2,4 µg l ⁻¹	[57]
		Efluente	<0,01 – 0,4 µg l ⁻¹	
TCS, EHMC, DEET, MePB	Biocida Conservantes UV-Fs IRs ^b	Agua potable	3,0 – 268,0 ng l ⁻¹	[58]
		Efluente	500,0 – 3.830 ng l ⁻¹	
MePB, PrPB, BuPB, BzPB, BP4	Conservantes UV-Fs	Influyente	7,1-5.700	[59]
		Efluente	<0,4 – 1.080	

^a Filtros UV

^b Repelentes de insectos

Table 1. Continuación.

Compuestos	Categoría	Matriz	Concentraciones	Referencia
MePB, EtPB, PrPB, BuPB, BzPB	Conservantes	Sedimento Biosólido	0,7 – 95,7 ng g ⁻¹ dw 4,6 – 545,0 ng g ⁻¹ dw	[60]
MePB, EtPB, PrPB, BuPB, TCS, TCC	Conservantes Biocidas	Biota (22 especies; peces)	0,004 – 3.600 ng g ⁻¹	[61]
HHCB, AHTN, DPMI, ADBI, AHMI, ATII, MK, MX	Fragancias	Influente Efluente Agua superficial Agua freática Suelo Sedimento	45,0 – 13.395 ng l ⁻¹ 77,0 – 10.525 ng l ⁻¹ 59,0 – 794,0 ng l ⁻¹ 56,0 – 59,0 ng l ⁻¹ 0,3 – 6,2 ng g ⁻¹ 0,9 – 4,6 ng g ⁻¹	[63]
HHCB, AHTN	Fragancias	Biota (15 especies; mamíferos, peces, aves)	<1 – 20,5 ng g ⁻¹ ww	[64]
MeBZT, TCS, DEET, HHCB, AHTN	Biocidas UV-Fs Fragancias	Influente	180,0 – 800,0 ng l ⁻¹	[66]
AHTN, HHCB, DPMI, ADBI, AHDI, ATII	Fragancias	Influente Efluente Biosólido	<20 – 830,0 ng l ⁻¹ 75,0 – 950,0 ng l ⁻¹ 22,0 – 120,0 ng g ⁻¹ dw	[67]
HHCB, AHTN, ADBI	Fragancias	Agua superficial Sólido en suspensión	<0,05 – 1.000 ng l ⁻¹ <0,04 -18,0 µg g ⁻¹ dw	[68]
HHCB, AHTN, ADBI, AHMI, MK	Fragancias	Biosólido	0,02 – 66,8 µg g ⁻¹ dw	[69]
AHTN, HHCB, DEET, Bayrepel	Fragancias IRs	Influente	<0,05 – 6,9 µg l ⁻¹	[74]
TCS, DEET, Bayrepel, BP3, BP4, 4MBC	Biocidas UV-Fs IRs	Influente Efluente Agua superficial Agua potable	57,0 – 2.100 ng l ⁻¹ 16,0 – 1.200 ng l ⁻¹ 10,0 – 603,0 ng l ⁻¹ 10,0 – 62,0 ng l ⁻¹	[75]
DEET	IRs	Agua superficial	<8 – 1.292 ng l ⁻¹	[76]
DEET	IRs	Influente Efluente Agua superficial Agua freática Agua potable	8,0 – 3.000 ng l ⁻¹	[77]
BP3, 4MBC, EHMC, OC	UV-Fs	Efluente Agua superficial Biota (2 especies; peces)	<3,6 – 8,0 ng l ⁻¹ 2,0 – 35,0 ng l ⁻¹ 1,0 – 233,0 ng g ⁻¹ lw	[86]
BP3, 4MBC, OC, EHMC, ODPABA	UV-Fs	Agua potable	2,0 – 300,0 ng l ⁻¹	[88]

Table 1. Continuación

Compuestos	Categoría	Matriz	Concentraciones	Referencia
BP1, BP3, BP4, 4HB, 4DHB, 4MBC, EtPABA, BZT, MeBZT, DMeBZT, MePB, PrPB	Biocidas UV-Fs Conservantes	Agua superficial Agua freática	58,0 – 1.340 ng l ⁻¹ 30,0 – 1.980 ng l ⁻¹	[87]
BP1, BP3, 4HB, 4DHB, 4MBC, OC, ODPABA, EHMC	UV-Fs	Biosólido	0,04 – 9,2 µg g ⁻¹ dw	[89]
BP1, BP3, 4HB, 4DHB, 4MBC, OC, ODPABA, EHMC	UV-Fs	Sedimento	<1,3 – 54,4 ng g ⁻¹ dw	[90]
BP1, BP3, 4HB, 4DHB, 4MBC, OC, ODPABA, EHMC	UV-Fs	Sedimento	<0,8 – 2.400 ng g ⁻¹ dw	[91]
4MBC, OC	UV-Fs	Biota (3 especies, peces)	140,0 – 2.400 ng g ⁻¹ lw	[92]
BP3, BP4, 4MBC, EHMC	UV-Fs	Agua superficial Biota (7 especies; peces, aves)	16,0 – 68,0 ng l ⁻¹ <6 – 337,0 ng g ⁻¹ lw	[93]
BP3, EHMC, 4MBC, OC	UV-Fs	Biota (15 especies, peces)	2,2 – 241,7 ng g ⁻¹ dw	[94]
Fullereno C ₆₀ , Fullereno C ₇₀	Nanomaterial	Efluente Agua superficial Sedimento	88,4 – 4.930,0 pg l ⁻¹ <0,9 – 4.500,0 pg l ⁻¹ 19 – 32,1 pg g ⁻¹	[99]
TiO ₂	Nanomaterial UV-Fs	Agua superficial	1,7 – 7,9 µg l ⁻¹	[100]
Fullereno C ₆₀ , Fullereno C ₇₀	Nanomaterial	Agua superficial Sedimento Suelo	0,2 – 7,9 ng l ⁻¹ 0,1 – 0,7 ng g ⁻¹ 0,2 – 4,4 ng g ⁻¹	[101]

1.4 Efectos de los productos de cuidado personal en biota y en la salud humana

1.4.1 Efectos adversos sobre la biota

La naturaleza generalmente lipofílica de los PCPs les hace proclives a acumularse en sedimentos, material particulado en suspensión y en el tejido lipídico de los organismos vivos como ya se ha ido comentando. Los organismos acuáticos son especialmente sensibles a la presencia de contaminantes, al estar en la primera línea de exposición. Esto conlleva que el consumo de peces contaminados por parte de los seres humanos sea una de las vías de exposición a esta clase de compuestos [104]. Aunque estos compuestos se encuentran

generalmente a bajas concentraciones, los efectos causados durante una larga exposición (exposición crónica) son en su mayoría desconocidos. La fuente de mayor preocupación al respecto reside en su potencial como disruptores endocrinos, esto es que son capaces de interferir con los procesos normales de desarrollo y ciclo reproductivo de los organismos vivos expuestos.

Existe poca información acerca de los posibles efectos crónicos y sub-crónicos que los PCPs pueden causar. Por ejemplo, filtros solares como la benzofenona 3 (BP3), la benzofenona 4 (BP4) y el etilhexil metoxicinamato (EHMC) pueden alterar la transcripción de los genes relacionados con la producción de hormonas sexuales, mientras que el octocrileno (OC) obstaculiza la hematopoyesis, el flujo sanguíneo, la creación de venas y arterias y el desarrollo orgánico en embriones de peces cebra (*Danio rerio*) [105, 106, 107, 108]. Así mismo, se sospecha que pueden estar detrás del blanqueamiento y degradación de los corales [109, 110]. Dosis de TCC superiores a 25 mg d⁻¹ kg⁻¹ masa corporal (bw) parecen causar anemia, y afectan la masa corporal, hepática y del bazo en ratas expuestas a través de la alimentación durante dos años [111]. Conservantes como propil parabeno (PrPB) y butil parabeno (BuPB) son capaces de afectar la gametogénesis en ratas juveniles [112], y el DEET provoca mielino patía esponjiforme en su bulbo raquídeo en dosis próximas a la letal [113]. Se ha demostrado que el TiO₂ causa inflamación del hígado y del bazo, además de afectar negativamente el tejido cardíaco y pulmonar en ratones [114], mientras que nano-Ag se ha visto que es neurotóxico en mamíferos a bajas concentraciones [115].

1.4.2 Presencia y efectos sobre la salud humana

Los datos referentes a los efectos que los PCPs pueden causar sobre la salud humana son escasos. No obstante, la continua exposición que padecemos a éstos es un factor de riesgo más mientras los posibles efectos adversos nos son desconocidos. A día de hoy, los PCPs han sido detectados en diversas matrices humanas a concentraciones del orden de los ng g⁻¹ lipídico (lw) en leche materna [116, 117, 118] y tejido adiposo [64]. La Tabla 2 presenta las concentraciones de PCPs en matrices humanas.

Concentraciones de TCS a niveles del orden de los ng ml⁻¹ han sido reportados en orina [119, 120] y a ng g⁻¹ lw en tejido adiposo, hepático y cerebral [121]. Adicionalmente, existe cierta controversia sobre si TCS y TCC causan resistencia microbiana [122], dado que los niveles ambientales encontrados son tóxicos para las bacterias acuáticas [123]. También se sospecha que pueden colaborar con la sensibilización alérgica en niños [124]. Por su parte, TCC puede llegar a inducir la formación de metahemoglobina (una proteína similar a la hemoglobina, pero

incapaz del transporte de oxígeno) a través de procesos de transformación debidos a la temperatura corporal [125].

Tabla 2. Concentraciones de PCPs en matrices humanas

Compuesto	Categoría	Matriz	Concentraciones	Referencia
HHCB, AHTN	Fragancias	Tejido adiposo	5,0 – 435,0 ngg ⁻¹ ww	[64]
HMS, BP2, BP3, 4MBC, OC, EHMC, MX, MK, HHCB, AHTN, AHDI, MePB, EtPB, PrPB, BuPB	UV-Fs ^a Fragancias Conservantes	Leche materna	0,3 – 309,7 ng g ⁻¹ lw	[116]
AHTN, HHCB, OTNE, MK	Fragancias	Leche materna	<1,4 – 794,2 ng g ⁻¹ lw	[117]
HHCB, AHTN, MX, MK, BP3, UVP, UV234, UV320, UV326, UV328, UV329	Fragancias UV-Fs	Leche materna	<2 – 2.172,0 ng g ⁻¹ lw	[118]
TCS, TCC, MePB, EtPB, PrPB, BuPB, BzPB, HePB, BP1, BP2, BP8, 4HB	Biocidas Fragancias UV-Fs	Orina	0,5 – 2.583,0 ng ml ⁻¹	[119]
TCS, TCC, BP3	Biocidas UV-Fs	Orina	0,1 – 58,5 ng ml ⁻¹	[120]
TCS	Biocidas	Tejido adiposo Tejido cerebral Tejido hepático	<0,06 – 3,9 ng g ⁻¹ ww <0,06 – 0,2 ng g ⁻¹ ww <0,06 – 29,03 ng g ⁻¹ ww	[121]
MePB, EtPB, PrPB, BuPB, BzPB	Conservantes	Tejido tumoral mamario	0,1 – 53,0 ng g ⁻¹	[128]
BP3, MePB, EtPB, PrPB, BuPB	UV-Fs Conservantes	Placenta	1 – 16,8 ngg ⁻¹ ww	[129]
BP1, BP3, DHMB, THB	UV-Fs	Orina Semen	0,5 – 4,0 µg 0,01 – 0,2 µg	[130]
DEET	IRs ^b	Suero sanguíneo	10 pg g ⁻¹	[132]

^a Filtros UV

^b Repelentes de insectos

Las fragancias se han asociado con un amplio rango de posibles efectos adversos, como por ejemplo dermatitis, asma, cefaleas y mucosidad [126, 127]. Diversos parabenos han sido encontrados en orina [119], tejido mamario [128], leche humana [116] y placenta [129]. Además, es posible que estén implicados en la carcinogénesis de los tumores de mama [128]. De igual manera, los UV-Fs han sido determinados en orina [119], leche materna [116] y semen [130]. La continua exposición a repelentes de insectos como el DEET puede resultar en envenenamiento, el cual puede causar diversos síntomas tales como temblor, dificultad para descansar, pensar y articular el habla, espasmos nerviosos, coma e incluso la muerte, posiblemente debido a sus efectos neurotóxicos [131].

1.4.3 PCPs como disruptores endocrinos

A día de hoy, no hay un consenso claro sobre la relación entre exposición a los PCPs y efectos nocivos sobre la salud a bajas concentraciones. La falta de estudios de campo, el escaso número de estudios de presencia en muestras humanas y en el medio ambiente, la relación entre dosis y efecto y la existencia de resultados contradictorios son los principales causantes de que así sea. Una de las mayores preocupaciones que existen sobre estos compuestos y sus productos de transformación es su potencial acción disruptora del sistema endocrino. Hasta la fecha, los principales disruptores endocrinos presentes en el medio ambiente han sido los pesticidas, los esteroides, los surfactantes y los plastificantes [133, 134], pero la aparición de los contaminantes emergentes obliga a una reevaluación sobre el riesgo potencial que éstos presentan.

Hay pocos datos referentes a los efectos endocrinos producidos por los biocidas. La exposición a BZT puede ocurrir a través de la ingestión o de forma percutánea y se ha observado que este compuesto en particular puede afectar la expresión e inhibición de algunos genes en peces [135]. TCS posee una estructura similar a los bifeniles policíclicos y los éteres de difeniles polibrominados y potencialmente sus efectos endocrinos [136]. Además, su actividad endocrina ha sido probada en roedores y anfibios [136, 137], y son capaces de alterar el funcionamiento del ciclo reproductivo de algunas especies de peces [138].

Respecto a las fragancias, las nitrofragancias presentan actividad estrogénica *in vitro* [139], mientras que AHTN y HHCB son parciales agonistas del receptor de estrógeno y son tres veces más afines al receptor que las nitrofragancias [139, 140, 141]. En el caso de los parabenos, su extenso uso en toda clase de productos es motivo de preocupación, dado que éste incrementa el riesgo de exposición, ya sea a través de la piel, inhalados o ingeridos. Un gran número de estudios ha descrito actividad andrógena agonística para estos compuestos y su principal metabolito

(ácido *p*-hidroxibenzoico) *in vitro* [128, 142, 143, 144] e *in vivo* [141, 144]. La estrogenicidad de estos compuestos parece estar relacionada con la longitud de la cadena alquílica del éster [145].

Los UV-Fs entran en el organismo principalmente por penetración percutánea después de su aplicación sobre la piel. Los pocos estudios realizados *in vitro* e *in vivo* coinciden con que estos compuestos son capaces de interferir el desarrollo normal del ciclo reproductivo y el posterior crecimiento de peces y roedores [83, 84, 141, 146]. Al menos nueve compuestos de los regulados por la legislación europea poseen actividad estrogénica. De entre ellos, 4-metilbencilidenoalcanfor (4MBC) puede inducir efectos similares a los del 17 β -estradiol en líneas celulares de mamíferos y anfibios, así como EHMC, OC, BP3 y compuestos relacionados. Otros filtros solares como 2-(2'-hidroxi-5'-metilfenil)benzotriazol (UVP), 2-(2H-benzotriazol-2-il)-4,6-bis(1-metil-1-feniletil)fenol (UV234) y 2-tert-butil-6-(5-cloro-2H-benzotriazol-2-il)-4-metilfenol (UV326) también poseen actividad estrogénica *in vitro* [85, 147].

1.4.4 Toxicidad de los PCPs en biota y su uso en estimaciones de riesgo ambiental

Habiendo discutido los efectos adversos de los PCPs en biota y en seres humanos, queda por comentar las concentraciones que generan toxicidad. Se entiende por toxicidad aquellos efectos adversos generados por la exposición a un compuesto químico. Se pueden diferenciar dos tipos: toxicidad aguda y toxicidad crónica. La primera hace mención a los efectos que una exposición puntual puede causar en un organismo, mientras que la segunda hace referencia a los efectos causados por la exposición al mismo compuesto durante un periodo de tiempo prolongado. Debido a los diferentes tiempos de exposición, las concentraciones necesarias para producir efectos nocivos suelen ser menores cuanto más larga es la exposición [148].

Realizar ensayos de toxicidad es necesario para poder realizar las estimaciones del riesgo ambiental (ERA). Las concentraciones sin efecto observado (NOEC) y las concentraciones sin efecto previstas (PNEC) son utilizadas para poder calcular los coeficientes de riesgo (HQ). El cálculo de los HQ ofrece una estimación cuantitativa sobre el riesgo que los compuestos químicos pueden producir a los organismos acuáticos de referencia. No obstante, cuando los NOEC o los PNEC no están disponibles, la determinación de las concentraciones efectivas medias (EC₅₀) y las concentraciones letales medias (LC₅₀) para cada compuesto químico se usan para realizar la estimación dividiéndolas por un factor de incertidumbre variable [149].

En la Tabla 3 se recoge una muestra de algunos de los valores determinados para los productos de cuidado personal presentes en la bibliografía.

Tabla 3. Concentraciones de toxicidad de PCPs.

Compuesto	Categoría	Especie	Ensayo	EC ₅₀ /LC ₅₀ (mg l ⁻¹)	Ref.
BP1	UV-F ^a	<i>Daphnia magna</i>	Inmovilización	5,2	[82]
		<i>Raphidocelis subcapitata</i>	Inhibición del crecimiento	10,5	[82]
BP3	UV-F	<i>Daphnia magna</i>	Inmovilización	1,9	[82]
		<i>Daphnia magna</i>	Inmovilización	1,9	[150]
BP4	UV-F	<i>Daphnia magna</i>	Inmovilización	30,4	[82]
		<i>Daphnia magna</i>	Inmovilización	50,0	[150]
4HB	UV-F	<i>Daphnia magna</i>	Inmovilización	19,3	[82]
4DHB	UV-F	<i>Vibrio fischeri</i>	Bioluminiscencia	9,9	[82]
ODPABA	UV-F	<i>Daphnia magna</i>	Inmovilización	> Sol	[82]
		<i>Raphidocelis subcapitata</i>	Inhibición del crecimiento	0,05	[82]
EtPABA	UV-F	<i>Daphnia magna</i>	Inmovilización	6,8	[82]
		<i>Raphidocelis subcapitata</i>	Inhibición del crecimiento	> 25	[82]
		<i>Vibrio fischeri</i>	Bioluminiscencia	12,6	[82]
EHMC	UV-F	<i>Daphnia magna</i>	Inmovilización	0,3	[150]
4MBC	UV-F	<i>Daphnia magna</i>	Inmovilización	6,2	[82]
		<i>Daphnia magna</i>	Inmovilización	0,6	[150]
		<i>Raphidocelis subcapitata</i>	Inhibición del crecimiento	> Sol	[82]
BZT	UV-F Biocida	<i>Daphnia magna</i>	Inmovilización	> 50	[82]
		<i>Raphidocelis subcapitata</i>	Inhibición del crecimiento	> 50	[82]
MeBZT	UV-F Biocida	<i>Daphnia magna</i>	Inmovilización	> 50	[82]
		<i>Raphidocelis subcapitata</i>	Inhibición del crecimiento	> 50	[82]
TCS	Biocida	<i>Daphnia magna</i>	Inmovilización	0,4	[151]
		<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Inmovilización	125,0	[151]
		<i>Pimephales promelas</i>	Mortalidad	0,3	[151]
		<i>Lepomis macrochirus</i>	Mortalidad	0,4	[151]

^a Filtros UV

Tabla 3. Continuación.

Compuesto	Categoría	Especie	Ensayo	EC ₅₀ /LC ₅₀ (mg l ⁻¹)	Ref.
TCC	Biocida	<i>Daphnia magna</i>	Inmovilización	0,01	[53]
		<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Inmovilización	0,003	[53]
		<i>Mysodopsis bahia</i>	Inmovilización	0,02	[53]
		<i>Salmo gairdneri</i>	Supervivencia	0,1	[53]
		<i>Lepomis macrochirus</i>	Supervivencia	0,1	[53]
		<i>Scenedesmus subspicatus</i>	Inhibición del crecimiento	0,02	[53]
		HHCB	Fragancia	<i>Danio rerio</i>	Malformación
<i>Oryzias lapites</i>	Supervivencia			1,0	[153]
AHTN	Fragancia	<i>Danio rerio</i>	Malformación	~ 0,1	[152]
		<i>Oryzias lapites</i>	Supervivencia	1,0	[153]
MePB	Conser. ^b	<i>Daphnia magna</i>			
		<i>Tetrahymena thermophila</i>	Inmovilización	24,6	[154]
		<i>Vibrio fischeri</i>	Microcalorimétrico	58,0	[154]
		<i>Photobacterium leognathi</i>	Bioluminiscencia	10,0	[154]
		<i>Photobacterium leognathi</i>	Bioluminiscencia	35,0	[154]
PrPB	Conser.	<i>Daphnia magna</i>			
		<i>Pimephales promelas</i>	Inmovilización	12,3	[154]
		<i>Tetrahymena thermophila</i>	Mortalidad	9,7	[154]
		<i>Vibrio fischeri</i>	Microcalorimétrico	12,6	[154]
		<i>Photobacterium leognathi</i>	Bioluminiscencia	2,6	[154]
		<i>Photobacterium leognathi</i>	Bioluminiscencia	25,0	[154]

^b Conservantes

Tabla 3. Continuación.

Compuesto	Categoría	Especie	Ensayo	EC ₅₀ /LC ₅₀ (mg l ⁻¹)	Ref.
BuPB	Conser.	<i>Daphnia magna</i>			
		<i>Pimephales promelas</i>	Inmovilización	5,3	[154]
		<i>Tetrahymena</i>	Mortalidad	7,3	[154]
		<i>thermophila</i>	Microcalorimétrico	7,3	[154]
		<i>Vibrio fischeri</i>	Bioluminiscencia	2,8	[154]
		<i>Photobacterium leognathi</i>	Bioluminiscencia	4,3	[154]
DEET	IR °	<i>Daphnia magna</i>	Intoxicación	34,4	[155]
		<i>Daphnia magna</i>	Mortalidad	108,0	[156]
		<i>Raphidocelis subcapitata</i>	Inhibición del crecimiento	4,1	[157]
		<i>Vibrio fischeri</i>	Bioluminiscencia	21,2	[157]
		<i>Pimephales promelas</i>	Mortalidad	75,7	[158]

° Repelente de insecto

1.5 Marco legislativo

Dado el incremento de la preocupación por la presencia de productos químicos en el medio ambiente y sus posibles efectos para la biosfera y la salud humana, se han llevado a cabo acciones legislativas para regular su uso o establecer unos límites legales máximos autorizados. No obstante, pese al interés levantado por los contaminantes emergentes, la legislación existente al respecto es muy limitada. Pese a ello, el mayor interés de los gobiernos es asegurarse que la salud de la población no corra peligro y asegurar la calidad del medio natural, y en especial de los recursos hídricos. Se ofrece a continuación una breve pincelada sobre los marcos legislativos existentes vigentes en la actualidad.

1.5.1 Marco europeo

A día de hoy, a nivel europeo la preocupación derivada de la presencia de contaminantes en el medio se ha materializado bajo la directiva marco del agua (WFD) [159] y la regulación sobre productos cosméticos 1223/2009/EC [160]. La WFD es la principal política integrada en la Unión Europea para asegurar el uso sostenible del agua, cuya estrategia clave es la protección de las fuentes de agua de la contaminación. Las sucesivas decisiones derivadas de esta directiva crearon una lista de contaminantes prioritarios (contaminantes regulados debido a sus efectos

nocivos) basada en la información suministrada por los estados miembros y la comunidad científica. Hasta el momento, esta lista incluye un total de treintatré sustancias prioritarias y nueve sustancias peligrosas que han de incluirse en programas de control de la calidad de las aguas. Así mismo, dada la potencial peligrosidad de otras sustancias no recogidas por la directiva, la identificación y las estimaciones de riesgo ambiental de nuevas sustancias corre a cargo de la red de centros que componen el Espacio Europeo de Investigación de acuerdo a la directiva 67/548/EEC [161].

La normativa europea 1223/2009/EC [162] existe para asegurarse que los PCPs no suponen un riesgo para la salud del consumidor. Entre sus funciones, se encuentra la trazabilidad de los compuestos usados durante la fabricación del producto cosmético. En el Anexo II de la normativa se describen un total de 1300 compuestos químicos prohibidos para su uso en formulaciones cosméticas, mientras que el Anexo III describe 256 compuestos que no deben estar en el producto final o cuyas concentraciones están reguladas. Estos anexos se actualizan periódicamente a medida que más información sobre los efectos que pueden llegar a causar en la salud son conocidos.

Así mismo, la Unión Europea cuenta con el reglamento 1907/2006/EC de Registro, evaluación, autorización y restricción de sustancias químicas (REACH) [163] por el cual se establece la Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (ECHA). Además, se establece la regulación por la cual la industria, los proveedores e importadores de sustancias químicas han de aportar información sobre los riesgos para la salud y el medio ambiente de las sustancias químicas.

1.5.2 *Marco internacional no europeo*

En las otras mayores economías del mundo existen igualmente legislaciones sobre la calidad del medio acuático y la protección de los consumidores de los PCPs presentes. En el caso de los Estados Unidos la política principal del medio acuático es la “Clean Water Act” [164]. Esta ley requiere que cada estado federal establezca estándares de calidad del agua según el tipo de uso que de ella se realiza, además de establecer programas de monitoreo de las aguas para asegurar que los estándares se cumplen. De igual manera, la “Safe Drinking Water Act” [165] establece los estándares de calidad y seguridad para las aguas potables. La “Food and Drug Administration” es la agencia encargada de regular el uso de los PCPs, pero, a diferencia de la ECHA y del REACH, es la agencia la que se encarga de determinar la posible peligrosidad de los compuestos químicos disponibles en el mercado americano [166].

En el caso de Japón, existen dos leyes referentes a la protección medioambiental y del agua. La primera, “The Basic Environment Law”, establece niveles máximos de contaminantes comunes en el medio ambiente, así como la revisión constante de contaminantes que puedan suponer un problema tanto para el medio ambiente como para la salud humana [167]. La segunda, “The Water Pollution Control Law” establece el marco legal para la protección de las aguas naturales de la actividad humana [168]. Por otra parte, el uso de PCPs está regulado bajo la “Pharmaceutical Affairs Law” [169]. En Japón existe también un registro de emisiones de productos químicos llamado “Pollutant Release and Transfer Register” o PRTR cuya finalidad es la de recoger datos suficientes para regular emisiones de contaminantes por parte de la industria [170].

En China, la calidad de las aguas, su control continuo, la emisión de contaminantes y el marco de los estudios ambientales se encuentran reguladas por la “Environmental Quality Standards for Surface Water”, tomando como base los estándares de calidad de países de todo el mundo. En ella se establecen además diferentes estándares según el uso que se le da al agua [171]. Por su parte, los PCPs están regulados principalmente por las normas “The Hygiene Supervision Over Cosmetics” y “Hygienic Standard for Cosmetics”, que establecen las listas de PCPs regulados y de uso prohibido en cosmética [172].

1.6 Compuestos considerados en esta Tesis

La Tabla 4 muestra los PCPs en los cuales se centra la presente Tesis Doctoral. Los compuestos seleccionados son ampliamente utilizados en la industria y su presencia en el medio ambiente despierta cierta preocupación dados los indicios de efectos adversos para el ecosistema.

Se incluye un total de treintaidos compuestos pertenecientes a las familias de UV-Fs orgánicos (dieciocho compuestos), Biocidas (tres compuestos), conservantes (cinco compuestos), repelentes de insectos (cinco compuestos) y nanomateriales (cinco compuestos). BZT y metil-1-H-benzotriazol (MeBZT) son UV-F y biocidas, TiO₂ (un UV-F que puede estar en forma de nanomaterial) y nano-Ag, un biocida nanométrico.

Dentro de los UV-Fs se estudian diferentes subfamilias. Se incluyen seis derivados de la benzofenona, entre los cuales dos de ellos son productos de transformación/metabolitos (4-hidroxybenzofenona [4HB] y 4,4'-dihidroxybenzofenona [4DHB]) de BP3. Incluyendo la benzofenona 1 (BP1) y benzofenona 2 (BP2) y BP4. Este grupo derivado de la benzofenona presenta un rango amplio de lipoficidades, con valores de Log K_{ow} entre 0,37 y 3,79. De todos

ellos, la BP4 es el más soluble en agua ($0,65 \text{ g l}^{-1}$), y en general se utiliza como sustituto de la BP3 en productos de bse acuosa. Sin embargo, el 4DHB es el más hidrofílico ($\text{Log } K_{ow} = 0,37$).

Se incluyen también en el grupo de los UV-Fs orgánicos dos derivados del ácido *p*-aminobenzoico (Etil *p*-aminobenzoato [EtPABA] y etilhexil dimetil-*p*-aminobenzoato [ODPABA]), OC, EHMC y 4MBC. A excepción de EtPABA ($\text{Log } K_{ow} = 1,86$), estos compuestos son apolares ($\text{Log } K_{ow} = 4,95 - 7,53$) y poco solubles en agua ($0,004 - 5,1 \text{ mg l}^{-1}$). Se incluyen en esta Tesis seis benzotriazoles, de los cuales BZT y MeBZT son a su vez biocidas polares ($\text{Log } K_{ow} = 1,23$ y $1,89$, respectivamente). Esta familia tiene al BZT como su precursor, y funcionalizando la molécula se obtienen compuestos eficaces para la absorción de la radiación UV. Entre ellos se han estudiado 2-(5-*tert*-Butil-2-hidroxifenil)benzotriazol (TBHPBT), UVP, 2-(2'-Hidroxi-3',5'-di-*tert*-butilfenil) benzotriazol (UV320) y 2-(2-H-Benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenol (UV329), todos ellos lipofílicos ($\text{Log } K_{ow} = 3,24 - 6,21$) y poco solubles ($0,15 - 15,37 \text{ mg l}^{-1}$).

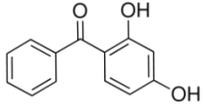
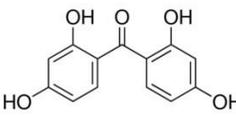
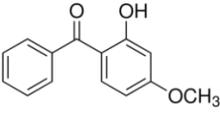
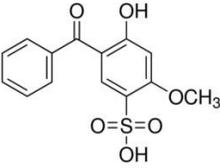
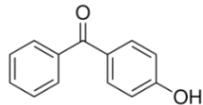
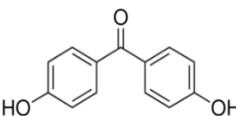
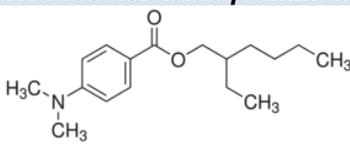
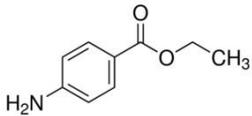
Además, se incluyen en esta Tesis cinco conservantes, todos ellos ésteres derivados del ácido *p*-hidroxibenzoico: metil parabeno (MePB), etil parabeno (EtPB), PrPB, BuPB y bencilparabeno (BzPB). La lipofilicidad ($\text{Log } K_{ow} = 2,0 - 3,7$) y la solubilidad ($0,12 - 2,5 \text{ g l}^{-1}$) de estos compuestos decrece cuanto más complejo es el grupo funcionalizado del éster.

Entre los estudios de la presente Tesis Doctoral se discuten también cinco IRs. La *m*-toluamida, DEET, hidroxietil carboxilato piperidina isobutilo (Bayrepel), *N*-Octil dicarboxamida piperonilo (MGK-264) y butóxido de piperonilo (PBO). De todos ellos, la *m*-toluamida, el DEET y el Bayrepel son los más hidrofílicos ($\text{Log } K_{ow} = 1,18 - 2,20$).

Finalmente, también se han estudiado tres nanomateriales de base carbono (fullereno C_{60} , nanotubos multicapa [MWCNT] y grafeno) y dos metálicos (TiO_2 y nano-Ag).

Capítulo I: Introducción

Tabla 4. Compuestos considerados en esta Tesis junto a su estructura, sus propiedades fisicoquímicas más relevantes y su categoría.

Compuesto (acrónimo)	Nº CAS	Estructura y masa molecular (g mol ⁻¹)	Log K _{ow} ^a	Solubilidad (g l ⁻¹ , H ₂ O, 25°C) ^a	Familia
Derivados de la benzofenona					
Benzofenona-1 (BP1)	131-56-6	 214,22	3,17	0,39	UV-F ^b
Benzofenona-2 (BP2)	131-55-5	 246,22	2,78	98,42 (mg l ⁻¹)	UV-F
Benzofenona-3 (BP3)	131-57-7	 228,24	3,79	0,21	UV-F
Benzofenona-4 (BP4)	4065-45-6	 308,31	0,37	0,65	UV-F
4-hidroxibenzofenona (4HB)	1137-42-4	 198,22	3,02	0,41	UV-F
4,4'-dihidroxibenzofenona (4DHB)	611-99-4	 214,22	2,55	0,60	UV-F
Derivados del ácido p-aminobenzoico					
Etilhexil dimetil-p-aminobenzoato (ODPABA)	2124-5-02-3	 277,40	6,15	4,70 (mg l ⁻¹)	UV-F
Etil-p-aminobenzoato (EtPABA)	94-09-7	 165,19	1,86	131	UV-F

^a Estimados usando ECOSAR v 1.11

^b Filtros UV

Tabla 4. Continuación.

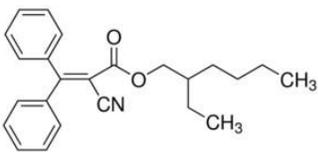
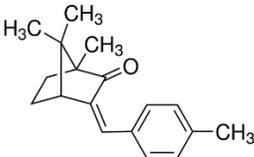
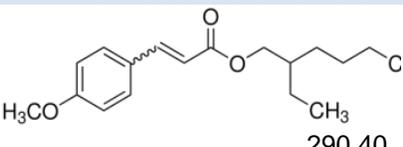
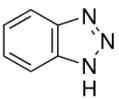
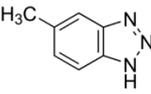
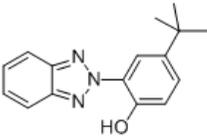
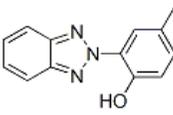
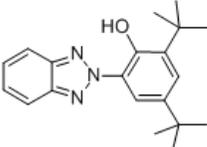
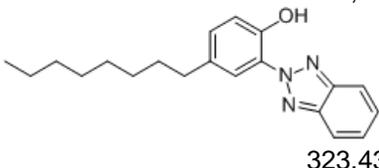
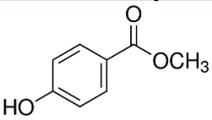
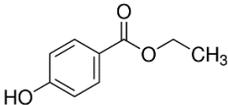
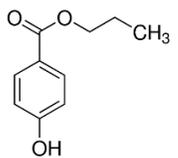
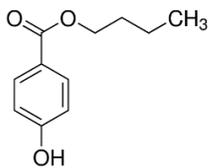
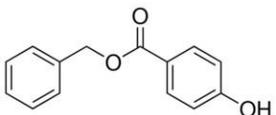
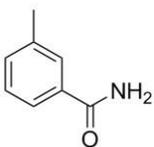
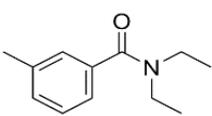
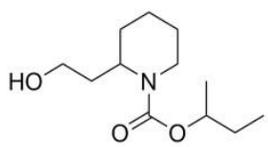
Compuesto (acrónimo)	Nº CAS	Estructura y masa molecular (g mol ⁻¹)	Log K _{ow}	Solubilidad (g l ⁻¹ , H ₂ O, 25°C)	Familia
Derivados del crileno					
Octocrileno (OC)	6197-30-4	 361,48	7,53	0,004 (mg l ⁻¹)	UV-F
Derivados del alcanfor					
4-metilbencilideno-alcanfor (4MBC)	3686-1-47-9	 254,37	4,95	5,10 (mg l ⁻¹)	UV-F
Derivados del cinamato					
Etilhexil metoxicinamato (EHMC)	5466-77-3	 290,40	5,80	0,15 (mg l ⁻¹)	UV-F
Derivados del benzotriazol					
1-H-benzotriazol (BZT)	95-14-7	 119,12	1,23	20	UV-F Biocida
Metil-1-H-benzotriazol (MeBZT)	136-85-6	 133,15	1,89	5	UV-F Biocida
2-(5-tert-Butil-2-hidroxifenil) benzotriazol (TBHPBT)	3147-76-0	 267,33	3,24	13,59 (mg l ⁻¹)	UV-F
2-(2-Hidroxi-5-metilfenil)benzotriazol (UVP)	2440-22-4	 225,25	4,30	15,37 (mg l ⁻¹)	UV-F
2-(2'-Hidroxi-3',5'-di-tert-butilfenil) benzotriazol (UV320)	3846-71-7	 323,44	5,30	0,15 (mg l ⁻¹)	UV-F
2-(2-H-Benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenol (UV329)	3147-75-9	 323,43	6,21	0,17 (mg l ⁻¹)	UV-F

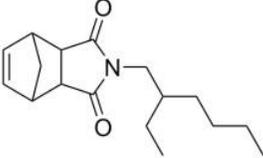
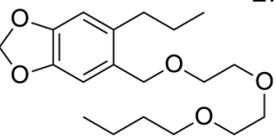
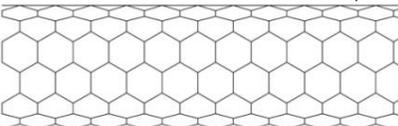
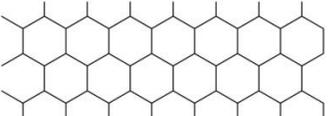
Tabla 4. Continuación.

Compuesto (acrónimo)	Nº CAS	Estructura y masa molecular (g mol ⁻¹)	Log K _{ow}	Solubilidad (g l ⁻¹ , H ₂ O, 25°C)	Familia
Derivados del ácido <i>p</i>-hidroxibenzoico					
Metil parabeno (MePB)	99-76-3	 151,15	2,00	2,50	Conser. ^c
Etil parabeno (EtPB)	120-47-8	 166,17	2,49	0,89	Conser.
Propil parabeno (PrPB)	94-13-3	 180,20	2,98	0,50	Conser.
Butil parabeno (BuPB)	94-26-8	 194,23	3,47	0,21	Conser.
Bencil parabeno (BzPB)	94-18-8	 228,24	3,70	0,12	Conser.
Derivados de la <i>m</i>-toluamida					
<i>m</i> -toluamida	618-47-3	 135,06	1,18	8,61	IR ^d
<i>N,N</i> -dietil- <i>m</i> -toluamida (DEET)	134-62-3	 191,27	2,20	0,67	IR
Ester de isobutilo					
Hidroxietil carboxilato piperidina isobutilo (Bayrepel)	1195-15-38-7	 229,16	1,55	2,87	IR

^c Conservante

^d Repelente de insectos

Tabla 4. Continuación.

Compuesto (acrónimo)	Nº CAS	Estructura y masa molecular (g mol ⁻¹)	Log K _{ow}	Solubilidad (g l ⁻¹ , H ₂ O, 25°C)	Familia
Piperonilos					
N-Octil dicarboxamida piperonilo (MGK-264)	113-48-4	 275,18	3,70	11,78 (mg l ⁻¹)	IR
Butóxido de piperonilo (PBO)	51-03-6	 338,21	4,29	0,64 (mg l ⁻¹)	IR
Nanomateriales de base carbono					
Fullereno C ₆₀	9968-5-96-8	 720,64	6.67	Insoluble	Nano. ^e
Nanotubos multicapa (MWCNT)	3080-68-56-6	 No aplica	n.d. ^f	Insoluble	Nano.
Grafeno	7782-42-5	 No aplica	n.d.	Insoluble	Nano.
Nanomateriales metálicos					
Nanopárculas de plata (nano-Ag)	7440-22-4	Ag 107,87	n.d.	Insoluble	Biocida Nano.
Nanopartículas de óxido de titanio (TiO ₂)	1346-3-67-7	TiO ₂ 79,87	n.d.	Insoluble	UV-F Nano

^e Nanomaterial

^f No disponible

Capítulo II

Presencia y distribución en el medio

2.1 Introducción

Como se ha mostrado en el Capítulo I, PCPs es un término que alberga familias de compuestos de diferentes propiedades físico-químicas y funciones. El interés que despiertan los diferentes grupos no es homogéneo y la problemática ambiental de algunos de ellos no se puede estudiar en profundidad debido a la escasez de datos acerca de su presencia ambiental. Debido a ello es necesario caracterizar la distribución de los PCPs en los diferentes compartimentos ambientales, puesto que conocer su distribución y procedencia puede ayudar a la creación de futuras estrategias de prevención de la contaminación y de remediación ambiental una vez producida ésta.

En el presente capítulo se discute la presencia, distribución y destino en el medio acuático de los PCPs en muestras de agua superficial, aguas residuales, sedimentos y particulado en suspensión. Así mismo, se identifican los focos de contaminación más probables y se discute el impacto antropogénico en términos de contaminación por PCPs as diferentes áreas estudiadas.

Se presentan también las metodologías analíticas que han sido desarrolladas para el análisis de PCPs en las diversas matrices consideradas. Estas metodologías de análisis están basadas en la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS). Durante el desarrollo de estas metodologías se ha perseguido alcanzar una buena sensibilidad y selectividad, así como una reducción de tiempo de análisis y un menor pretratamiento de las muestras. Es por ello que las metodologías se han desarrollado (cuando ha sido posible) para llevar a cabo el pretratamiento y el análisis de las muestras en línea.

2.1.1 Objetivos

El principal objetivo de este capítulo es caracterizar la presencia, distribución y destino de los PCPs en el medio acuático. Se analizan muestras de agua y sedimento de zonas con diferentes actividades económicas y se describen las fuentes de contaminación que las producen.

Por una parte, se estudian las aguas del área metropolitana de Barcelona, una zona densamente poblada con problemas históricos de contaminación. Se estudia la presencia de UV-Fs y biocidas en sus aguas y la distribución en sedimento y particulado en suspensión. Por otra parte, se investiga la presencia de IRs en aguas provenientes de tres cuencas fluviales europeas: una típicamente mediterránea y agrícola, una alpina impactada por el turismo invernal y una cuenca densamente poblada y compartida por cuatro países y por último se estudian los sedimentos como repositorio final de los UV-Fs.

Con todo ello se busca contribuir a expandir el conocimiento sobre el comportamiento y difusión de los PCPs en el medio acuático en tipos de muestras y zonas donde hay escasez de datos al respecto.

Como objetivo necesario se incluye el desarrollo de metodologías de análisis mediante HPLC-MS/MS que permitan el estudio de los PCPs en las matrices mencionadas. Las técnicas automáticas de análisis son escasas y no han estado disponibles hasta tiempos recientes.

2.1.2 Estructura

El presente capítulo incluye las siguientes tres publicaciones:

D. Molins-Delgado, J. Távora, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, "UV filters and benzotriazoles in urban aquatic ecosystems: the footprint of daily use products," *Science of the Total Environment*, vol. 601-602, pp. 975-986, 2017.

D. Molins-Delgado, D. García-Sillero, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, "Development of a new on-line SPE-HPLC-(APPI)-MS/MS method for the determination of insect repellents in European rivers," *Journal of Chromatography A* (enviado)

A. Mizukawa, D. Molins-Delgado; J.C. Rodrigues Azevedo; C.V. Scapulatempo Fernandes; M.S. Díaz-Cruz; D. Barceló, "Sediments as a sink for UV filters and benzotriazoles: The case study of Upper Iguazu watershed, Curitiba (Brazil)," *Environmental Science and Pollution research*, vol. 24, pp. 18284-18294, 2017.

Seguidamente se procederá a la discusión de su contenido. Se describirán las metodologías usadas, se comentarán los resultados obtenidos del análisis de PCPs en las diversas matrices y se discutirán la distribución en los diferentes compartimentos y los focos de contaminación posibles.

Publicación Nº 1

*UV filters and benzotriazoles in urban aquatic ecosystems:
the footprint of daily use products*

por

D. Molins-Delgado, J. Távora, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló

en

Science of the Total Environment, vol. 601-602, pp. 975-986, 2017

Información adicional disponible en el Anexo IV

Atención¡¡

Por razones de copyright, las páginas 36 a 48 de la tesis, que contienen el artículo citado, deben consultarse en la web del editor

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969717312834>

Publicación Nº 2

Development of a new on-line SPE-HPLC-(APPI)-MS/MS method for the determination of insect repellents in European rivers

Por

D. Molins-Delgado, D. García-Sillero, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló

en

Journal of Chromatography A (enviado)

Información adicional disponible en el Anexo IV

Development of a new on-line SPE-HPLC-(APPI)-MS/MS method for the determination of insect repellents in European rivers.

D. Molins-Delgado¹, D. García-Sillero¹, M.S. Díaz-Cruz^{1*}, D. Barceló^{1,2}

1. Dept. of Environmental Chemistry, IDAEA-CSIC, C/Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

2. Catalan Institute for Water Research (ICRA), Parc Científic i Tecnològic de la Universitat de Girona, C/Emili Grahit, 101 Edifici H2O, E-17003 Girona, Spain

*sdcqam@cid.csic.es

Highlights

- An on-line method for the analysis of insect repellents (IRs) in water is presented.
- Atmospheric photoionisation (APPI) allowed the chromatographic analysis of IRs.
- IRs monitoring was performed in three European river basins.
- DEET and Bayrepel were ubiquitous in the Sava and Evrotas Rivers.
- Environmental risk was found for DEET and Bayrepel in the Evrotas and Sava rivers.

Abstract

Insect repellents (IRs) are a group of organic chemicals whose function is to prevent the ability of insects of landing in a surface. These compounds have been found in the environment and may pose a risk to non-target organisms. In this study, an on-line solid phase extraction – high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry multiresidue method was developed using an atmospheric photoionization source (SPE-HPLC-(APPI)-MS/MS). The use of the APPI as an alternative ionization technique to ESI and APCI allowed expanding the range of analytical techniques suitable for the analysis of IRs, so far relied in gas chromatography. High sensitivity and precision was reached with limits of quantification between 0.2 and 4.6 ng l⁻¹ and interday and intraday precision equal or below 15%. The validated method was applied to the study of surface water samples from three European river basins with different flow regime (Adige River in Italy, Sava River in the Balkans, and the Evrotas River in Greece). The results showed that two IRs (DEET and Bayrepel) were ubiquitous in the Sava and Evrotas basins, reaching concentrations as high as 105 µg l⁻¹ of Bayrepel in the Sava River, and 5 µg l⁻¹ of DEET in the Evrotas River. Densely populated areas and effluent wastewaters are pointed out as the responsible for this pollution. In the alpine river Adige, only three samples presented low levels of IRs (6.01-37.8 ng l⁻¹). The concentrations measured were used to perform an environmental risk assessment by using the hazard quotients (HQs) estimation approach with chronic and acute eco-toxicity available data. The results revealed that despite the high frequency and eventually high concentrations of these infochemical compounds only few sites were at risk, with 1 < HQs < 3.3

Keywords

Atmospheric Pressure Photoionization; Insect Repellent; Liquid Chromatography; Personal Care Products; Risk assessment; River water.

1. Introduction

Most organisms live in an environment full of different smells and perceive through abiotic and biotic dynamic mix of scents called infochemicals [1]. This effect is defined as a chemical that transmits information produced by the interaction between two individuals and leads to a response in the recipient. Both the sender and the receiver benefit from this process [2]. Infochemicals play an important role in the history of life, the ability to find the habitat, the recognition of food and survival. Besides, they are the main source of communication in aquatic ecosystems, as other senses such as vision and mechanical senses are less efficient in murky and turbulent conditions [3]. Clouds of odours from various sources can be layered and can lead to different perceptions. In several invertebrates and fish, it has been shown that the system for communication and detection has been distorted by smelling discharges of pollutants [4]. This distortion effect is referred to as infochemical effect or infodisruption [5]. Among the synthetic chemicals potentially causing such outcomes we find insect repellents (IR). IRs are a group of organic synthetic chemicals whose function is to prevent the ability of insects of landing in a surface. They are applied on top of clothes, skin or other surfaces and help to avoid insect bites. These compounds are an alternative to pesticides, whose function is to kill rather than to prevent. The most common insect bites are those of mosquitoes, flies, fleas, and spiders, and their bite can produce many adverse effects such as skin irritation, allergic reactions, infections and even cause the spread of illnesses such as west Nile fever, malaria, dengue fever or encephalitis [6].

IRs have been used for many years as the Egyptians applied castor oil extracts to prevent mosquito bites and the Romans used vinegar to prevent those [6]. Today, there are new synthetic substances; research and development of these came mainly to protect military bites and the diseases associated bore. The first used insect repellents contained essential oils derived from plants such as citronella, but had very limited duration. During World War II the M-250 was developed containing 6 parts of DMP (dimethyl phthalate) 2 parts Indalone (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-4-oxo-2H-pira-6-carboxylate butyl) and 2 parts Rutgers 612 (2-ethyl-1,3-hexadiol), but in 1991 it was removed from production in response to an unpublished study showing that treated animals suffered shortfalls [7]. In 1953 N, N-diethyl-m-toluamide (DEET) was synthesized. This was probably the most important discovery

regarding the IRs and repulsive still remains the most widely used worldwide, over 50 years after its onset [8]. This may be due to that DEET, unlike other IRs, is effective against all types of mosquitoes, many varieties of flies, ticks, fleas and Nigua. DEET has been used as the reference application of insect repellent in humans and, therefore, all the new substances are compared with DEET [9]. During the last decades, the use and production of IRs has increased in order to prevent the spread of such afflictions. New methodologies such as molecular modeling and characterization of many new repellent substances are expected to improve the length of time, the number of species which protect and specially to minimize side effects [10]. Recently, new substances have been developed showing high efficiency such as 3-[N-butyl-N-acetyl]-aminopropanoate ethyl (EBAAP, IR3535) and 2-(2-hydroxyethyl) -1-metilpropyl ester (Bayrepel)[11].

In a recent work DEET, EBAAP and Bayrepel were pointed out to be potential infochemicals, as their effectiveness relays on the disruption of chemical communication in the target species, but also they can affect not target organisms and alter their ecosystem as well [2]. Moreover, concerns appeared because DEET was found to display neurotoxicity in insects, and potentially in humans [12–15]. Recently some studies explore the hypothesis that selected IRs, are able to disturb chemical communication and cause organismic effects like drift in crustaceans and insect larvae in natural waters with different effects [2, 16, 17]. Nevertheless, the information on this subject is still scarce.

IRs have boiling temperatures between 230 and 260 °C, which facilitates the formation of a IR layer above the applied surface [18], and partition coefficients (log Kow) below 3.5, making them fairly soluble in water. This represents a potential environmental risk factor, as low log Kow values generally boost their spread across the aquatic environment [19–21].

In humans, being correctly applied, IRs pose no risk. However, DEET has been reported as the source of adverse effects in humans in 43 reports from the United States [22] during its extensive time usage. On regards of the risk that they pose to living organisms, studies of use and application in animals have shown that these compounds possess an overall low toxicity, with 50% lethal dose (LD50) in mammals in the range of the thousands of mg kg⁻¹ [23], and 50% lethal

concentrations (LC50) in insects in the range of mg l⁻¹ [24, 25].

The analysis of this class of personal care products (PCPs) in water requires of sample pretreatment usually consisting on solid phase extraction (SPE) [26, 27], liquid-liquid extraction (LLE) [20, 28] or stir bar sorptive extraction (SBSE) [19,29]. Due to their moderate volatility, IRs have been analysed using methods based on gas chromatography with mass spectrometry detection (GC-MS) [20, 30]. Nevertheless, during the last years and due to the need to create multiresidue methods, new methodologies relying on high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-MS/MS) and different ionisation techniques have been developed [27, 31, 32].

The aim of this work was to develop and validate an automated method based on HPLC for the analysis of 6 synthetic IRs of human use in water. The method consisted on on-line SPE followed by high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, with an atmospheric pressure photo ionisation source (SPE-HPLC-APPI-MS/MS). APPI is a relatively new ionization technique probed useful in the determination of less polar, poorly ionisable analytes. The most analysed IRs so far were DEET and Bayrepel (also known as Picaridin) extensively worldwide used for decades [19]. In the present study these two IRs were analysed together with a new generation of repellents, that appear to be good substitutes for DEET. Finally, an example of the applicability of the validated method for the determination of the selected common active ingredients in insect repellents products and their estimated environmental risk in river water from three European river basins is presented.

2. Experimental

2.1 Standards and reagents

DEET (97.7%), m-toluamide (99%), p-menthane-3,8-diol (PMD; 99%), N-octyl bicycloheptene dicarboximide (MGK-264; 99%), and piperonyl butoxide (PBO; 99%) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Bayrepel (99%) and EBAAP (99%) were obtained from Dr. Ehrenstofer (Augsburg, Germany). Carbamazepine-d10 (99% D) and triphenylphosphat-d15 (99%D), used as surrogate standards, were obtained from Sigma-Aldrich.

Methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), acetone, toluene, and water, all of them HPLC quality, were provided by Merck (Darmstadt, Germany).

Individual stock solutions were prepared in MeOH at 100 mg l⁻¹. Mix standard solutions were prepared at 1 mg l⁻¹ and subsequently diluted as needed. Table 1 lists some information about the target IRs.

2.2 Sampling site

Three European rivers were selected for this study: the Evrotas River in Greece, the Sava River in the Balkans, and the Adige River in Italy. These three rivers were selected as representatives of different characteristics, such as flow regime. Figure 1 shows the three rivers basins in their geographic context.

The Evrotas River is the most important river in the Laconia region in Greece. It has 82 km longitude and its basin encompasses 2,418 km². This river is a characteristic Mediterranean river, alternating between a somewhat constant flow of water and partial droughts during the warmest months of the year. The river flows across a rurally developed area and it is the target of hydric overexploitation and pollution. Along its basin there is only one wastewater treatment plant (WWTP) [33].

The Sava River, tributary of the Danube River, is one of the longest rivers in Europe, with 945 km longitude and a basin area of 97,713 km². This river is extended over 4 countries, Slovenia, Croatia, Bosnia-Herzegovina, and Serbia, and supports a population of approximately 8.2 million people (42% of the total population of these countries). The high course of the river is mainly affected by hydromorphologic pressures, in the middle course it is affected by rural activities and eutrophication problems, whereas in the lower course urban and industrial areas impact its waters [33].

The Adige River is the second longest river of Italy, with 410 km of longitude and a basin of 12,000 km². This river originates from glacial ice in the Alps and its flow is greatly dependant on the season, with higher flows during the summer season due to the melting of ice. The higher course of the river is impacted by touristic activities, whereas its high and middle course houses several dams greatly altering its hydrology [33].

2.3 Sample collection

Thirty-three surface water samples were collected: 8 samples from the Evrotas River, 13 samples from the Sava and 12 from the Adige. Sampling was performed in June 2014 in the Evrotas River, in September 2014 in the Sava, and in May 2015 in the Adige. The description of the samples is shown in Table A1 of the Supporting Information.

2.4 Sample preparation

The sample treatment followed the procedure described in Gago-Ferrero et al. [34]. Upon arrival to the laboratory, the waters were filtrated using 0.45 µm nylon membrane filters (Whatman; Maidstone, UK). An aliquot of 25 ml of the filtered water was then spiked with the surrogate standards solution to achieve a concentration of 50 ng l⁻¹. The final analysis was carried out with five ml of that solution.

2.5 Sample extraction

Samples were loaded using an automatic injector and were transferred into a Transcend chromatograph (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, US) for further on-column solid phase extraction (SPE). Three SPE columns were tested: HyperSep retention PEP (EQUAN-5), HyperSep Retain-CX (EQUAN-6) and HyperSep Retain-AX (EQUAN-8) provided by Thermo Fisher Scientific. EQUAN-5 is composed of polystyrene divinylbenzene material modified with urea groups that allows the retention of analytes with a wide range of polarities. EQUAN-6 is stuffed of a polymer that retains basic compounds, whereas EQUAN-8 consists of a polymeric phase that interacts with acidic compounds. The analytes were loaded using 100% water as mobile phase during a period of 3.42 min and a flow rate of 1.25 ml min⁻¹, after which they were eluted into the chromatographic system using the mixture 90% MeOH:10% water and a flow rate of 0.3 ml min⁻¹ during the next 2 min.

2.6 HPLC-MS/MS determination

Separation of the analytes was achieved using a Purospher® Star RP-18 (125 x 2.0 mm; 5 µm) C18 column (Merck). In the optimized method, eluent A consisted of water and B of MeOH. The gradient was as follows: it started with a 75% of B, increased to 80% at min. 3.42; at min. 3.83 it reached 90% of B and achieved 100% of B at min. 5.83; this proportion was maintained until the min. 8.67, and then returned to the initial conditions up to min. 9.5.

Analytes were detected by APPI-MS/MS in positive mode operated under selected reaction monitoring (SRM) in a TSQ Vantage (Thermo Fisher Scientific) triple quadrupole mass spectrometer. MS/MS experiemntal parameters were as follows: discharge current: 4 V; vaporisation temperature: 350 °C; sheath gas pressure: 0.5 bar; auxiliary gas pressure: 20 bar; capillary temperature: 300°C, and collision pressure: 1 mTorr. The optimisations of the m/z transitions for each compound were carried out by flow injection analysis (FIA) of 500 ng ml⁻¹ individual standard solutions. Table 2 lists the SRM transitions and the collision energies for the selected IRs.

2.7 QA/QC

In order to ensure the reliability of the analyses, a series of considerations were taken: (1) to avoid cross-contamination gloves were used during the whole process, solvent bottles were exclusively employed for these analyses, and all glass laboratory material was washed with HPLC-grade water and solvents and heated at 350°C for 15 h; (2) reagent blanks were obtained by conducting the same treatment as the samples by substituting them with HPLC grade water; (3) quality control solutions spiked at known concentrations of the target analytes were used through the analysis; (4) quantification was performed by internal standard calibration based on peak areas.

3. Results

3.1 Method optimisation

3.1.1 SPE separation and purification

For the on-line SPE three extraction columns were tested using the same loading and unloading conditions (see section 2.5). Hence, the selection criterion was based on the efficient retention and quick elution of the selected IRs from the column. Figure 2 shows the reconstructed ion chromatograms for a sample containing 50 ng l⁻¹ of each IR in absence of the chromatographic column. EQUAN 5 was the only one among the tested SPE columns able to retain and to elute the analytes and the surrogate standards. EQUAN 8, recommended for acidic compounds, was unable to quickly unload the analytes, being practically unable of retaining the standard TPhP-d15, but allowed for a somewhat better separation of EBAAP from what appeared to be an impurity. Similarly, EQUAN 6, recommended for basic compounds, presented

overall better retention and elution than the other columns, for m-toluamide, Bayrepel, DEET, and carbamazepine-d10. However, EQUAN 5 offered the best retention efficiency and quick elution for both IRs and standards, and thus, it was selected for further analyses. In all cases, the signal of MGK-264 was composed by two peaks, corresponding to the endo- and exo- enantiomers produced in the synthesis process [35].

3.1.2 Optimisation of the HPLC-APPI-MS/MS

For the chromatographic separation of the target analytes, isocratic and non-isocratic gradients varying the proportions water and MeOH were tested. The gradients had increasing proportions of MeOH, from 60% to 100% and varying initial conditions. MeOH was substituted with ACN and similar assays were performed. As no significant differences were observed, MeOH was finally selected as organic phase because it is a slightly protonic solvent which enhances APPI ionization [36].

Whenever APPI sources are used, it is common to add doping agents (dopant-assisted-APPI) in order to enhance the signal of the analytes during the detection process [32,36]. These substances are used at high concentrations leading to improve in 10 to 100-folds the ionization performance. The process begins with the ionization of the dopant agent, which acts as an intermediary to ionize the molecules of the analytes. After defining the extraction and separation best conditions, the optimization of the dopant agent was completed by performing three analyses: (1) without doping agent, (2) with toluene, and (3) with acetone. The doping agents were added to the system using an external pump containing a loaded syringe of 2.5 ml at a flow rate of 0.03 ml min⁻¹. The syringe was connected to the chromatographic system after the chromatographic column using a T-junction. A sample containing a mix of the target compounds and the surrogate standards at 50 ng l⁻¹ was used in all tests. Figure 3 shows the reconstructed ion chromatograms for the three experiments. As expected, the addition of doping agents increased the signal in most cases. When comparing the intensity of the signal, acetone was found to be the best doping agent, achieving signal increments between 10 and 90% with respect to the test without doping agents. In comparison, toluene offered no significant increase for most of the target compounds, increases of over 90% for the surrogate standards and around 30% for m-toluamide. Nevertheless, toluene enhanced the

background signals in the m-toluamide transitions, hindering its identification. The ionization of PMD was not successfully under any condition, probably due to its structural lack of easily photoionisable groups. A different problem arose with EBAAP; n-butyl benzensulfonamida (n-BBS), a common compound used as a plasticiser, had similar molecular mass (214 g mol⁻¹), and was found to leak from the capillaries of the instrument. Its signal was quite intense, interfering with the EBAAP's signal, and thus preventing the quantitative analysis. However, and despite the signal enhancement provided by acetone, its use was discarded because the unequivocal identification of the compounds was reliable without its addition, and because of the lack of suitable automatic equipment to perform the addition of the dopant during the analysis of large batches of samples.

3.2 Method performance

The performance of the method for surface water samples is presented in Table 3. PMD and EBAAP were removed from the final method due to the issues described in section 3.1.2. Calibration for the selected compounds was within the range 1-500 ng l⁻¹ for DEET, Bayrepel, and MGK 264 and between 3 and 500 ng l⁻¹ for m-toluamide and PBO, always achieving good linearity with r² >0.999. Intraday and interday precision, expressed as relative standard deviations (%RSD) were in the range 6-15%. The instrumental limits of detection (ILOD) were in the range 0.5-7 pg, whereas the instrumental limits of quantification (ILOQ) ranged from 9 to 15 pg. The method limits of detection (MLOD) and limits of quantification (MLOQ) were in the ranges 0.1-1.4 ng l⁻¹ and 0.2-4.6 ng l⁻¹, respectively. The IUPAC guidelines [37] were followed to calculate the ILOD, ILOQ, MLOD, and MLOQ. Additionally, matrix effects were estimated by comparing the slope of the calibration curves prepared in HPLC grade water and in surface waters free of the target analytes (matrix matched). The comparison indicated that the matrix effects were low, below 14%, slightly increasing the signal of the target compounds. Figure 4 presents a reconstructed ion chromatogram of a standard at 50 ng l⁻¹.

The developed methodology shows some advantages. For instance, compared with methodologies reliant on GC-MS, it achieves similar MLODs and MLOQs to those found in the literature (0.2 – 13 ng l⁻¹) [19, 26] or even better (35 ng ml⁻¹) [29]. The fact that the described methodology performs the purification of the samples on-line is advantageous, reducing the

analysis time and the possible mass losses derived of the different steps of off-line methodologies. In the same line, Wang et al. [31, 32] developed a methodology for the analysis of DEET, among other micropollutants, using SPE-HPLC-APPI-MS/MS, achieving LOD in the range 0.3 – 15 ng l⁻¹. In this case, our methodology represents a step forward, as it expands the number of IRs analysed and greatly reduces the chromatographic run, as the retention times for DEET in Wang et al. was 14 min and in our method it was 5.83 min.

3.3 Application of the method to the analysis of river waters

The concentrations of IRs in the water samples from the three selected rivers are presented in Figure 5 and Table A2 of the Supporting Information. Mean concentrations, and detection frequency in each one of the river basins are showed in Table 4. Results indicated that the Adige River had the overall lowest concentrations and detection frequency (25%). This might be due to its nature as a glacial originated river and a lower use of IRs along its basin. However, both the Evrotas and Sava rivers had higher concentrations and with 100% of detection. IRs' maximum and minimum concentration in the Evrotas River were 91.15 and 4,955.33 ng l⁻¹, respectively, whereas the concentrations in the Sava River were somewhat lower, between 3.41 and 105,397.50 ng l⁻¹. Of the studied compounds, m-toluamide and MGK 264 were not detected in any sample, whereas PBO was measured in one water sample from the Evrotas River at a concentration of 19.33 ng l⁻¹. Both MGK-264 and PBO have high Log Kow values (3.70 and 4.29, respectively) that could favour their adsorption in sediments and suspended particulate matter. DEET has been widely used for the last 50 years and our results show that this trend is maintained across the different river basins. In the Evrotas River, DEET presented high concentrations (above 400 ng l⁻¹) in all samples but one. USkollini7 and USkollono22 are in a background reference place for drought periods but both points showed pretty different concentrations (2,005.45 and 59.22 ng l⁻¹). This important difference might be attributed to the sampling date. USkollini7 is located in the uppermost course of the river in a scarcely populated area. During the summer season, it is usual that the river practically dries, notoriously increasing the effects of pollution discharges for instance by WWTPs effluents due to the lack of dilution. USkollini22 is located some kilometres down the course of the river and the water input from other

tributary streams may be enough to provide the river with the enough water to dilute the pollutants transported by the river. Concentrations increase in the DSkollini9 and DSkallio29, a more populated area that relies on extensive agricultural uses. As the Evrotas lack proper WWTPs for most of its course, high concentrations after leaving the area (4,348.82 ng l⁻¹) may be caused by direct release of untreated waters into the river. The Vivariie10 and Vivarioe15 are reference pollution areas, but had high concentrations of DEET. Despite that, the increasing amount of water due to tributaries connection may explain the reduction in concentration experienced with respect to DSkallio29. WWTPi19 and WWTPo5 area receives the effluent wastewaters from the city of Sparta. Due to the hydrophilic nature of IRs, conventional wastewater treatments might not be enough to remove these compounds from the wastewaters before its release to the environment [38].

Concentrations of DEET and Bayrepel were found in all points of the course of the Sava River. This may be related to the fact that the region has been affected by a high population of mosquitoes [39]. RAD2, located in a reference area in the uppermost course of the river has concentration levels of DEET and Bayrepel higher than most of the rest of the river. Overall concentrations of Bayrepel are higher than those of DEET, with really high concentrations in CRN1 (105,336.00 ng l⁻¹), ZUP1 (266.30 ng l⁻¹), ZUP2 (148.48 ng l⁻¹) and BEO1 (314.69 ng l⁻¹). Both ZUP1 and BEO1 are sites located before a population centre, whereas CRN1 is located after an urban site. The three locations are navigable parts of the river, and CRN1 and ZUP1 are in areas located near oil refinery facilities. Nevertheless, a similar pattern is reproduced along the basin, with concentrations peaking before urban centres, but decreasing between 38 and 93% after leaving the urban centres behind, with the highest reduction observed between BEO1 and BEO2. These results are agreement with previous works showing that densely populated areas and WWTPs are well-known sources of IRs' pollution [39], as they are not completely removed, however, other factors such as water dilution should be taken into consideration, especially along the lower course of the river. On the other hand, Bayrepel, a relatively new IRs in comparison, has proven to be ubiquitous in both, the Sava (2.23-105,336 ng l⁻¹) and Evrotas rivers (6.48-179.62 ng l⁻¹).

Only two samples from the Adige River had concentrations of DEET, (6.8 and 6.01 ng l⁻¹, samples A8 and A10, respectively). Regarding this river, the sampling area is the place of several ski and holiday resorts, especially during the winter months. All analysed samples originate from the high and middle course of the river. And the absence of IRs in most samples might be explained by the overall cooler temperatures of the water in the alpine region and the scarcity of little population along its upper course.

Similar concentrations to those observed in this study have been reported in surface waters from Germany, which were in the range 3-40 ng l⁻¹ [19]. In the USA, concentrations of DEET measured were between 49 and 97 ng l⁻¹ [40,41]. Regionally, it appears that DEET is more extensively used in the Evrotas basin (Greece) than Bayrepel, whereas the opposite is observed in the countries surrounding the Sava River. A similar scenario was observed in Germany, where decreased concentrations of DEET and higher concentrations of Bayrepel have been reported since the introduction of DEET [42]. In 2008 Terzić et al. [39] analysed wastewaters from Croatia, Bosnia and Herzegovina, and Serbia concluding that DEET was still the main IRs used in the region, with only a 3% of the samples containing Bayrepel. Our results for both IRs in the Sava basin suggest that the substitution process has continued taking place. The occurrence of these compounds in remote locations, such as those of the Adige River, or the higher courses of the Sava and Evrotas Rivers, may be caused by their use during touristic and other recreational activities, a link that has been previously reported [25]. Additionally, the land use and occurrence of DEET has been linked pointing to urban centres and WWTP effluent discharges as the main source of this compound, followed by farmlands, mixed use land (urban centres and farmlands), and remote locations [25].

3.4 Environmental risk assessment of IRs

In order to gain some insight on their potential ecological risk, an environmental risk assessment was performed. An estimation based on hazard quotients (HQs) calculation following the European Medicines Agency (EMA) guidelines, as described in a previous study [43], was carried out. Toxicity studies have been usually oriented to characterise the potential harmful effects that IRs may pose to humans, resulting in low usage risk despite the reported adverse effects observed in children [13, 22]. No-observed-adverse-effects concentrations (NOEC) were used when

available, and predicted no-effect concentrations (PNEC) were calculated using the available half maximal effective concentration (EC50) and LC50 data taken from the literature [12, 38, 44, 45]. Despite the amount of data regarding chronic toxicity of these compounds is scarce; estimates exist for generic green algae and fish [38]. ECOSARTM, software developed by the US Environmental Protection Agency (EPA), was used to estimate ecotoxicity data for Bayrepel. This modelling tool provides toxicity data based on mathematical relationships between Log Kow and corresponding measured toxicity values [46].

Table A3 shows the estimated HQs for the determined IRs concentrations based on chronic and acute toxicity data. Overall, DEET and Bayrepel do not pose serious risk to the selected biota. In the Sava and Adige rivers, HQs, were between 10-4 and 10-2. However, some sampling areas are at risk; this is the case of CRN1 where HQs above 1 were estimated for Bayrepel in daphnids (HQ=3), algae (HQ=3.3), and fish (HQ=1.2). In Evrotas River sampling sites DSkallio29 and WWTPo5 were found to be at risk for *Pseudokirchneriella subcapitata*, with HQ values of 1.1 and 1.2, respectively.

Table A3 shows the estimated HQs for the determined IRs concentrations based on chronic and acute toxicity data. Overall, DEET and Bayrepel do not pose serious risk to the selected biota. In the Sava and Adige Rivers, HQs, were between 10-4 and 10-2. However, few sampling areas are at risk; this is the case of CRN1 where HQs above 1 were estimated for Bayrepel in daphnids (HQ=3), algae (HQ=3.3), and fish (HQ=1.2). In Evrotas River sampling sites DSkallio29 and WWTPo5 were found to be at risk for *Pseudokirchneriella subcapitata*, with HQ values of 1.1 and 1.2, respectively.

As regards chronic (long-term) toxicity, HQs calculated in Evrotas River were above 1; as well as for acute toxicity assessment, DSkallio29 and WWTPo5 were at risk, with HQs of 1.2 and 1.3, respectively for *Daphnia magna*.

4. Conclusions

A fully automated analytical method has been developed and validated for the analysis of IRs in water samples using on-line SPE followed by liquid chromatography separation and tandem-mass spectrometry detection thanks to the use of the relatively new APPI ionization technique (SPE-HPLC-APPI-MS/MS). The described methodology is fast, selective, and sensitive,

allowing the detection of environmental concentrations of IRs. The developed method was applied to the analysis of usually used and new developed IRs in water samples from three European rivers with different features. Three compounds were identified, with high concentrations for DEET and Bayrepel, reaching values as high as 105 µg l⁻¹ (Bayrepel in Sava River). The distribution of IRs was unequal across the basins, likely as a consequence of the differences in the human presence and activities in the surrounding areas. Bayrepel and DEET were frequently observed in Sava and Evrotas. Adige River was the less polluted of the studied rivers. According to the estimated HQs, the reported concentrations posed ecological risk for DEET in two locations in the Evrotas River, and in one in the Sava. In view of these results, further research is needed to fully characterise the impact of these infochemical compounds in the environment, and the potential harmful effects that newly developed IRs may pose to the aquatic ecosystems.

Acknowledgements

We acknowledge the research funding from the Generalitat de Catalunya (Consolidated Research Group: Water and Soil Quality Unit 2014-SGR-418), and from GLOBAQUA project (603629-ENV-2013-6.2.1-Globaqua).

References

- [1] C. Brönmark, L. Hansson, Chemical communication in aquatic systems: an introduction, *Oikos*. 88 (2005) 103–109.
- [2] M. Nendza, U. Klaschka, R. Berghahn, Suitable test substances for proof of concept regarding infochemical effects in surface waters, *Environ. Sci. Eur.* 25 (2013) 21. doi:10.1186/2190-4715-25-21.
- [3] U. Klaschka, A new challenge—development of test systems for the infochemical effect, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16 (2009) 370–388.
- [4] U. Klaschka, The infochemical effect—a new chapter in ecotoxicology. Environmental science and pollution research, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 15 (2008) 452–462.
- [5] M. Lürling, M. Scheffer, Info-disruption: pollution and the transfer of chemical information between organisms, *Trends Ecol. Evol.* 22 (2007) 374–379.
- [6] D. Charlwood, Did Herodotus describe the first airborne use of mosquito repellents?, *Trends Parasitol.* 19 (2003) 555–556.
- [7] C. Peterson, J. Coats, Insect repellents-past, present and future, *Pestic. Outlook*. 12 (2001) 154–158.
- [8] D. Barnard, U. Bernier, K. Posey, R. Xue, Repellency of IR3535, KBR3023, para-menthane-3, 8-diol, and deet to black salt marsh mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the Everglades National Park, *J. Med. Entomol.* 39 (2002) 895–899.
- [9] S. Frances, D. Waterson, N. Beebe, R. Cooper, Field evaluation of repellent formulations containing deet and picaridin against mosquitoes in Northern Territory, Australia, *J. Med. Entomol.* 41 (2004) 414–417.
- [10] R. Natarajan, S.C. Basak, A.T. Balaban, J.A. Klun, W.F. Schmidt, Chirality index, molecular overlay and biological activity of diastereoisomeric mosquito repellents, *Pest Manag. Sci.* 61 (2005) 1193–1201. doi:10.1002/ps.1116.
- [11] C. Costantini, A. Badolo, E. Ilboudo-Sanogo, Costantini C, Badolo A, Ilboudo-Sanogo E. Field evaluation of the efficacy and persistence of insect repellents DEET, IR3535, and KBR 3023 against *Anopheles gambiae* complex and other Afrotropical vector mosquitoes., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98 (2004) 644–652.
- [12] D. Campos, C. Gravato, C. Quintaneiro, A.M.V.M. Soares, J.L.T. Pestana, Responses of the aquatic midge *Chironomus riparius* to DEET exposure, *Aquat. Toxicol.* 172 (2016) 80–85. doi:10.1016/j.aquatox.2015.12.020.
- [13] T.G. Osimitz, J. V. Murphy, Neurological Effects Associated with Use of the Insect Repellent N, N -Diethyl- m -toluamide (DEET), *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 35 (1997) 435–441. doi:10.3109/15563659709001224.
- [14] J.L. Sanford, S.A. Barski, C.M. Seen, J.C. Dickens, V.D.C. Shields, Neurophysiological and Behavioral Responses of Gypsy Moth Larvae to Insect Repellents: DEET, IR3535, and Picaridin, *PLoS One*. 9 (2014) e99924. doi:10.1371/journal.pone.0099924.
- [15] R.A. Alzogaray, Behavioral and Toxicological Responses of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) to the Insect Repellents DEET and IR3535, *J. Med. Entomol.* 53 (2016) 387–393. doi:10.1093/jme/tjv194.
- [16] E. von Elert, K. Preuss, P. Fink, Infodisruption of inducible anti-predator defenses through commercial insect repellents?, *Environ. Pollut.* 210 (2016) 18–26. doi:10.1016/j.envpol.2015.11.032.
- [17] P. Fink, J. Moelzner, R. Berghahn, E. von Elert, Do insect repellents induce drift behaviour in aquatic non-target organisms?, *Water Res.* 108 (2017) 32–38. doi:10.1016/j.watres.2016.10.083.

- [18] M. Brown, A.A. Hebert, Insect repellents: An overview, *J. Am. Acad. Dermatol.* 36 (1997) 243–249. doi:10.1016/S0190-9622(97)70289-5.
- [19] R. Rodil, M. Moeder, Stir bar sorptive extraction coupled to thermodesorption–gas chromatography–mass spectrometry for the determination of insect repelling substances in water samples, *J. Chromatogr. A.* 1178 (2008) 9–16. doi:10.1016/j.chroma.2007.11.051.
- [20] K.K. Barnes, D.W. Kolpin, E.T. Furlong, S.D. Zaugg, M.T. Meyer, L.B. Barber, A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States — I) Groundwater, *Sci. Total Environ.* 402 (2008) 192–200. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.04.028.
- [21] R. Rodil, J.B. Quintana, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, Multi-residue analytical method for the determination of emerging pollutants in water by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 2958–2969. doi:10.1016/j.chroma.2008.09.041.
- [22] T.M. Katz, J.H. Miller, A.A. Hebert, Insect repellents: Historical perspectives and new developments, *J. Am. Acad. Dermatol.* 58 (2008) 865–871. doi:10.1016/j.jaad.2007.10.005.
- [23] F.B. Antwi, L.M. Shama, R.K.D. Peterson, Risk assessments for the insect repellents DEET and picaridin, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 51 (2008) 31–36. doi:10.1016/j.yrtph.2008.03.002.
- [24] J. Seo, Y.-G. Lee, S.-D. Kim, C.-J. Cha, J.-H. Ahn, H.-G. Hur, Biodegradation of the Insecticide N,N-Diethyl-m-Toluamide by Fungi: Identification and Toxicity of Metabolites, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48 (2005) 323–328. doi:10.1007/s00244-004-0029-9.
- [25] S.D. Costanzo, A.J. Watkinson, E.J. Murby, D.W. Kolpin, M.W. Sandstrom, Is there a risk associated with the insect repellent DEET (N,N-diethyl-m-toluamide) commonly found in aquatic environments?, *Sci. Total Environ.* 384 (2007) 214–220. doi:10.1016/j.scitotenv.2007.05.036.
- [26] S. Weigel, U. Berger, E. Jensen, R. Kallenborn, H. Thoresen, H. Hühnerfuss, Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites, *Chemosphere.* 56 (2004) 583–592. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.04.015.
- [27] W.-R. Liu, J.-L. Zhao, Y.-S. Liu, Z.-F. Chen, Y.-Y. Yang, Q.-Q. Zhang, G.-G. Ying, Biocides in the Yangtze River of China: Spatiotemporal distribution, mass load and risk assessment, *Environ. Pollut.* 200 (2015) 53–63. doi:10.1016/j.envpol.2015.02.013.
- [28] A.M. Peck, Analytical methods for the determination of persistent ingredients of personal care products in environmental matrices, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 907–939. doi:10.1007/s00216-006-0728-3.
- [29] A. Standler, A. Schatzl, C.W. Klampfl, W. Buchberger, Determination of the Insect Repellent Bayrepel in Pool and Lake Water by Gas Chromatography after Preconcentration with Solid-Phase Extraction and Stir-Bar-Sorptive Extraction, *Microchim. Acta.* 148 (2004) 151–156. doi:10.1007/s00604-004-0277-4.
- [30] V. Matamoros, E. Jover, J.M. Bayona, Advances in the determination of degradation intermediates of personal care products in environmental matrices: a review, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 847–860. doi:10.1007/s00216-008-2371-7.
- [31] C. Wang, P.R. Gardinali, Detection and occurrence of microconstituents in reclaimed water used for irrigation – a potentially overlooked source, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 5925–5935. doi:10.1007/s00216-013-6799-z.
- [32] C. Wang, P.R. Gardinali, Comparison of multiple API techniques for the simultaneous detection of microconstituents in water by on-line SPE-LC-MS/MS, *J. Mass Spectrom.* 47 (2012) 1255–1268. doi:10.1002/jms.3051.
- [33] A. Navarro-Ortega, V. Acuña, A. Bellin, P. Burek, G. Cassiani, R. Choukr-Allah, S. Dolédec, A. Elozegi, F. Ferrari, A. Ginebreda, P. Grathwohl, C. Jones, P.K. Rault, K. Kok, P. Koundouri, R.P. Ludwig, R. Merz, R. Milacic, I. Muñoz, G. Nikulin, C. Paniconi, M. Paunović, M. Petrovic, L. Sabater, S. Sabater, N.T. Skoulikidis, A. Slob, G. Teutsch, N. Voulvoulis, D. Barceló, Managing the effects of multiple stressors on aquatic ecosystems under water scarcity. The GLOBAQUA project, *Sci. Total Environ.* 503–504 (2015) 3–9. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.06.081.
- [34] P. Gago-ferrero, N. Mastroianni, M.S. Díaz-cruz, D. Barceló, Fully automated determination of nine ultraviolet filters and transformation products in natural waters and wastewaters by on-line solid phase extraction – liquid chromatography – tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1294 (2013) 106–116.
- [35] I.H. Wang, V. Subramanian, R. Moorman, J. Burleson, J. Ko, Chiral high-performance liquid chromatography of N-octyl bicycloheptene dicarboximide and confirmatory studies using liquid chromatography–tandem mass spectrometry and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. Chromatogr. A.* 864 (1999) 271–281. doi:10.1016/S0021-9673(99)01044-4.
- [36] A.C. Chiaia-Hernandez, R. Ashauer, M. Moest, T. Hollingshaus, J. Jeon, P. Spaak, J. Hollender, Bioconcentration of Organic Contaminants

- in *Daphnia* Resting Eggs, *Environ. Sci. Technol.* (2013) 130909151641005. doi:10.1021/es401763d.
- [37] International Union of Pure and Applied Chemistry, Gold Book, Compendium of Chemical Terminology, 2014.
- [38] D. Aronson, J. Weeks, B. Meylan, P.D. Guiney, P.H. Howard, Environmental release, environmental concentrations, and ecological risk of N,N-Diethyl-m-toluamide (DEET), *Integr. Environ. Assess. Manag.* 8 (2012) 135–166. doi:10.1002/ieam.271.
- [39] S. Terzić, I. Senta, M. Ahel, M. Gros, M. Petrović, D. Barcelo, J. Müller, T. Knepper, I. Martí, F. Ventura, P. Jovančić, D. Jabučar, Occurrence and fate of emerging wastewater contaminants in Western Balkan Region, *Sci. Total Environ.* 399 (2008) 66–77. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.03.003.
- [40] D.R. Oros, W.M. Jarman, T. Lowe, N. David, S. Lowe, J.A. Davis, Surveillance for previously unmonitored organic contaminants in the San Francisco Estuary, *Mar. Pollut. Bull.* 46 (2003) 1102–1110. doi:10.1016/S0025-326X(03)00248-0.
- [41] S.T. Glassmeyer, E.T. Furlong, D.W. Kolpin, J.D. Cahill, S.D. Zaugg, S.L. Werner, M.T. Meyer, D.D. Kryak, Transport of Chemical and Microbial Compounds from Known Wastewater Discharges: Potential for Use as Indicators of Human Fecal Contamination, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 5157–5169. doi:10.1021/es048120k.
- [42] T.P. Knepper, Analysis and fate of insect repellents, *Water Sci. Technol.* 50 (2004) 301–308.
- [43] EMEA, Guideline on the Environmental Risk Assessment of medicinal products for human use, 2006.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500003978.pdf.
- [44] J. Weeks, P. Guiney, A. Nikiforov, Assessment of the environmental fate and ecotoxicity of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET), *Integr. Environ. Assess. Manag.* 8 (2012) 120–134. doi:10.1002/ieam.1246.
- [45] D.N. Roy, R. Goswami, A. Pal, The insect repellents: A silent environmental chemical toxicant to the health, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 50 (2017) 91–102. doi:10.1016/j.etap.2017.01.019.
- [46] M. Kuzmanovic, A. Ginebreda, D. Barceló, Risk assessment and prioritization of pollutants in continental Mediterranean waters based on hazard quotients, *Contrib. to Sci.* 10 (2014) 125–134. doi:10.2436/20.7010.01.197.

Table 1. Name, abbreviation, structure, CAS number, molecular weight (MW), partition coefficient octanol-water (Log Kow) and solubility of the target compounds.

Name	Abbreviation	CAS number	MW (g mol ⁻¹)	Structure	Log Kow ^a	Solubility (mg l ⁻¹) ^b
N, N-diethyl-m-toluamida	DEET	134-62-3	191.27		2.20	666
m-Toluamide	m-toluamide	618-47-3	135.06		1.18	8613
Ethyl 3-[acetyl(butyl)amino]propanoate	EBAAP	52304-36-6	215.15		1.51	1867
Hydroxyethyl isobutyl piperidine carboxylate	Bayrepel	119515-38-7	229.16		1.55	2886
N-octyl bicycloheptene dicarboximide	MGK-264	113-48-4	275.18		3.70	11.78
p-Menthane-3,8-diol	PMD	42822-86-6	272.15		2.29	670.7
Piperonyl butoxide	PBO	51-03-6	338.21		4.29	0.6384

a: Log Kow estimated with KOWWIN v1.67

b: Solubility in water at 25°C estimated with WSKOW v1.41

Table 2. SRM transitions, S-Lens, and collision energy (CE) for the target IRs.

Compound	SRM Transitions (m/z)	S-Lens (V)	CE (V)
DEET	192 → 91	58	29
	192 → 119		15
m-Toluanide	136 → 91	48	21
	136 → 77		24
EBAAP	216 → 77	52	28
	216 → 143		15
BayrepeI	230 → 130	47	16
	230 → 112		18
MGK-264	276 → 210	68	14
	276 → 98		23
PBO	356 → 177	49	16
	356 → 149		33
PMD	173 → 155	73	5
	173 → 110		8
Carbamazepine-d ₁₀	247 → 204	68	23
	247 → 204		40
Triphenilphosphate-d ₁₅	342 → 222	77	27
	342 → 81		36

Table 3. SPE-HPLC-APPI-MS/MS method performance. ILOD: instrumental limits of detection; ILOQ: instrumental limits of quantification; MLOD: method limits of detection; MLOQ: method limits of quantification; %RSD: relative standard deviation.

Compound	Retention time (min)	Calibration Range (ng l ⁻¹)	r ²	ILOD (pg)	ILOQ (pg)	Precision (% RSD)		MLOD (ng l ⁻¹)	MLOQ (ng l ⁻¹)	ME (%)
						Intraday	Interday			
DEET	5.83	1-500	0.999	0.5	1	5	12	0.1	0.2	10
m-Toluamide	5.26	3-500	0.998	1.0	3.5	6	14	0.2	0.7	9
BayrepeI	5.92	1-500	0.996	1.5	4.5	7	9	0.3	0.9	12
MGK 264	7.12-7.41	1-500	0.999	1.0	3	7	12	0.1	0.4	13
PBO	7.67	3-500	0.999	7.0	23	13	15	1.4	4.6	14

Table 4. Mean concentration, standard deviation (SD) and frequency of detection (%) of target IRs in the three river basins studied. n.d.: not detected; n.a.: not applicable.

		DEET	m-Toluamide	Bayrepel	MGK-264	PBO
Sava	Mean concentration (ng l ⁻¹)	12.34	n.d.	57.28	n.d.	n.d.
	SD (ng l ⁻¹)	25.14	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Frequency (%)	100	0	100	0	0
Evrotas	Mean concentration (ng l ⁻¹)	573.24	n.d.	19.38	n.d.	19.33
	SD (ng l ⁻¹)	n.a.	n.a.	57.14	n.a.	n.a.
	Frequency (%)	100	0	100	0	13
Adige	Mean concentration (ng l ⁻¹)	6.41	n.d.	20.15	n.d.	n.d.
	SD (ng l ⁻¹)	0.56	n.a.	24.37	n.a.	n.a.
	Frequency (%)	17	0	17	0	0

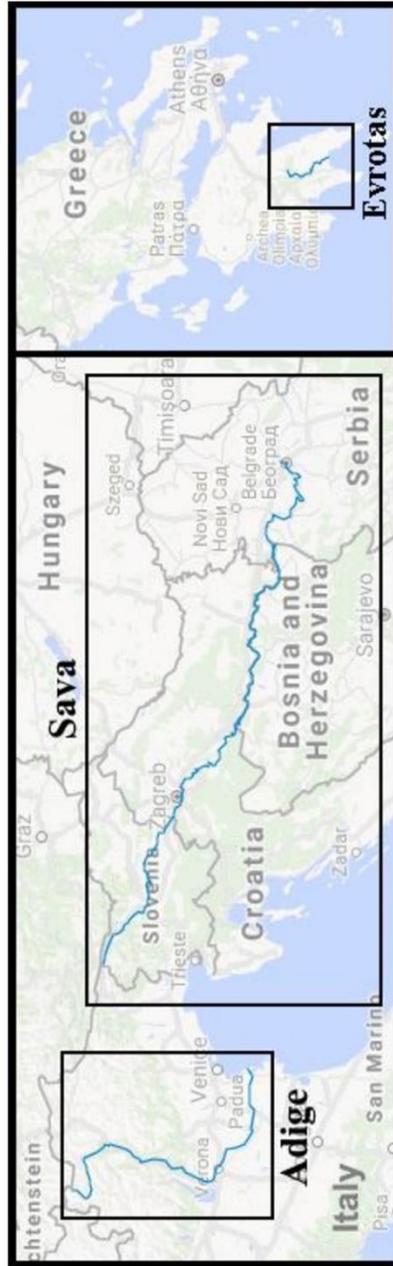


Figure 1. Location of the three studied rivers.

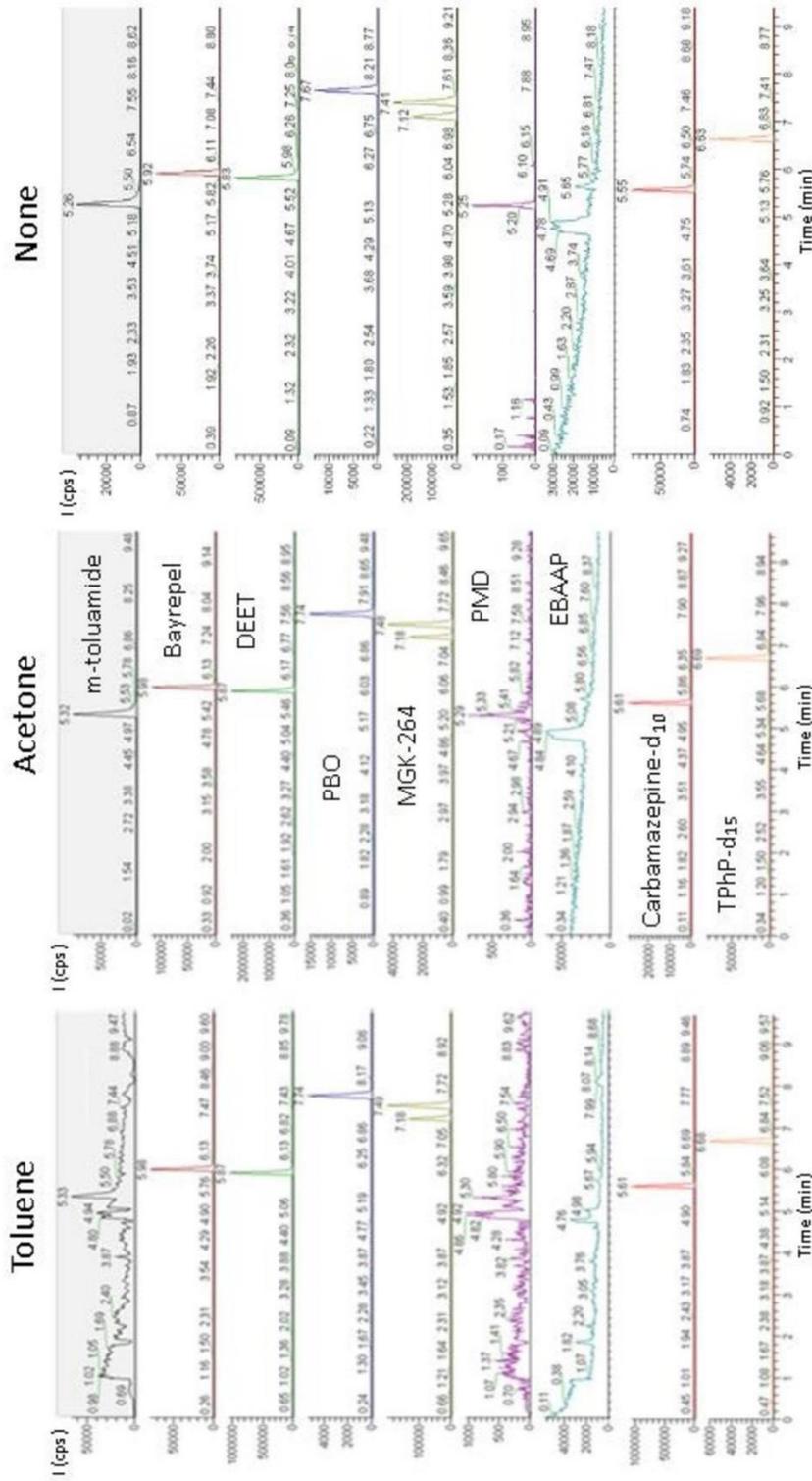


Figure 3. Reconstructed ion chromatograms of a standards solution (50 ng l-1) in presence of doping agents. I (cps): signal intensity.

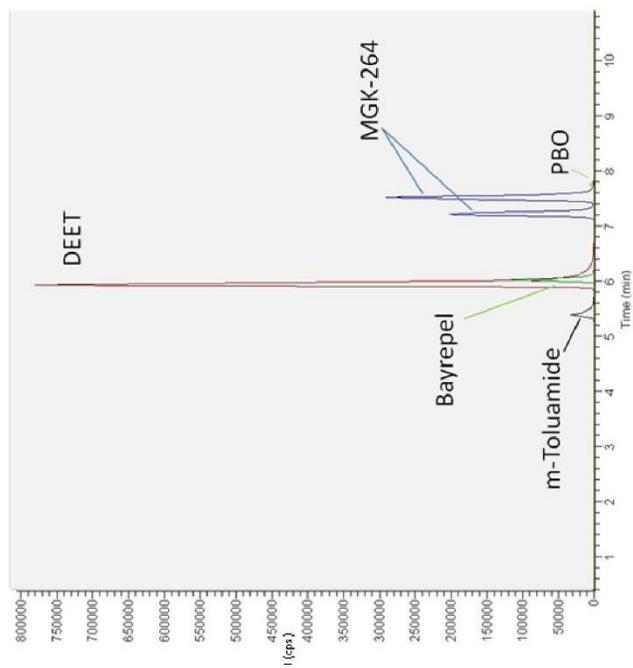
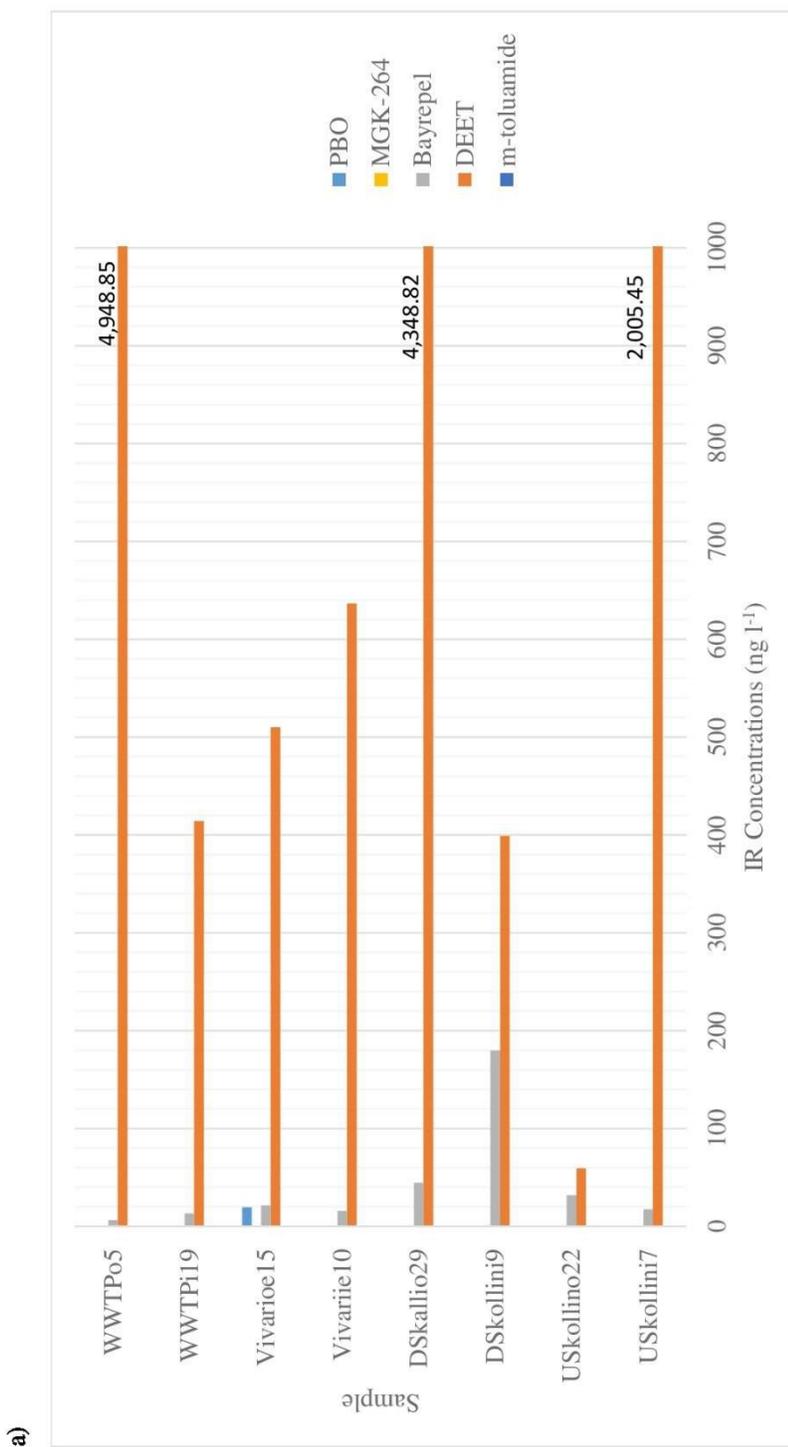
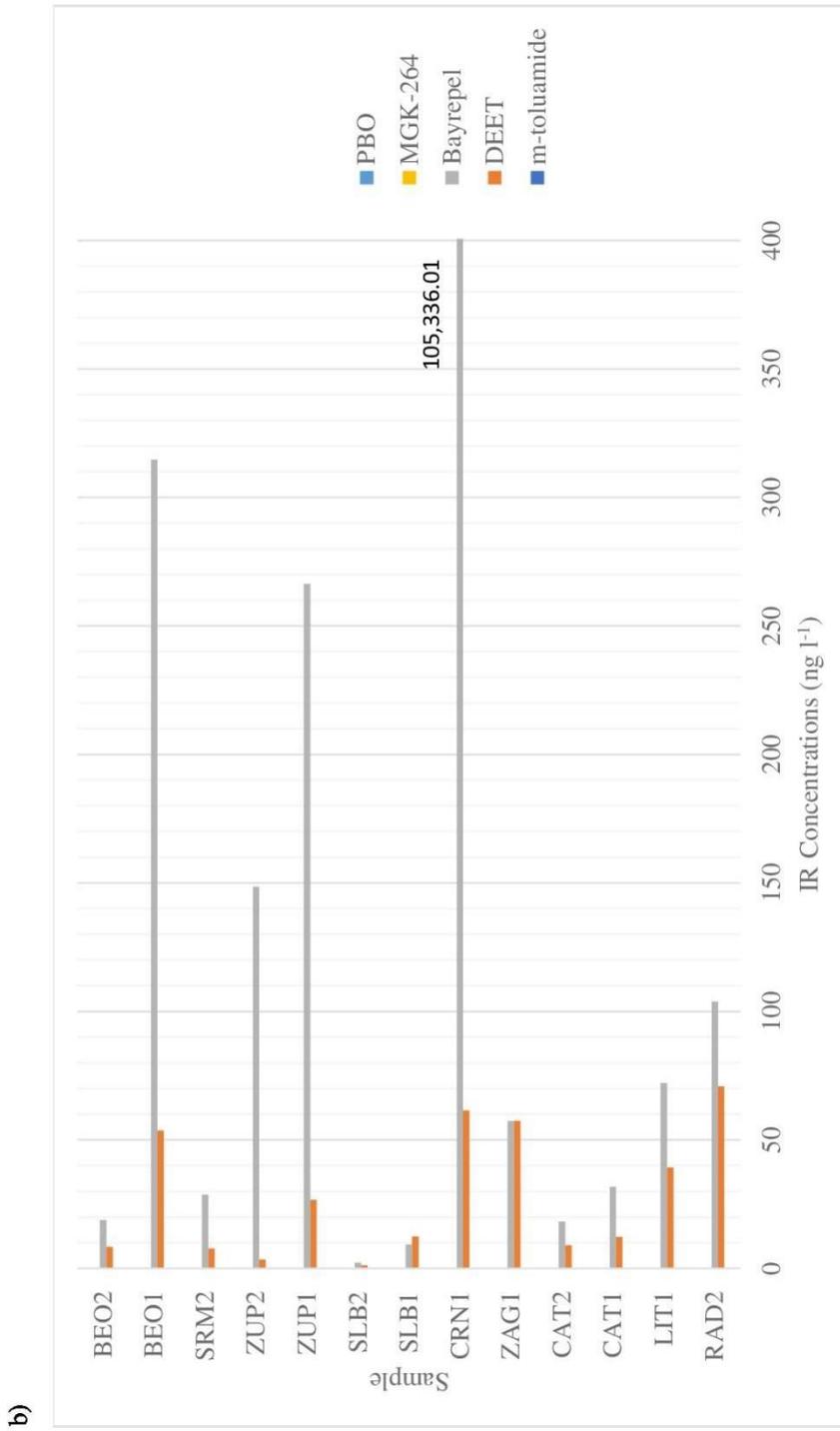


Figure 4. Reconstructed ion chromatogram of a standards solution (50 ng l⁻¹) recorded by following the validated method. I (cps): signal intensity.





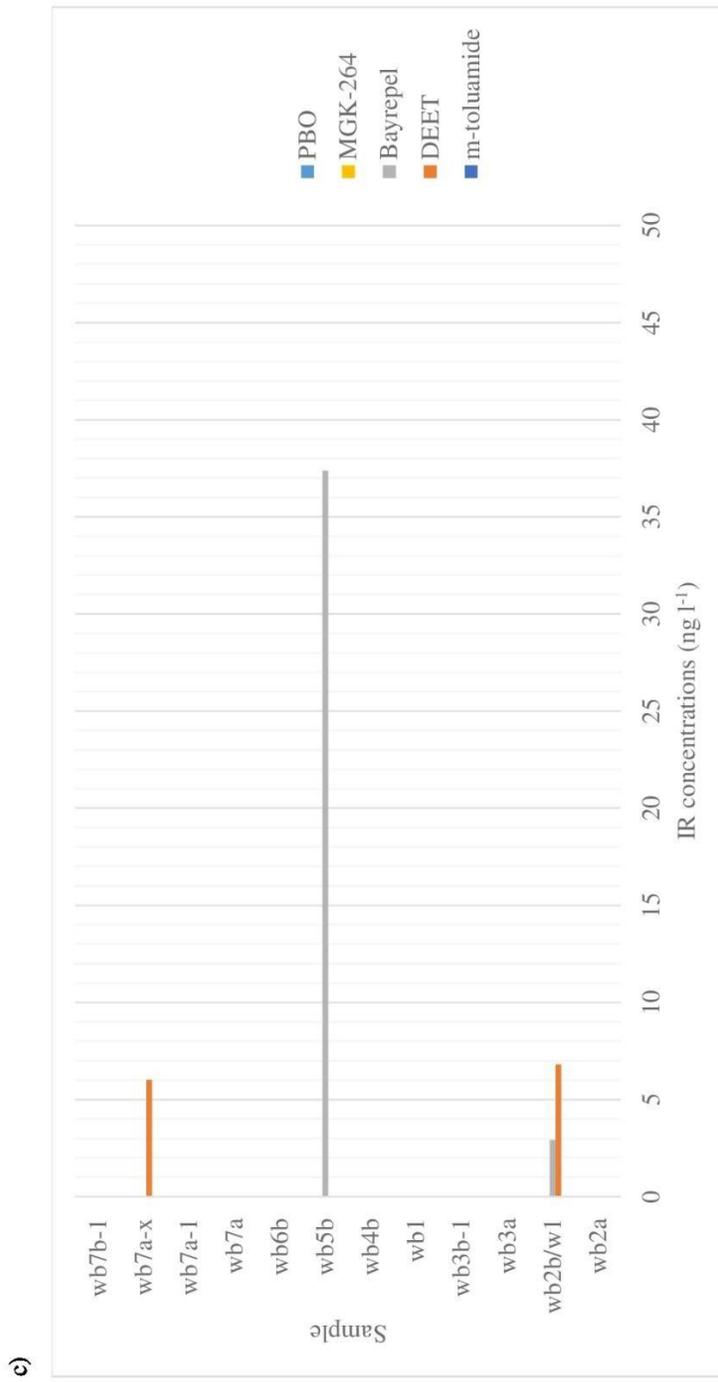


Figure 5. IRs concentrations in the samples from the rivers Evrotas (a), Sava (b), and Adige (c).

Publicación Nº 3

Sediments as a sink for UV filters and benzotriazoles: The case study of Upper Iguaçu watershed, Curitiba (Brazil)

Por

A. Mizukawa, D. Molins-Delgado; J.C. Rodrigues Azevedo; C.V. Scapulatempo Fernandes;
M.S. Díaz-Cruz; D. Barceló

en

Environmental Science and Pollution Research, vol. 24, pp. 18284-18294, 2017

Atención¡¡

Por razones de copyright, las páginas 72 a 82 de la tesis, que contienen el artículo citado, deben consultarse en la web del editor
<https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-017-9472-9>

Información adicional disponible en el Anexo IV

2.2 Discusión

2.2.1 Metodologías analíticas

Las metodologías descritas en las publicaciones N° 1, N° 2 y N° 3 permitieron determinar la presencia de los PCPs seleccionados (UV-Fs, biocidas e IRs). Los tres estudios recogen distintos compartimentos ambientales (aguas superficiales, sedimento y material particulado en suspensión) por lo que las metodologías se desarrollaron con las diferencias fisicoquímicas de las matrices y los compuestos en mente. Se desarrollaron métodos que fueran selectivos, sensibles, requirieran cantidades de muestra reducidas, un pretratamiento de ésta de lo más simple posible y tiempos de análisis cortos. Con todo esto en cuenta, se optó por metodologías de análisis lo más automáticas y costo-efectividad posibles.

En el caso de las metodologías para el análisis de UV-Fs en fase acuosa se desarrolló un método tomando como base una previamente descrita por Gago-Ferrero et al. [173] para el análisis de UV-Fs en aguas superficiales y residuales en línea con un consumo de muestra mínimo. En ella, la separación de los compuestos se lleva a cabo mediante una extracción en fase sólida (SPE) en línea con la separación cromatografía y detección por espectrometría de masas. Las columnas de SPE consisten en unos cartuchos rellenos de una fase polimérica que permite la retención de compuestos de diferentes polaridades. Con una capacidad de preconcentración de 1.000 veces, los cartuchos permiten realizar el análisis con volúmenes pequeños de muestra, del orden de unos pocos mililitros (aprox. 5 ml).

La SPE, al estar en línea con el cromatógrafo de líquidos y el espectrómetro de masas permite minimizar las pérdidas de analito y supone un ahorro de disolvente, puesto que la elución de los compuestos se lleva a cabo usando la propia fase móvil cromatográfica y, al ser un análisis en línea, no requiere necesariamente del cálculo de recuperaciones, puesto que tanto las rectas de calibración como los patrones internos utilizados para la determinación pasan por el mismo proceso de análisis. La única desventaja que la metodología presenta reside en la imposibilidad de repetir el análisis de la muestra, ya que todo el extracto SPE es inyectado en cada análisis. El análisis se llevó a cabo en un equipo HPLC-MS/MS, cuyo análisis espectrométrico se llevó a cabo usando una fuente de ionización por electrospray (ESI) y un analizador híbrido cuadrupolo-trampa de iones lineal (QqLIT) para una máxima sensibilidad.

La misma filosofía se siguió para el desarrollo de la metodología de análisis de IRs en muestras acuosas, pero el equipo utilizado fue diferente. En este caso, se tuvo acceso a un equipo que

disponía de un módulo de análisis en línea basado en columnas de SPE reutilizables, en vez de un solo uso. Esto se traduce en que, pese a ser la columna de SPE una inversión económica inicial considerable, el uso que de ella se puede hacer es más extenso, y por ende queda amortizada antes del final de la vida de la columna. Por lo demás, el principio es el mismo: se requiere de 5 ml de muestra, se eluyen los compuestos mediante la fase móvil y se reducen los tiempos de análisis.

El cambio de equipo también hace referencia al espectrómetro de masas y fuente de ionización. En el caso del detector era un triple cuadrupolo (QqQ) y la fuente de ionización era de fotoionización a presión atmosférica (APPI). El uso de esta fuente de ionización permitía realizar análisis con compuestos dopantes que favorecieran la ionización. Para ello, y como está descrito en la Publicación N° 2, se probó el uso de acetona y tolueno con resultados positivos en ambos casos, es decir incrementó la señal de los analitos con respecto al análisis sin estos aditivos, pero la falta de disponibilidad de una bomba externa para administrar agentes dopantes durante sesiones de análisis de más de diez muestras imposibilita su aplicación para análisis de rutina.

Por último, el análisis de matrices sólidas (sedimentos y material particulado en suspensión) se realizó adaptando una metodología previamente desarrollada para el análisis de UV-Fs en sedimentos [91]. El pretratamiento de la muestra se basaba en una extracción mediante líquidos presurizados (PLE). Este tipo de técnica permite realizar la purificación de la muestra a la par que la extracción de los analitos mediante la adición de una adsorbente (alúmina neutra activada, en este caso) y la inyección de líquidos a elevada temperatura y presión, lo que permite ahorrar tiempo de análisis al reducir el número de pasos necesarios. La cantidad de muestra requerida es reducida: en el caso de los sedimentos se necesita 1 g liofilizado, pero en el caso del particulado la cantidad puede ser mucho menor e incluye los filtros utilizados para recuperarlo de las muestras acuosas. En este caso, la PLE no se realiza en línea, pero el análisis se realizó mediante HPLC-MS/MS bajo las mismas condiciones experimentales de los dos análisis anteriores.

En todos los casos, los análisis se han de adaptar a la existencia de los estándares puros y la de patrones internos isotópicamente marcados. Un análisis ideal requeriría de un patrón interno marcado con deuterio o con carbono-13 por cada analito, pero para muchos de los contaminantes emergentes no son comerciales y en la mayoría de casos son de elevado coste económico.

En el caso de los UV-Fs y las benzotriazoles los patrones internos disponibles son BP3-d₅, 4MBC-d₄ y 2-(2H-benzotriazol-2-il)-4-metil-6-(2-propelil)fenol (AllylBZT). Este último ejemplifica la problemática existente, puesto que para el análisis de UV-Fs derivados de la BZT no existían

compuestos marcados isotópicamente y se tuvo que recurrir a un compuesto no descrito en el medio ambiente como patrón interno.

Para el análisis de IRs, se recurrió al uso de la carbamazepina-d₁₀ y del trifenil fosfato-d₁₅. En este caso la falta de acceso a los patrones marcados isotópicamente en el momento del análisis llevó a la búsqueda de substitutos. Los patrones seleccionados corresponden a compuestos que han sido analizados con anterioridad en otros estudios junto al DEET. Sus propiedades fisicoquímicas y su separación cromatográfica son similares, y durante el análisis no se observó problema alguno debido a su uso. De todas maneras, la tendencia actual parece ser la de ofrecer una mayor oferta de compuestos marcados a medida que el interés en ellos aumenta.

2.2.2 PCPs en aguas superficiales

En ambos estudios (Publicaciones N° 1 y 2) se investigan escenarios ambientales donde se llevan a cabo actividades de diferente índole, y en todas ellas se observan PCPs en sus aguas superficiales.

En la Publicación N° 1 se presenta el caso de estudio de una zona densamente poblada y urbanizada. El Área Metropolitana de Barcelona alberga una población de 4,8 millones de habitantes y se vertebrada alrededor de la ciudad de la que recibe su nombre y de los dos ríos que la rodean: el Besòs y el Llobregat. La hidrología de estos ríos es típicamente mediterránea, con grandes variaciones del caudal a lo largo del año debido a la alternancia entre periodos de abundancia de agua (normalmente entre finales de otoño y principios de primavera) y periodos secos (el resto del año). Los dos ríos son también diferentes en otro aspecto, el caudal medio. El río Llobregat es 5 veces más caudaloso que el Besòs. Sus cuencas son diferentes y cubren una superficie total de 5.000 y 1.038 km², respectivamente.

Desde un punto de vista histórico, estos dos ríos han sufrido de graves episodios de contaminación, especialmente debidos a la gran densidad de población, la presencia de uno de los tejidos industriales más importantes de España y a la falta de EDARs hasta tiempos relativamente recientes. Con estos antecedentes, encontrar contaminantes en sus cuencas y en los compartimentos dependientes de sus aguas es algo esperable.

En la Publicación N° 2 se presenta el caso de estudio de otros tres ríos europeos. Encontramos en el río Eurotas (Laconia, Grecia) otro río de características mediterráneas, pero con otro tipo de impactos. La cuenca del río Eurotas comprende un total de 2.418 km² y presenta un caudal medio altamente variable y sus aguas se ven sobreexplotadas por las actividades agrícolas que se llevan a cabo a lo largo de su cuenca. El río presenta la peculiaridad de contar solo con una

EDAR en su cuenca, localizada en la ciudad de Esparta, por lo que las poblaciones bañadas por sus aguas vierten en él sus aguas residuales sin tratar. Debido a ello, el cauce medio del río es considerado como una zona de referencia de contaminación.

Por otra parte, encontramos el río Sava. Éste es un río transnacional localizado en la península de los Balcanes y afluente del Danubio. A lo largo de sus 97.713 km² se concentran alrededor de 8 millones de habitantes repartidos entre Eslovenia, Croacia, Bosnia y Herzegovina y Serbia. Dada su longitud y su caudal medio (1.700 m³ s⁻¹), es un río navegable durante la mayor parte de su recorrido y una de las principales arterias económicas de la región. En sus orillas se llevan a cabo todo tipo de actividades económicas, ya sean del sector primario, secundario o terciario, por lo que sus aguas reciben la presión de multitud de focos de contaminación.

El último de los ríos de estudio es el Adigio. Éste es un río de origen y características plenamente alpinas. El cauce alto del río nace de un glaciar en los Alpes italianos, en una zona de importancia turística dada la existencia de instalaciones para la práctica de deportes de invierno, como pistas de esquí, resorts y alberges. El río fluye hacia la Padania y desemboca en el mar Adriático. Su caudal medio (235 m³ s⁻¹) varía estacionalmente, con los mayores caudales coincidiendo con el periodo estival y la fusión de las nieves alpinas.

La Tabla 5 muestra las concentraciones medias de PCPs observadas en los distintos ríos. Se incluyen los resultados presentes en el estudio realizado por Mandaric et al. [174] (Anexo III - Publicación N^o A2).

En la Publicación N^o 1 se pueden observar perfiles diferentes en los dos ríos estudiados. Por una parte, las concentraciones medias de UV-Fs en el río Besòs fueron generalmente superiores a aquellas presentes en el río Llobregat. Las benzofenonas BP1 y BP3 fueron los UV-Fs, a excepción de los benzotriazoles que alcanzaron concentraciones mayores, hasta niveles máximos de más de 50 ng l⁻¹. En sus aguas se observó la presencia de 4HB, producto del metabolismo de la BP3 observado en peces, huevos de aves y seres humanos. De igual manera, EtPABA se encontró a concentraciones similares a los de las benzofenonas. También se observaron concentraciones de hasta 18,2 ng l⁻¹ de 4MBC.

Por otra parte, en el río Llobregat se observó un patrón similar. Las concentraciones de BP1 y BP3 alcanzaron valores máximos de cerca de 40 ng l⁻¹, 4HB presentó concentraciones similares a las del Besòs y se cuantificaron valores similares del otro metabolito de la BP3, 4DHB, detectado igualmente en peces, huevos de aves y seres humanos. Dos de los compuestos

estudiados alcanzaron concentraciones superiores en el Llobregat; tanto 4MBC como EtPABA duplicaron sus niveles con respecto al Besòs, 34,3 y 111,9 ng l⁻¹, respectivamente.

A nivel global, era esperable encontrar concentraciones de benzofenonas y EtPABA. Como se muestra en la Tabla 3, las propiedades físico-químicas de estos compuestos facilitan su presencia en el agua. Son menos lipofílicos que 4MBC y mucho más solubles que éste. La presencia de 4HB y 4DHB indica actividad biológica, puesto que están relacionados principalmente con procesos de transformación metabólicos.

En ambos ríos los compuestos más abundantes fueron BZT y MeBZT. En Besòs y Llobregat, las concentraciones máximas de BZT fueron de 4.852 y 8.529 ng l⁻¹, y las de MeBZT alcanzaron los 5.000 y 7.181 ng l⁻¹. Las concentraciones mínimas de ambos compuestos en el Besòs no bajaron de 2.498 ng l⁻¹, a diferencia del Llobregat, donde las concentraciones mínimas estuvieron muy por debajo de ese valor, en concreto 23,7 ng l⁻¹, dos órdenes de magnitud inferior.

Estos dos compuestos presentan una problemática concreta. BZT y MeBZT son dos moléculas altamente versátiles que no solo se usan como UV-Fs o biocidas, sino que poseen propiedades antioxidantes y su uso se extiende a detergentes y anticongelantes. Las concentraciones encontradas en las aguas reflejan un elevado uso por parte de todas sus aplicaciones posibles y una baja degradabilidad. Ambas moléculas son persistentes en el medio acuático, altamente solubles y poco lipofílicas, por lo que su presencia en aguas, especialmente de zonas altamente pobladas es esperable.

No obstante, la distribución de estos compuestos a lo largo de las cuencas estudiadas es distinta. Por una parte, existen diferencias de concentración dependiendo de la parte del curso del río estudiado. Las concentraciones medias de PCPs a lo largo de toda la cuenca del río disminuyen en dirección hacia su desembocadura. La hipótesis principal para explicar este hecho es el efecto de dilución, puesto que el caudal de agua aumenta en las partes bajas de ambos ríos cercanas a sus desembocaduras.

El caudal de ambos ríos constituye un factor significativo en el nivel de concentración de los contaminantes. El río Llobregat es un río más caudaloso que el Besòs, con un volumen de agua 5 veces superior. Por otra parte, la escasez de agua del río Besòs no permite una dilución significativa de los contaminantes. El caudal tanto en el curso alto como en el curso bajo no presenta variaciones importantes, por lo que las concentraciones se mantienen en el mismo orden de magnitud a lo largo de la cuenca.

Tabla 5. Concentraciones máximas y mínimas de PCPs en muestras de agua superficial.

Categoría	Región	España				Grecia		Balcanes		Italia		
	Cuenca	Besòs		Llobregat		Eurotas		Sava		Adigio		
	Concentración (ng l ⁻¹)	Mín	Máx	Mín	Máx	Mín	Máx	Mín	Máx	Mín	Máx	
UV-Fs ^a		BP1	14,5	51,8	5,3	28,3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,01	2,6
		BP3	15,9	52,2	4,4	38,5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1,6	5.720,0
		DHMB	n.a. ^f	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	18,8	22,1
		4HB	10,1	12,1	n.a.	10,5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
		4DHB	n.a.	n.a.	n.a.	9,2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
		4MBC	13,1	18,2	18,2	34,3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	61,7
		ODPABA	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	33,2	748,3
		EtPABA	7,7	51,7	5,5	111,9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	6,2	88,6
	Bio. ^b	BZT	2.498,0	4.852,8	23,7	8.529,8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1,1	239,0
		MeBZT	3.844,5	5.004,0	66,9	7.181,4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1,5	34,8
		DMeBZT	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	3,0	32,0
		TBHPBT	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	3,6	171,7
		UVP	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	14,2	124,2
		UV328	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	52,7	669,2
UV329		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	44,0	553,3	
	Cons. ^c	ErPB	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	46,7	171,4
	Frag. ^d	ADBI	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	8,36	74,3
	IRs ^e	DEET	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	59,2	4.948,9	1,2	61,5	6,0	6,8
		Bayrepel	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	6,5	179,6	2,2	105.336,0	2,92	37,4
		PBO	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	19,3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

^a Filtros UV^b Biocidas^c Conservantes^d Fragancias^e Repelentes de insectos^f no aplicable

Los UV-Fs en el río Llobregat presentaron un importante aumento de la concentración en el curso medio. La zona en cuestión atraviesa zonas de denso tejido industrial. También se observa que las concentraciones de PCPs aumentan inmediatamente después de las EDARs. Puesto que el baño recreativo en las aguas de ambos ríos en las partes del cauce estudiado es bastante limitado o inexistente, todo parece indicar que los efluentes de las EDARs son los principales contribuyentes de PCPs al medio acuático en zonas densamente pobladas.

Es importante tener en cuenta las variaciones estacionales. Especialmente en los ríos mediterráneos. Es bien conocido que el uso de los PCPs depende de la estación [174] y que esta clase de ríos depende enormemente de las aportaciones en forma de lluvia que ocurren principalmente entre finales de otoño y principios de primavera. Es esperable que en el periodo estival las concentraciones de PCPs en las aguas del Besòs y del Llobregat sean mayores que las reportadas en la Publicación N° 1 debido a la menor cantidad de agua capaz de diluirlos y a su mayor uso.

La contaminación del río Besòs no solo abarca sus aguas superficiales. En un estudio realizado por Serra-Roig et al. [87] se observó que las aguas subterráneas del acuífero localizado bajo el río contenía residuos de PCPs. En este caso se constató la presencia de UV-Fs, benzotriazoles y parabenos a concentraciones comprendidas entre 30 y 1980 ng l⁻¹. BZT y MeBZT eran los compuestos con las concentraciones mayores en el acuífero, lo que parece reflejar la abundancia de estos mismos compuestos en las aguas del río.

El estudio se organizó en tres campañas y se pudo comprobar la persistencia de los PCPs en el acuífero. En el estudio se explica que una vez infiltrados, los procesos de desnitrificación y de reducción en condiciones anaerobias del acuífero se encargan de eliminar la mayoría de las benzofenonas y de los parabenos. No obstante, 4MBC, BZT, MeBZT y MePB demostraron ser los compuestos más persistentes, por lo que su destino en los acuíferos genera especial preocupación y debería ser estudiado en profundidad.

En el caso del Adigio existen dos estudios (Publicación N° 2 y [174]) que aportan datos sobre la presencia de PCPs a lo largo del curso alto del río. El objetivo del estudio en la región fue evaluar el impacto de las actividades turísticas de invierno sobre las aguas del río.

Los compuestos BP1 y el metabolito dihidroxi metoxi benzofenona (DHMB) se encontraron presentes a bajas concentraciones, entre 0,01 y 22,1 ng l⁻¹, mientras que las concentraciones de BP3 alcanzaron valores muy superiores de hasta 5.720 ng l⁻¹. Las concentraciones de EtPABA alcanzaron valores de 88,6 ng l⁻¹, del mismo orden que las de 4MBC (61,7 ng l⁻¹), aunque su

cuantificación se redujo a una única muestra. Por otra parte, los compuestos más lipofílicos (ODPABA y los derivados de la BZT) alcanzaron concentraciones comprendidas entre 124,2 y 669,2 ng l⁻¹. BZT fue el benzotriazol cuyas concentraciones alcanzaron valores más altos (239,0 ng l⁻¹), un orden de magnitud más altas que las de MeBZT y DMeBZT. En el estudio se investigaron las diferencias estacionales, observándose un incremento en el uso de los UV-Fs (especialmente BP3), alcanzando concentraciones totales 2,5 veces más elevadas en verano que en invierno. No obstante, el uso de UV-Fs no pudo correlacionarse con la llegada de los turistas durante el periodo invernal, indicando un uso generalizado a lo largo de todo el año por la población residente.

Por otra parte, el conservante EtPB fue detectado sólo en invierno a concentraciones inferiores a 171,4 ng l⁻¹, mientras que la fragancia Celestolide (ADBI) fue detectada en dos muestras durante el mismo periodo a concentraciones que no superaron los 77,3 ng l⁻¹. La presencia de IRs en la región fue escasa: DEET y Bayrepel se detectaron únicamente en dos muestras a concentraciones inferiores a 37,4 ng l⁻¹. Únicamente la campaña de invierno fue estudiada en el caso de los IRs, por lo que su ausencia podría deberse a las temperaturas bajas de la región y bajo las cuales existe una población de insectos muy baja, no haciendo necesario el uso de repelentes.

En los ríos Eurotas y Sava solo se estudió la presencia de IRs. La contaminación por IRs de las aguas del río Eurotas fue probada a lo largo de todo el curso del río. Se observaron elevadas concentraciones de DEET y la presencia de Bayrepel fue casi constante.

Es remarcable que las concentraciones de IRs en el curso alto del río son ya de por sí elevadas. La región es utilizada como zona de estudio para las épocas de sequías, por lo que es común que el volumen de agua de la misma sea bastante reducido, incrementando el efecto aparente de la contaminación por falta de dilución de los contaminantes. En el curso medio, donde se encuentra la zona de estudios de medio contaminado, se pudo comprobar que el impacto de las actividades y los núcleos agrícolas que pueblan la zona, en ausencia de otras actividades económicas, también contribuyen con la presencia de este IR, al encontrarse residuos del mismo en las aguas del río. Las concentraciones vuelven a ser altas en el curso bajo, pasada la ciudad de Esparta.

Terzic et al. [74] comprobaron que el uso que se le da a la región es uno de los factores claves para la presencia de esta clase de compuestos. Generalmente, las zonas agrícolas contribuyen en menor proporción a la presencia de IRs que las zonas urbanas. Conociendo esto, la presencia de IRs en los estos puntos de muestreo del curso bajo parecen responder a la cercanía al núcleo

urbano. Así mismo, como ya se comentó al describir la zona, Esparta posee la única EDAR presente en el río, por lo que la contribución del efluente a la contaminación del río es un factor importante a tener en cuenta.

El Sava es el río más caudaloso y largo de los estudiados. En el curso alto se esperaría que presentase un curso similar al Adigio, puesto que nace en los Alpes como aquel, y a lo largo de su curso era esperable encontrar incrementos de concentración de contaminantes dependiendo del uso que a cada tramo de su curso se diera.

Por el contrario, una de las concentraciones más altas registradas para IRs corresponde a la parte más alta del curso del río. La zona se encuentra internada en los Alpes eslovenos y la presencia de concentraciones elevadas a esta altura del río solo puede ser atribuida a las actividades turísticas. A lo largo de su cauce, las concentraciones de IRs aumentaban puntualmente en las proximidades de los grandes núcleos urbanos, con valores generalmente menores después de cruzar las grandes ciudades. Los IRs son generalmente poco lipofílicos y bastante solubles, por lo que son candidatos a permanecer en la fase acuosa. Su eliminación en las EDARs no es completa, por lo que la llegada de éstos a las aguas naturales principalmente sería por medio del efluente. No obstante, el uso recreativo de las aguas del río no debe descartarse. Desde hace años, la región padece de una plaga de mosquitos, por lo que el uso de repelentes de insectos y su emisión al medio ambiente es constante [74].

A diferencia del Eurotas, donde DEET era el IR predominante, Bayrepel se encuentra en concentraciones superiores a lo largo de todo el cauce. Esto podría tener sus raíces en un proceso de sustitución del uso de los productos. En 1999 un estudio [175] realizado en aguas superficiales alemanas comprobó que desde la introducción de Bayrepel en el mercado, las concentraciones de este compuesto se habían incrementado en detrimento de la de DEET, llegando a sustituirlo como el repelente con las concentraciones más elevadas en el país. En el año 2008, el mismo estudio por Terzic et al. [74] menciona que este fenómeno, pero los resultados aportados en su equipo indicaban que pese al incremento de concentraciones de Bayrepel en la región, éste no se había convertido aún en el repelente de uso mayoritario. Se puede afirmar que, para las fechas en la que el muestreo de las aguas superficiales de la Publicación N° 2 tubo lugar, la sustitución se había completado.

2.2.3 PCPs en sedimentos y particulado en suspensión

La formación del sedimento depende de la acción del agua sobre el terreno y éste es arrastrado, depositado y resuspendido dependiendo de la acción de la corriente. Al estar tan íntimamente

relacionado con los cursos de agua es esperable que la presencia de contaminantes en la columna de agua se traduzca en la presencia de esos contaminantes en la fase sólida y que ésta actúe como repositorio ambiental final. La Tabla 6 contiene las concentraciones máximas y mínimas de sedimentos de los estudios realizados.

Los sedimentos y material particulado en suspensión (compuesto de partículas de origen mineral y materia orgánica) analizados en los estudios incluidos en este capítulo provienen de las cuencas de los ríos Llobregat, Besòs (ambos de España), Adigio (Italia), e Iguazú y afluentes (Brasil).

Como ya se ha discutido en la sección anterior, las aguas de los ríos Llobregat, Besòs y Adigio se encuentran impactadas ya sea por una gran densidad de población o por las actividades del sector terciario. Es esperable que los sedimentos de dichas aguas presenten concentraciones de contaminantes orgánicos, especialmente de aquellos menos solubles y más lipofílicos.

En el caso de la cuenca del Besòs se detectó la presencia de tres PCPs en sus sedimentos, dos lipofílicos (OC y EHMC) y BZT. En este caso, se observó que las concentraciones de EHMC alcanzaban valores significativos (más de 200 ng g⁻¹ dw). Este mismo patrón fue observado en los sedimentos provenientes del río Llobregat, con la detección adicional de MeBZT, donde la presencia de compuestos lipofílicos fue similar (104,7- 132,2 ng g⁻¹ dw). Refiriéndose al estudio del particulado de los dos ríos, se detectaron concentraciones de diez PCPs, a concentraciones inferiores a los límites de cuantificación. En los sedimentos de ambos ríos se pudo constatar la presencia de BZT a concentraciones inesperadamente altas para un compuesto soluble e hidrofílico, alcanzando concentraciones máximas de 230,9 ng g⁻¹ dw.

Las concentraciones en los sedimentos del Adigio siguen el mismo patrón. A lo largo del curso del río, se detectaron cinco PCPs, de los cuales los más lipofílicos se encontraron en el rango 0,8 y 633,3 ng g⁻¹. El curso bajo del río registró las concentraciones más elevadas de estos compuestos a lo largo del año, posiblemente debido al arrastre y deposición de los sedimentos desde el curso alto.

La cuenca del río Iguazú presenta ciertas peculiaridades. Alrededor de tres millones de habitantes habitan en las proximidades del río y sus actividades han acabado impactando sus aguas. La zona es la principal fuente de energía hidrogeológica de la región, además de ser la fuente principal de suministro de agua. La cuenca, de 2.500 Km², alberga un total de treinta EDARs, pero se estima que solo se recoge el 60 % de las aguas residuales urbanas, y de éstas únicamente el 89% son tratadas, lo que contribuye a la contaminación de las aguas de la región.

Tabla 6. Concentraciones máximas y mínimas de PCPs en sedimentos.

Categoría	Región	España				Italia		Brasil							
	Cuenca	Besòs		Llobregat		Adigio		Palmital		Atuba		Belem		Iguaçu	
	Concentración (ng g ⁻¹ dw)	Mín	Máx	Mín	Máx	Mín	Máx	Mín	Máx	Mín	Máx	Mín	Máx	Mín	Máx
UV-Fs ^a	BP1	n.a. ^c	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	31,7	61,8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	12,7	53,2
	BP3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	6,8	32,7	5,8	36,8	9,4	50,9	5,7	67,0
	4HB	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	26,1	39,5	n.a.	26,4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	4MBC	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,3	11,1	38,7	45,8	38,6	49,6	38,9	43,5	n.a.	n.a.
	OC	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,7	633,3	26,0	117,0	10,4	322,2	48,5	313,8	39,7	160,8
	EHMC	n.a.	226,6	104,7	132,2	n.a.	n.a.	21,1	43,1	21,4	121,2	54,8	166,8	4,6	129,6
	EtPABA	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,8	1,39	53,5	151,8	42,8	76,8	n.a.	141,6	n.a.	n.a.
	Bio. ^b	BZT	n.a.	128,4	56,0	230,9	n.a.	n.a.	130,0	630,0	57,1	239,4	n.a.	36,6	14,5

^a Filtros UV

^b Biocidas

^c no aplicable

Por otra parte, el crecimiento desordenado acaecido en la región durante las últimas décadas ha llevado a la población a edificar en terrenos inundables. La región padece de inundaciones más o menos regulares que acaban traduciéndose en pérdidas de vidas humanas, económicas y contribuyen a la continua degradación del ecosistema acuático.

En los sedimentos de la cuenca del Iguazú se detectaron doce PCPs de propiedades físico-químicas diferentes. Entre los contaminantes presentes, las menores concentraciones correspondieron a las benzofenonas y sus metabolitos (5,7 – 67,0 ng g⁻¹ dw) y 4MBC (38,7 - 45,6 ng g⁻¹dw). Los compuestos más lipofílicos (OC y EHMC) se encontraron a concentraciones muy superiores de hasta 322,2 ng g⁻¹ dw. Nuevamente, ODPABA se detectó en todas las muestras pero no fue posible cuantificarlo. Los bajos niveles de ODPABA pueden estar relacionados con su tendencia a ser fotodegradado en presencia de luz o cloro libre [176, 177]. Por otra parte, se encuentran nuevamente compuestos solubles y poco lipofílicos en las muestras, con concentraciones en el rango 42,8 – 151,8 ng g⁻¹ dw para EtPABA y entre 14,5 – 630,0 ng g⁻¹ dw para BZT.

Los niveles de contaminación en la cuenca estudiada siguen un patrón poblacional en la mayor parte de los casos. Los sedimentos de zonas próximas a núcleos urbanos con descargas de aguas residuales sin tratar y aquellos próximos a EDARs muestran las concentraciones más elevadas de PCPs. También se observa que el caudal del agua representa un factor determinante en cuanto a la presencia de contaminantes en el sedimento, puesto que los afluentes del río Iguazú, de menor caudal que este, presentan concentraciones medias superiores. Lo mismo se puede comprobar entre aquellas muestras tomadas durante la estación seca y la lluviosa, donde en esta última las concentraciones de PCPs presentes en los sedimentos de todos los ríos demostraron ser menores.

El BZT presentó sus mayores concentraciones en la desembocadura del río probablemente debido a procesos de transporte, aunque su presencia se observó en casi todas las muestras. Este compuesto ha sido omnipresente en todas las cuencas estudiadas, y su acumulación en el sedimento no es esperable dada su baja lipoficidad y su elevada solubilidad.

Se ha propuesto que la interacción de BZT con el sedimento o el particulado en suspensión puede obedecer al valor de su constante de disociación ácida de los ácidos débiles (pK_a). BZT posee un pK_a de 8,38, por lo que en el medio acuático (con un pH cercano a neutro) se encuentra en su forma protonada. Dicha forma favorece la interacción de la molécula con la materia orgánica sólida, lo cual favorece su retención en el sedimento. De igual forma, el coeficiente de partición

suelo – agua ($\text{Log } K_{oc}$) de la BZT es 145, lo que indica una elevada movilidad en el suelo. Todo esto indica que propiedades como el pK_a y el $\text{Log } K_{ow}$ juegan un papel fundamental en los mecanismos de adsorción de PCPs.

2.2.4 Distribución y focos de contaminación

Los estudios discutidos en el presente capítulo nos permiten obtener una imagen de los focos de contaminación y de la distribución de los contaminantes en los compartimentos ambientales involucrados. La Figura 2 muestra un diagrama a modo de resumen de lo observado en las cuencas estudiadas.

A lo largo de todas las cuencas se ha podido observar el impacto causado por las actividades humanas. Las concentraciones de PCPs son generalmente más elevadas en las proximidades de los centros urbanos. Las emisiones domésticas no tratadas suponen un problema en aquellas zonas de menor desarrollo económico. La presencia de EDARs puede resultar en la mitigación de las emisiones, pero la presencia de PCPs en el medio acuático en las cercanías de estas instalaciones indica que la eliminación no es completa. El desarrollo urbano en zonas donde originalmente se encontraban cursos de agua, llanuras fluviales y canales de descarga genera, durante episodios de inundaciones, emisiones al medio acuático en la mayoría de los casos sin ser tratadas.

En vista de los resultados de las cuencas estudiadas, el baño recreativo en las ellas no parece ser uno de los mayores contribuyentes a la contaminación de las zonas urbanas por PCPs. En cuanto a zonas donde el sector terciario tiene más importancia (como en el caso del río Adigio) la contribución PCPs a las aguas naturales a través de esta vía puede ser más significativa.

Los PCPs mayoritarios presentes en el agua superficial son aquellos que tienen una mayor solubilidad e hidrofília. Ésto facilitaría su emisión a través de los efluentes de las EDARs y su persistencia en el medio acuático, así como su transporte.

Los sedimentos reflejan el mismo patrón de contaminación que las aguas superficiales. Las zonas urbanas y próximas a las EDARs presentan concentraciones de PCPs superiores a las zonas más remotas. Los sedimentos actúan como el repositorio final de los PCPs en el medio. Los mecanismos de adsorción de los contaminantes en los sólidos dependen de la K_{ow} de los mismos, siendo los compuestos más hidrofóbicos los que presentan una mayor tendencia a acumularse en ellos.

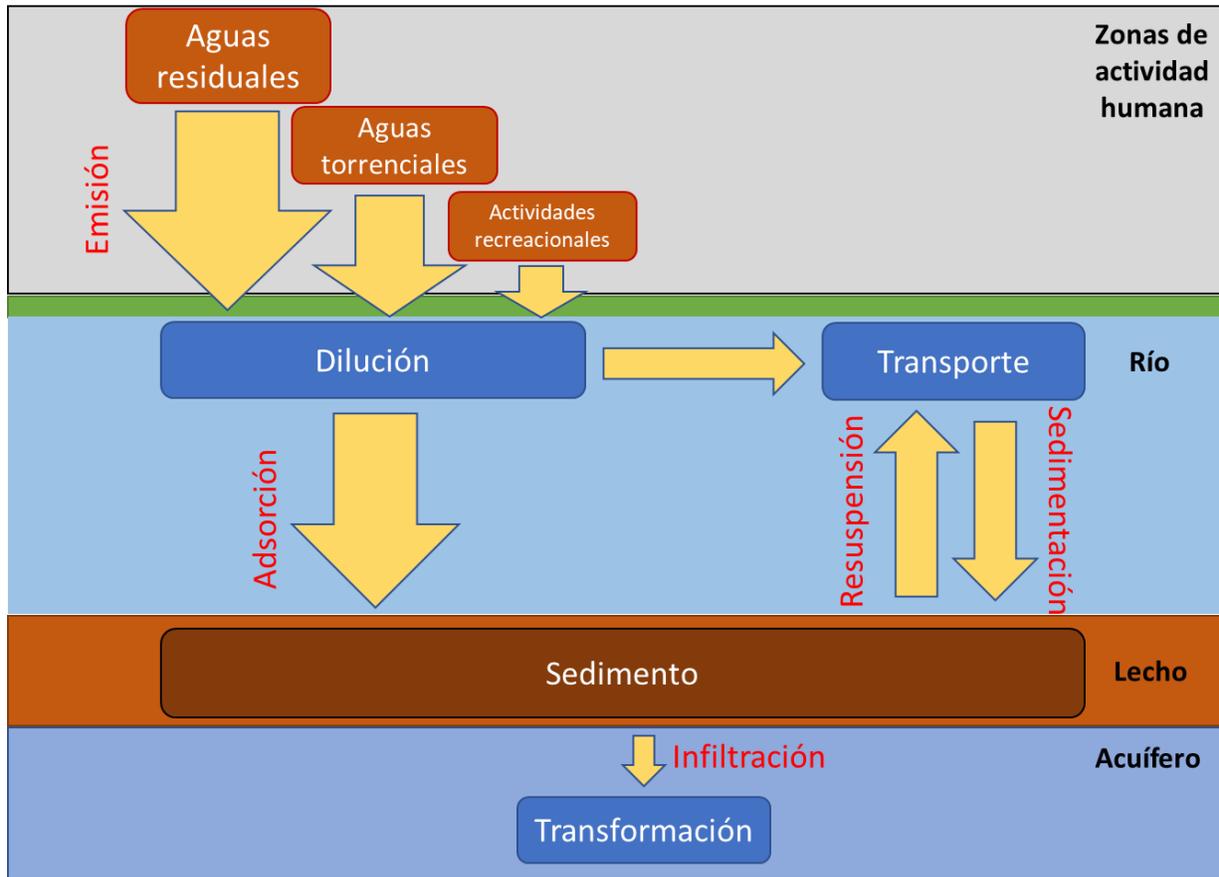


Figura 2. Procesos y distribución de los PCPs en el medio acuático.

El caudal del río juega un papel doblemente importante, puesto que la dilución de los contaminantes y el transporte de los mismos dependen de ello. Ríos menos caudalosos tienen tendencia a tener concentraciones medias altas a lo largo de todo su curso. En el caso de los ríos mediterráneos este hecho puede ser un factor crítico, puesto que las variaciones del caudal dependen de la estación.

Por otra parte, un aumento del caudal de agua en el río facilita la resuspensión de los sedimentos del lecho en la columna de agua. El particulado en suspensión es fácil de transportar y permite el transporte de contaminantes más lipofílicos a lo largo del cauce. Esto puede llevar a que las mayores concentraciones de ciertos contaminantes se den en partes más bajas del cauce, como en los ríos Adigio e Iguazú.

Por último, las mismas propiedades que facilitan la movilidad de los contaminantes pueden favorecer su infiltración en las aguas subterráneas. La introducción de agua desde el río al

acuífero puede provocar la infiltración de ciertos PCPs a las capas freáticas. Los procesos anaerobios y de desnitrificación que tienen lugar en dicho medio pueden favorecer la eliminación de ciertos contaminantes, pero los procesos que gobiernan la eliminación de aquellos que son más recalcitrantes no están claros.

2.3 Conclusiones

En este capítulo se han descrito metodologías de análisis utilizadas para la determinación de PCPs en matrices acuosas y sólidas. Las metodologías descritas son sensibles, selectivas y lo más automatizadas posibles.

La presencia de PCPs se ha observado en aguas de cinco ríos europeos y cuatro brasileños. En todos ellos los niveles de concentración de los PCPs se encontraban en el rango de los ng l^{-1} , con la notable excepción de BZT, cuyas concentraciones en muchos casos eran del orden de los $\mu\text{g l}^{-1}$. Los altos niveles de este compuesto se deben a su amplio uso, así como a su estabilidad e hidrofília al medio acuático. Los IRs han sido encontrados en la región de los Balcanes y en Grecia a altas concentraciones, pese a las diferentes presiones a las que están sometidas las aguas del río Sava y Eurotas. También se ha constatado la sustitución de DEET por Bayerpel en los Balcanes, proceso que ha ocurrido durante los últimos diez años.

Los sedimentos de las zonas con aguas impactadas han presentado concentraciones de PCPs inferiores a los $633,3 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$, pero su presencia ha sido una constante en todas las cuencas estudiadas, especialmente de los compuestos más lipofílicos. La presencia de BZT en la fracción sólida, *a priori* no justificada por su bajo $\log K_{ow}$, ha sido explicada en función de su elevado pKa .

Las zonas urbanas densamente pobladas y la presencia de un tejido industrial importante favorecen la contaminación de las aguas, mientras que en zonas de menor densidad de población la actividad turística estacional parece ser la responsable de la contaminación. En todos los casos, el vertido de las aguas residuales (tratadas o no) que transportan residuos de estos contaminantes es el principal medio de entrada de los PCPs al medio acuático.

La hidrología del río contribuye a la diseminación de estos contaminantes. El transporte de PCPs a través de la cuenca y los niveles de concentración están relacionados con las variaciones del caudal, tanto puntual como estacional.

Por último, la presencia de PCPs en los acuíferos indica que el agua proveniente de la infiltración desde ríos contaminados transporta aquellos compuestos que son más recalcitrantes y móviles, y cuya eliminación por procesos naturales es lenta y no está del todo explicada.

Como nota final, los estudios futuros que se lleven a cabo deberían centrarse en investigar los mecanismos naturales de eliminación de los PCPs, la interacción y presencia de los contaminantes en los diferentes compartimentos acuáticos y en la prevención de su entrada en el medio ambiente.

En este capítulo no se ha comentado la transferencia de los contaminantes a la biota acuática, pero en capítulos posteriores se discute la relación entre aguas contaminadas y presencia de PCPs en tejidos biológicos.

Capítulo III

Eliminación, efectos y riesgo

3.1 Introducción

En el Capítulo II se discutió la presencia de los PCPs en el medio acuático y se señaló a las EDARs como los principales focos de contaminación discretos causantes de su entrada en el medio ambiente.

La literatura existente sobre el tema señala que la eliminación de los PCPs es desigual entre las EDARs existentes y generalmente resulta insuficiente. Es por ello que se necesita caracterizar las emisiones al medio acuático provocadas por las EDARs, así como determinar la eliminación de los contaminantes que en ellas se produce en función de los parámetros operacionales de cada una, todo ello con el fin de poder ofrecer soluciones a los retos ambientales presentes y futuros.

Aunque no todos los PCPs quedan retenidos en el lodo, su presencia en el mismo es preocupante dada su generalmente baja degradabilidad. El destino final de los lodos de EDAR puede contribuir a diseminar los PCPs en el ambiente ya que su uso como fertilizantes en agricultura es una práctica habitual, siendo el 50% de los fangos producidos en la Unión Europea destinados a este fin [89]. Dada esta problemática, se empiezan a realizar los primeros estudios de biodegradación de contaminantes emergentes en lodos de depuradora con el fin de reducir el impacto que estos compuestos puedan causar.

Así mismo, en el presente capítulo se discuten también los efectos ecotoxicológicos de los PCPs en el medio ambiente y se estima el riesgo ambiental potencial para las especies de referencia que se encuentran expuestas, como indicador de peligrosidad. Generalmente, la potencial toxicidad de los contaminantes se estudia para una sustancia y un organismo, pero esta aproximación no es realista puesto que los diversos contaminantes existen simultáneamente en el medio ambiente. Los estudios de toxicidad de mezclas binarias de PCPs suponen una mejor aproximación al problema, aunque la mayor dificultad asociada dificulta la disponibilidad de datos en la bibliografía.

También se hace mención a los nanomateriales como contaminantes emergentes y como posibles transportadores de otros contaminantes (caballos de Troya). Estas nuevas sustancias se hallan presentes en muchas formulaciones de PCPs y, en consecuencia, pueden interactuar con otros ingredientes de estos productos y también con aquéllos presentes en los compartimentos ambientales. Poco se sabe sobre el el peligro que pueden representar para los seres vivos. Todo ello es objeto de discusión en este capítulo.

3.1.1 Objetivos

El principal objetivo del presente capítulo es caracterizar las emisiones de PCPs de las EDARs, así como la eliminación de estos compuestos que en ellas se produce. Se discute también el tratamiento de los lodos de EDAR con el hongo *Trametes versicolor* y el papel que éste puede representar para la biodegradación de UV-Fs. También se pretende ofrecer una visión cohesionada sobre los riesgos ambientales y los efectos ecotoxicológicos que la presencia de PCPs supone para el medio ambiente.

Para ello se estudian las aguas residuales (tanto influente como efluente) de una serie de estaciones de tratamiento de aguas residuales de Cataluña. Los compuestos estudiados son UV-Fs, biocidas y conservantes. Con ello se persigue contribuir al conocimiento existente sobre la eliminación de estos compuestos bajo diferentes tratamientos.

También se discuten los efectos ecotoxicológicos de diversos UV-Fs, conservantes y nanomateriales en solitario (una sustancia por ensayo) y en mezcla binarias (dos sustancias por ensayo). Se trata de caracterizar el efecto ecotoxicológico resultante en 4 organismos de referencia: *Daphnia magna*, *Raphidocelis subcapitata*, *Phaeodactylum tricornutum* y *Vibrio fischeri*. A su vez, se hace especial énfasis en las capacidades de los nanomateriales para actuar como vectores para el transporte y la introducción de PCPs en dichos organismos, a través del denominado efecto troyano.

Finalmente, con los datos obtenidos en los diferentes estudios realizados, se presenta los resultados y conclusiones alcanzados mediante diversas evaluaciones de riesgo ambiental en diferentes escenarios con el fin de discutir la potencial peligrosidad de las sustancias estudiadas en el ecosistema.

3.1.2 Estructura

El presente capítulo incluye las cuatro publicaciones siguientes:

D. Molins-Delgado, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, "Removal of polar UV stabilizers in biological wastewater treatments and ecotoxicological implications," *Chemosphere*, vol. 119, pp. S51-S57, 2015.

D. Molins-Delgado, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, "Ecological risk assessment associated to the removal of endocrine-disrupting parabens and benzophenone-4 in wastewater treatment," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 310, pp. 143-151, 2016.

C.E. Rodríguez-Rodríguez, D. Lucas, E. Barón, P. Gago-Ferrero, D. Molins-Delgado, S. Rodríguez-Mozaz, E. Eljarrat, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, G. Caminal, T. Vicent, "Re-inoculation strategies enhance the degradation of emerging pollutants in fungal bioaugmentation of sewage sludge," *Bioresource Technology*, vol. 168, pp.180-189, 2014.

D. Molins-Delgado, P. Gago-Ferrero, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, "Single and joint ecotoxicity data estimation of organic UV filters and nanomaterials toward selected aquatic organisms. Urban groundwater risk assessment," *Environmental Research*, vol.145, pp.126-134, 2016.

Adicionalmente, se discuten los resultados referentes a aguas residuales de la Publicación Nº 1. Seguidamente se procederá a la discusión de su contenido y se complementa con datos de un estudio en curso. Se describen los resultados de los ensayos de ecotoxicidad tanto en solitario como en mezclas binarias, se describen las propiedades de los nanomateriales y el efecto troyano y se discute el riesgo potencial que los PCPs suponen al medio incluyendo las secciones de ERA incluidas en las publicaciones Nº 1, Nº 2, Nº 4, Nº 5 y Nº 7.

Seguidamente se procederá a la discusión de su contenido. Se describirá la presencia de PCPs en aguas residuales, la contribución de las EDARs de PCPs al medio ambiente, la eficacia en su eliminación y se comentará la aplicación de un tratamiento de biodegradación de UV-Fs económico y cuidadoso con el medio ambiente.

Publicación Nº4

Removal of polar UV stabilizers in biological wastewater treatments and ecotoxicological implications

Por

D. Molins-Delgado, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló

en

Chemosphere, vol. 119, pp. S51-S57, 2015

Información adicional disponible en el Anexo IV

Atención!!

Por razones de copyright, las páginas 106 a 112 de la tesis, que contienen el artículo citado, deben consultarse en la web del editor

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653514003579>

Publicación Nº 5

Ecological risk assessment associated to the removal of endocrine-disrupting parabens and benzophenone-4 in wastewater treatment

Por

D. Molins-Delgado, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló

en

Journal of Hazardous Materials, vol. 310, pp. 143-151, 2016

Información adicional disponible en el Anexo IV

Atención¡¡

Por razones de copyright, las páginas 114 a 122 de la tesis, que contienen el artículo citado, deben consultarse en la web del editor

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389416301583>

Publicación Nº 6

Re-inoculation strategies enhance the degradation of emerging pollutants in fungal bioaugmentation of sewage sludge

Por

C.E. Rodríguez-Rodríguez, D. Lucas, E. Barón, P. Gago-Ferrero, D. Molins-Delgado,
S. Rodríguez-Mozaz, E. Eljarrat, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, G. Caminal, T. Vicent,

en

Bioresource Technology, vol. 168, pp.180-189, 2014

Atención¡¡

Por razones de copyright, las páginas 124 a 134 de la tesis, que contienen el artículo citado, deben consultarse en la web del editor

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852414001497>

Publicación Nº 7

Single and joint ecotoxicity data estimation of organic UV filters and nanomaterials toward selected aquatic organisms.

Urban groundwater risk assessment

Por

D. Molins-Delgado, P. Gago-Ferrero, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló

en

Environmental research, vol.145, pp.126-134, 2016

Atención!!

Por razones de copyright, las páginas 136 a 144 de la tesis, que contienen el artículo citado, deben consultarse en la web del editor <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935115301547>

3.2 Discusión

3.2.1 Metodologías analíticas

En las Publicaciones N° 4 y N° 5 se describen las emisiones de benzotriazoles, UV-Fs y conservantes al medio acuático. Las metodologías analíticas aplicadas en ambos estudios son similares a las descritas en la sección 2.2.1 del Capítulo II. Las aguas residuales, en particular los influentes, poseen generalmente concentraciones superiores a las que se encuentran en las aguas ambientales naturales (Tabla 1) y suelen poseer concentraciones de material particulado en suspensión superiores, por lo que el filtrado de las aguas ha de ser exhaustivo y la dilución de la matriz en agua HPLC suele ser necesaria.

Existen también diferencias respecto a las propiedades fisicoquímicas entre las distintas familias de PCPs consideradas. A diferencia de los trabajos discutidos en el Capítulo II, los conservantes y los UV-Fs incluidos en la publicación N° 5 requieren energías de ionización negativas para su detección. Esto se debe a la dificultad de las moléculas para formar iones de carga positiva; su ionización requiere de la pérdida de protones, por lo que el análisis simultáneo de los compuestos en positivo y negativo no es posible con la instrumentación disponible.

Los análisis descritos en ambas publicaciones se realizaron bajo una configuración en línea mediante SPE-HPLC-MS/MS con fuente de ionización ESI. La cantidad de muestra fue igualmente reducida, en concreto a 5 ml, y se mantuvieron las ventajas ya descritas en la sección 2.2.1 para el análisis de aguas superficiales. En cuanto al uso de patrones internos, para la familia de los parabenos se recurrió al estándar deuterado BzPB-d₄.

En el caso del análisis de UV-Fs en lodos de depuradora, Publicación N° 6, éste se realizó siguiendo la metodología desarrollada previamente en nuestro grupo por Gago-Ferrero et al. [89]. Se partió de muestras de 1 g. de lodos liofilizados a los que se les aplicó PLE para extraer y purificar los analitos. Los extractos finales fueron analizados mediante HPLC-MS/MS.

El problema de la contaminación cruzada es importante. Puesto que las concentraciones presentes en las muestras de fangos de depuradora suelen ser elevadas, el efecto memoria de la columna cromatográfica puede ser mayor. En este sentido se han de tener en cuenta una serie de precauciones a la hora de realizar sesiones de análisis de larga duración con el fin de mantener tanto la columna cromatográfica como el resto de equipo de separación y análisis en las mejores condiciones operacionales posibles.

El efecto de la matriz es un factor clave a tener en cuenta en muestras más complejas, puesto que pueden incrementar o disminuir la señal de los analitos en estudio. Para solucionar este problema, la utilización de rectas de calibrado en matriz es aconsejable, puesto que minimiza la contribución de la matriz al encontrarse recta y muestra en las mismas condiciones. La utilización de blancos durante todo el proceso, de estándares de control y la adición de etapas de limpieza del equipo, todo ello intercalado durante la totalidad de las secuencias de análisis, es más crítico que al tratar muestras relativamente “limpias” de aguas naturales e incluso sedimentos.

3.2.2 Eliminación

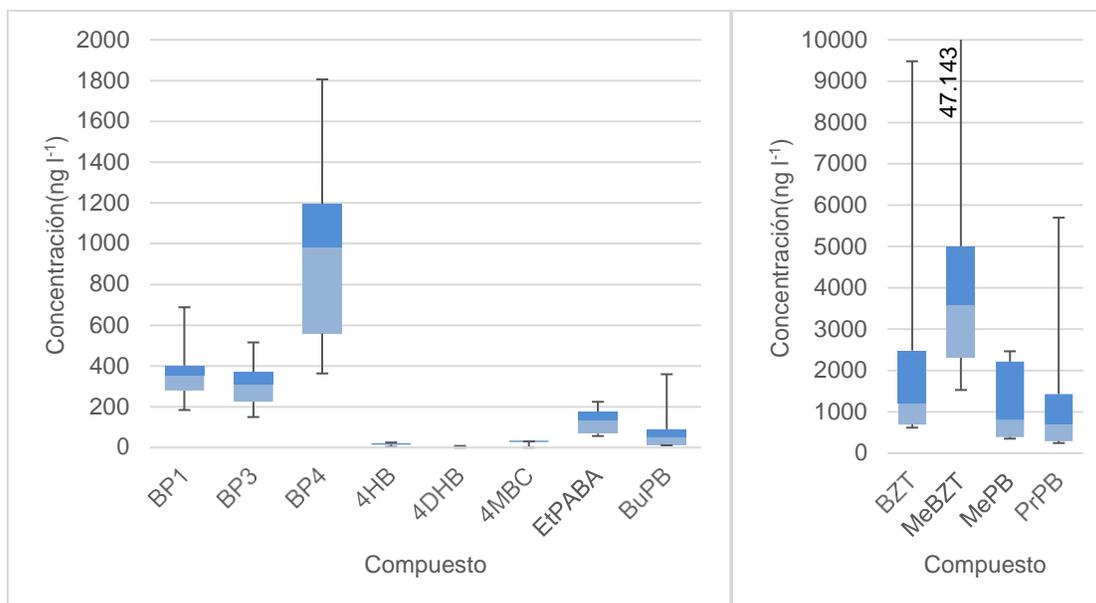
La eliminación de los contaminantes orgánicos mediante los tratamientos aplicados en las EDARs depende enormemente de sus propiedades fisicoquímicas. Los compuestos más lipofílicos acaban siendo retenidos en los lodos, pero el proceso, lejos de lo ideal, no tiene la misma eficacia para todos los contaminantes. En tiempos recientes, con el auge del estudio de los contaminantes emergentes, ha quedado patente que los procesos de depuración actuales de las aguas residuales no son lo suficientemente efectivos como para eliminar este tipo de contaminantes, siendo además, muy variable en sus tasas de eliminación

También resulta evidente que no hay dos EDARs iguales, y que el grado de depuración de las aguas depende del tipo de aguas residuales que trata y de los parámetros operacionales de los tratamientos que se aplican en las mismas. Por otra parte, el estudio de los lodos ha demostrado que la degradación de muchos de estos contaminantes no se lleva a cabo, sino que simplemente son adsorbidos en los biosólidos por lo que, sin un correcto tratamiento posterior de éstos, los contaminantes retenidos pueden ser devueltos al medio acuático.

Las muestras provinieron de Cataluña y corresponden a EDARs localizadas a lo largo de todo el territorio. En las Publicaciones Nº 4 y Nº 5 se estudiaron las concentraciones de benzotriazoles y parabenos en aguas residuales, influente y efluente, así como la eliminación de éstos en todas. Se incluyen además los resultados obtenidos en las EDARs del área metropolitana de Barcelona para UV-Fs y benzotriazoles de la Publicación Nº 1. La Figura 3 muestra las concentraciones de PCPs en el influente y en el efluente de las diferentes depuradoras estudiadas.

Al estudiar los influentes de Cataluña se observa que las concentraciones de BZT y MeBZT son mayores que las del resto de PCPs. Como se ha comentado en los capítulos anteriores, estos compuestos tienen diversas aplicaciones gozan de un amplio uso y persistencia, los que explicaría las altas concentraciones de benzotriazoles.

a)



b)

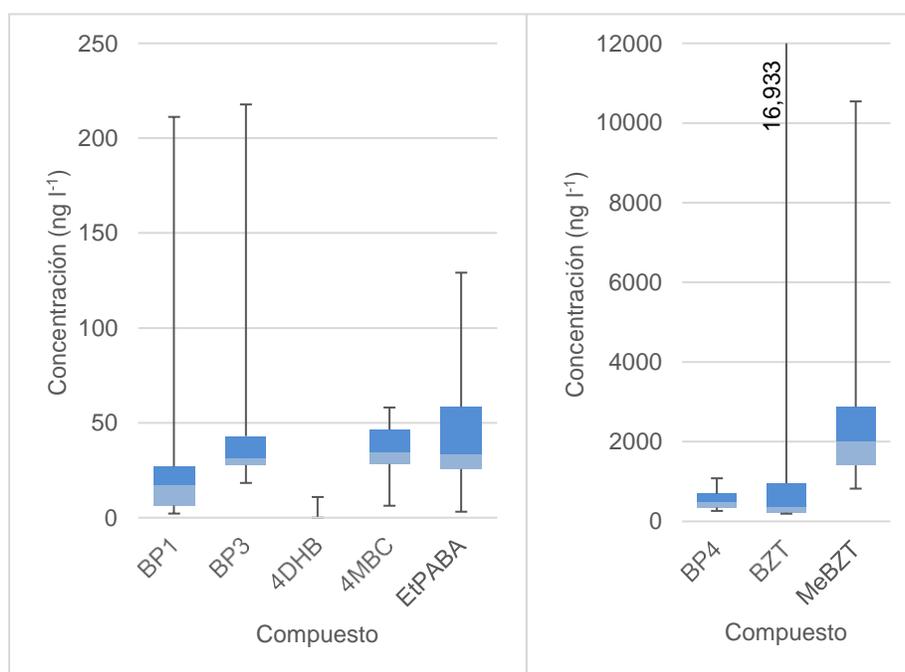


Figura 3. Concentraciones de PCPs en aguas residuales de las publicaciones incluidas en la presente Tesis. (a) Influyente; (b) Efluente. Se muestran aquellos compuestos presentes en cada matriz.

Sus concentraciones medias son altas (1.213,5 ng l⁻¹ para BZT y 3.593,4 ng l⁻¹ para MeBZT), pero sus concentraciones pueden variar 4 órdenes de magnitud dependiendo de la EDAR. Las concentraciones más altas correspondieron a zonas de alta densidad poblacional, lo que indicaría su relación con el extenso uso de estos compuestos en nuestro día a día. El valor más alto de

concentración de los dos estudios es 47.143 ng l⁻¹ y corresponde a la zona de Rubí, en el área metropolitana de Barcelona. La zona industrial de Rubí es una de las más importantes a nivel estatal, puesto que concentra 12 polígonos industriales con una alta diversificación [178].

Respecto a los otros PCPs, las concentraciones medias más altas correspondieron a BP4 (984,0 ng l⁻¹), MePB (801,0 ng l⁻¹) y PrPB (696,0 ng l⁻¹). Los tres compuestos son bastante hidrofílicos y solubles en agua. Sus concentraciones fueron superiores en las zonas con mayores núcleos urbanos, indicando, como en el caso anterior, su uso habitual por la población. Las concentraciones más altas de BP4 correspondieron al área metropolitana de Barcelona, mientras que las mayores concentraciones de parabenos se determinaron en las aguas residuales de Lérida. MePB y PrPB son conservantes también usados en el ámbito alimentario y farmacéutico, por lo que su presencia puede estar relacionada con la producción de alimentos e incluso fármacos.

Con respecto a los UV-Fs, sus concentraciones medias oscilaron entre 7,7 y 355,9 ng l⁻¹. BP1 y BP3 fueron los dos UV-Fs encontrados en mayor proporción y se detectaron concentraciones de los metabolitos 4HB y 4DHB. Los valores de UV-Fs de la Publicación 1 provienen del área metropolitana de Barcelona, por lo que su uso por la población se identifica como su origen. No se tienen datos de las EDARs que tratan las aguas de Barcelona, pero es de esperar que sean superiores dada la mayor densidad poblacional y el patrón observado para benzotriazoles, parabenos y BP4.

Las concentraciones de UV-Fs del efluente mostraron un perfil similar al del de las de entrada. Aquellos compuestos menos lipofílicos siguieron encontrándose a concentraciones mayores. BZT y MeBZT presentaron concentraciones medias de 363,3 y 2.000 ng l⁻¹ respectivamente, pero sus valores máximos fueron entre uno y dos órdenes de magnitud superiores. Por otra parte, la concentración media de BP4 fue de 487,0 ng l⁻¹ y su valor máximo de 1080,0 ng l⁻¹. Los otros UV-Fs, más lipofílicos, presentaron concentraciones medias inferiores, entre 10,9 y 34,6 ng l⁻¹, siendo BP1 y BP3 los de mayor concentración. Los metabolitos de la BP3 siguieron estando presentes después del tratamiento, aunque en la mayor parte de los casos sus niveles fueron menores a los respectivos límites de cuantificación del método. En el caso de los parabenos, su eliminación fue prácticamente completa, aunque en algunos casos se observaron en el efluente por debajo del límite de cuantificación respectivo.

La Figura 4 muestra las tasas de eliminación de los PCPs en las EDARs estudiadas. A excepción de los parabenos, cuya eliminación, como se comentado es prácticamente total en todas las

EDARs, la eliminación de estos contaminantes es muy variable, especialmente para los más hidrofílicos.

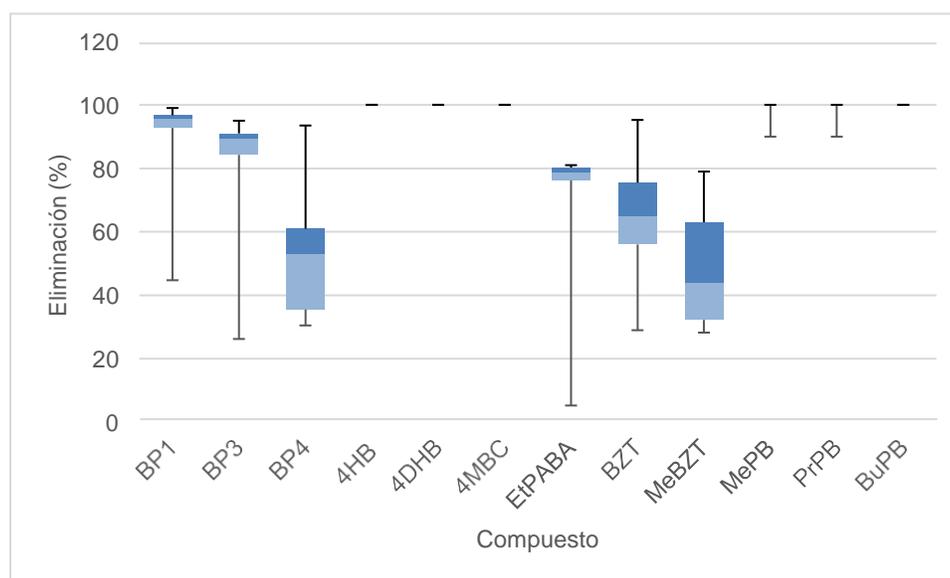


Figura 4. Eliminación (%) de PCPs en EDARs.

En el caso de las benzotriazoles, se observaron grandes variaciones, incluso en aquellas en las que tenemos datos de dos épocas diferentes. Por lo general la eliminación de estos compuestos osciló entre el 4 y 95 %, con valores generalmente más altos para BZT que para el resto de compuestos. La eliminación de las benzofenonas fue variable. BP1 presentó una eliminación media del 88% y BP3 del 84%. Por su parte, BP4, presentó las eliminaciones más bajas de todos los UV-Fs estudiados, con un valor medio de 48 %. EtPABA es menos lipofílico y su eliminación media lo refleja (75%), mientras que 4MBC presentó una eliminación prácticamente total.

En varias EDARs las concentraciones en el influente fueron inferiores a las del efluente para BZT, MeBZT, BP4, 4DHB, 4MBC y EtPABA. A excepción de 4MBC, todos estos PCPs son solubles en agua y poco lipofílicos, por lo que podría estar relacionado con sus propiedades fisicoquímicas, pero en el caso de las benzotriazoles, donde tenemos datos en 5 EDARs en dos periodos de tiempo diferente, se observan altas variaciones en su eliminación, pudiendo oscilar desde prácticamente eliminación nula a una eliminación de casi el 90 %.

BP4 tiene un aporte neto por parte de la EDAR de la Llagosta de más del 200 % respecto a su entrada, EtPABA presenta aportes que oscilan entre cerca del 150 % y el 100 % en dos EDARs del área metropolitana de Barcelona, la EDAR de Rubí emite cerca de un 50 % más de 4DHB que el que recibe, y la EDAR de Terrasa emite un 90% más de EtPABA del que recibe.

Los muestreos se realizaron con muestras compuestas a lo largo de todo el día, teniendo en cuenta el tiempo de retención hidráulica de cada EDAR para minimizar la variabilidad temporal en las concentraciones de contaminantes. En el caso de las eliminaciones negativas se sugiere que su origen es la biodegradación de moléculas más complejas. Por ejemplo, para las benzotriazoles, se cree que el aumento de las concentraciones puede ser debido a ruptura de complejos formados o a procesos de transformación de moléculas más complejas o desconjugación de metabolitos. Procesos similares pueden estar involucrados en el incremento de las concentraciones de BP4 y 4DHB.

La razón por la cual existen eliminaciones negativas de los compuestos en algunas depuradoras y en otras no, y que esto ocurra en la misma depuradora en distintos periodos de tiempo no está clara. Se sospecha que debe estar relacionado con los parámetros operacionales de la depuradora. Las muestras de la Publicación N° 4 provienen de junio de 2011 mientras que los de la Publicación N° 1 son de febrero del 2014, por lo que la diferencia en el tiempo y en la estación también puede tener algo que ver.

3.2.3 Emisiones al medio acuático a través de la descarga de efluentes de las EDARs

Se ha discutido la aportación tan variable de PCPs al medio ambiente a través de los efluentes de EDARs. El cálculo es una estimación tomada a partir de los valores obtenidos en las Publicaciones N° 1, N° 4 y N° 5. Para ello se toman las concentraciones determinadas de PCPs en el efluente, el volumen de agua tratada por día y la población servida de cada EDAR. Es conocido que la composición de los efluentes varía cada hora, diariamente y estacionalmente, por lo que la estimación de estos valores busca únicamente mostrar la magnitud de las emisiones. En la Figura 5 se muestra la emisión anual estimada de PCPs a través del efluente de todas las Publicaciones incluidas en esta Tesis.

Puesto que los compuestos más lipofílicos se eliminan mejor en los procesos actualmente aplicados, la emisión anual por habitante no supera los $1,6 \text{ mg año}^{-1} \text{ hab}^{-1}$. Entre ellos, BP1, BP3 y EtPABA son los PCPs emitidos en cantidades más variadas, con medias que se encuentran por debajo de los $0,2 \text{ mg año}^{-1} \text{ hab}^{-1}$ y un rango de emisión, dependiendo de la EDAR, que oscila un orden de magnitud.

Estos valores son relativamente bajos si se comparan con los compuestos más polares. BP4, la benzofenona más soluble de las estudiadas, tiene emisiones que oscilan en un rango de dos ordenes de magnitud, con una media de $3,7 \text{ mg año}^{-1} \text{ hab}^{-1}$ y alcanzando valores próximos a los $15 \text{ mg año}^{-1} \text{ hab}^{-1}$. En ambos casos, estas emisiones por cápita son entre un orden y dos ordenes

de magnitud inferiores a los reportados para otros compuestos (bisfenoles, edulcorantes y biocidas) en EDARs de zonas urbanas coreanas densamente pobladas [179, 180].

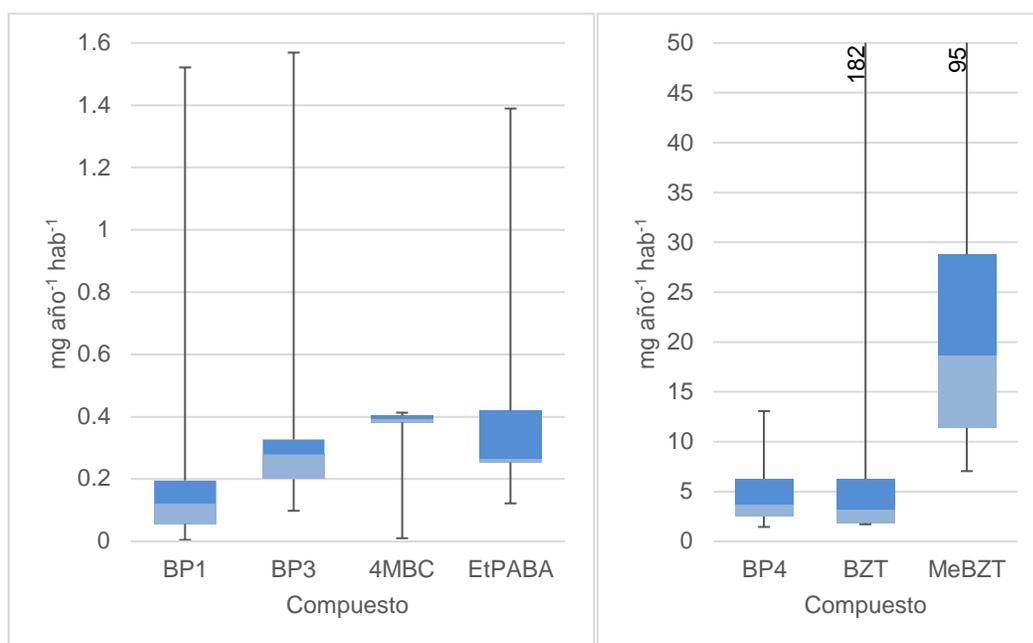


Figura 5. Cantidades de los contaminantes emitidas anualmente por habitante a través del efluente en las depuradoras de Cataluña.

La pobre eliminación de BZT y MeBZT queda patente también en sus emisiones estimadas al medio. La media de emisión de BZT es inferior a la de BP4, con un valor de 3,2 mg año⁻¹ hab⁻¹, pero su variabilidad dependiendo de la EDAR hace que sus emisiones oscilen 3 ordenes de magnitud, pudiendo alcanzar valores próximos a los 200 mg año⁻¹ hab⁻¹. MeBZT tiene una media de emisiones de 18,7 mg año⁻¹ hab⁻¹, y en las estimaciones presentadas se han obtenido valores máximos próximos a los 100 mg año⁻¹ hab⁻¹.

Las concentraciones de PCPs presentadas en la Tabla 1 tienen valores similares a los aportados en las Publicaciones N° 1, N° 4 y N° 5, y las eliminaciones se encuentran en el mismo orden. Se puede afirmar que las emisiones de PCPs en otras zonas pueden presentar órdenes de magnitud similares, pero la falta de estudios al respecto impide a poder ofrecer una comparación directa.

Los valores de masa estimados de PCPs pueden parecer bajos a simple vista, pero en zonas de elevada densidad poblacional la cantidad total emitida al medio ambiente puede alcanzar valores del orden de los kilogramos. Esto explica que las concentraciones de PCPs en las proximidades de los núcleos urbanos y las EDARs presenten concentraciones de media más elevadas, puesto que, debido a la cercanía a la fuente de emisión, el efecto de dilución causado por las aguas naturales no ha tenido tiempo de tener lugar.

Como se comentó en el Capítulo I, se espera que el consumo de PCPs vaya en aumento en los próximos años, por lo que es esperable que las emisiones al medio sean superiores. Ante la falta de una base sólida de conocimiento respecto a los posibles efectos adversos que los PCPs pueden causar en el medio ambiente, es necesario desarrollar nuevas estrategias de tratamiento de aguas residuales y lodos para favorecer su completa eliminación.

3.2.4 Biodegradación de PCPs en lodos de EDAR mediante *Trametes versicolor*

En esta sección se discute un proceso de tratamiento de biodegradación de los lodos de EDAR en el cual éstos se exponen al hongo *Trametes versicolor* para eliminar residuos de UV-Fs.

La selección del hongo *Trametes versicolor* reside en su capacidad para biodegradar lignina y compuestos fenólicos. Los procesos metabólicos de oxidación que el hongo lleva a cabo se basan en la no especificidad de sus enzimas, cuya función es la de catalizar procesos de oxidación mediante radicales. Esta no especificidad permite al hongo degradar compuestos similares como los PCPs. Su aplicabilidad se ha estudiado en aguas residuales y lodos de EDAR [181].

En cuanto a los PCPs, la aplicabilidad de este hongo y otros de la misma familia ha sido probada para la eliminación de UV-Fs [182, 183], fragancias [184, 185], biocidas [186] y conservantes [187]. En muchos casos, el resultado final de la biodegradación es la formación de los metabolitos oxidados de los contaminantes en cuestión, con la consiguiente reducción del efecto estrogénico del compuesto original. No obstante, la falta de información detallada sobre los posibles efectos adversos de los metabolitos es motivo de preocupación.

Todos estos estudios surgen ante la necesidad de asegurarse que los contaminantes emergentes más persistentes no sean enviados de vuelta al medio ambiente. Los lodos de depuradora tienen varios destinos una vez generados. Pueden usarse como fuente de biogás tras un proceso digestivo, para producir compostaje, aplicarse directamente en explotaciones agrícolas como abono o disponer de ellos en incineradoras de residuos o vertederos. El reciclado de los lodos requiere de mejores controles para asegurarse que los contaminantes más recalcitrantes no sean devueltos al medio ambiente y entren en la cadena trófica, expandiendo su impacto.

En los estudios previos [182, 188, 189] se descubrió que *Trametes versicolor* era capaz de degradar los UV-Fs BP1, BP3, 4MBC, OC y EHMC. Uno de estos estudios [182] indica que éste puede eliminar eficazmente BP1 y BP3 más eficazmente (cerca del 99 % de eliminación) que con los procesos de degradación mediante la exposición de los lodos a la radiación UV. Los experimentos previamente conducidos demostraron que el 95% de BP1 presente en la muestra de lodo fortificada fue eliminada tras 2 h, la práctica totalidad de la BP3 tras 8 h, y el 87 % de

4MBC antes de 24 h de tratamiento. La eliminación se llevó a cabo mediante procesos metabólicos, al poderse identificar los metabolitos más comunes de las benzofenonas. Todo ello indica que la eliminación de los compuestos se obtuvo en una fracción de tiempo mucho menor que mediante procesos de fotodegradación.

En dichos estudios, los experimentos se realizaron en condiciones estériles por lo que su aplicabilidad en medios donde se encuentran otros organismos no había sido aún demostrada. La Publicación Nº 6 exploró la reinoculación del hongo en medios no estériles, expandiendo potencialmente el rango de aplicación de *Trametes versicolor* a las condiciones operacionales de las EDARs.

Para el estudio se usaron lodos de la EDAR del Prat de Llobregat. Dicha planta realiza un tratamiento estándar de digestión anaeróbica de los lodos y secado térmico. Los lodos estudiados se obtuvieron tras el final del proceso con un contenido del 7 % de agua. Los lodos fueron caracterizados utilizando la metodología descrita en la sección 3.2.1. Los resultados de la caracterización de las muestras en las distintas etapas del estudio se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Concentraciones de UV-Fs en lodo de EDAR del Prat de Llobregat.

Tiempo (d)	Concentración lodos (ng g ⁻¹ dw)		Reinoculación	Concentración lodos (ng g ⁻¹ dw)	
	0	42		22	42
BP3	1.600	566,25	R1 ^a	699,38	486,88
			R2 ^b		977,70
4HB	700,42	692,50	R1	391,25	390,00
			R2		846,50
4MBC	11.043,75	4.062,50	R1	2.956,25	1.350,00
			R2		2.457,97
OC	383.125,00	223.187,50	R1	183.125	44.750,00
			R2		193.045,77

^a Reinoculación con una suspensión del hongo.

^b Reinoculación con el hongo precultivado sobre pellets de paja.

La caracterización inicial (t = 0 d) muestra la presencia de 4 UV-Fs. Se observó que las concentraciones aumentan a medida que se incrementan sus lipofilidades (4HB<BP3<4MBC<OC). El 4HB, metabolito de la BP3, se determinó a niveles de 0,7 µg g⁻¹ dw. Puesto que su presencia está relacionada con procesos metabólicos, ésta puede deberse al proceso inicial de digestión al que fueron sometidos en la EDAR. Por otra parte, BP3 alcanzó concentraciones de 1,6 µg g⁻¹ dw, 4MBC llegó a los 11 µg g⁻¹ dw y OC de 383 µg g⁻¹. Estos niveles están en línea con las mostradas en la Tabla 1 para UV-Fs y otros PCPs. En este sentido, la

retención de 4MBC y OC explica su ausencia en concentraciones equiparables a las de otros PCPs en el medio acuático natural, como se ha discutido en el Capítulo II.

El estudio de biodegradación se realizó en biopilas. La duración del experimento fue de 42 días y la temperatura fue de 25 °C y la mezcla se mantuvo húmeda y homogeneizada durante todo el proceso. El hongo se cultivó en una suspensión acuosa que contenía pellets de paja trituradas esterilizadas durante 7 días a 25 °C.

Se tomaron muestras a tiempo inicial, 22, 29, 36 y a los 42 días para caracterizar las concentraciones de contaminantes presentes. Las dos estrategias de reinoculación son las siguientes: la primera estrategia (R1) se basaba en la reintroducción del hongo al lodo desde una suspensión sin su cultivo previo, mientras que la segunda (R2) es la reinoculación de los hongos precultivados bajo las concentraciones iniciales. Ambas se ejecutaron a partir del día 22.

Tal como se describe en la Publicación N° 6, la implantación del hongo en medios noestériles no tenía lugar si no se acompañaba de la adición de sustratos lignocelulosos. Por otra parte, la colonización del hongo en lodos previamente secados se consideraba existosa debido a la baja proliferación de bacterias.

El primer tratamiento de los lodos con los hongos durante los primeros 22 días, resultó en una eliminación de un 22 % respecto a las concentraciones iniciales de UV-Fs determinadas. Se observó que la eficacia de la eliminación de los UV-Fs fue inferior a la de los fármacos y retardantes de llama (69 y 67 % respectivamente) incluidos en el mismo estudio. Tras la reinoculación del hongo a los lodos, R1 ofreció reducciones globales en la concentración de los compuestos estudiados del 80%. Por otra parte, R2 fue más ineficaz en la eliminación de los contaminantes, siendo 4MBC el único de los contaminantes que presentó concentraciones menores.

Los resultados obtenidos para la eliminación de OC son positivos. La eliminación tras la aplicación de RS1 produjo una reducción del 60% en la concentración, elevando la eliminación global para este compuesto en un 81 %. Este resultado es positivo teniendo en cuenta que otros estudios anteriores sin lodos estériles obtuvieron resultados similares en reactores de biopila [188] y mejores que en reactores de lodo líquido [189]. La eliminación de BP3 ya fue demostrada en el estudio previo [182] y los experimentos llevados a cabo en la Publicación N° 6 demuestran la buena eliminación con reinoculación, especialmente con la R1.

Por otra parte, las estrategias de reinoculación no suponen una mejoría en la eliminación de 4DHB, alcanzando valores de eliminación globales del 8 %. La pobre eliminación de este

compuesto ha sido previamente observada en los reactores de lodo estéril líquido [189]. Por su parte, 4MBC fue el único de los compuestos estudiados cuya eliminación prosiguió independientemente de la estrategia proseguida, aunque ésta fue baja (entre el 7 y el 24%, R1 y R2 respectivamente),

En general, la adición del paso de reinoculación conlleva rendimientos más altos para la eliminación de UV-Fs. La R1 demostró ser la más efectiva de las dos probadas. La adición de la suspensión de *Trametes versicolor* a los lodos presenta ventajas respecto al uso de la estrategia R2, entre ellas los costes. El precultivo de los hongos en sustrato de celulosa es más caro, por lo que R1 presenta un balance coste/eficacia superior. La duración del tratamiento es otro factor importante. En este estudio se demostró que 42 días, pese a ser suficiente para la degradación de fármacos, no es suficiente para la eliminación total de los UV-Fs de los lodos.

Dada la problemática existente con la presencia de contaminantes en los lodos debido a su posterior vida útil, la adición de un tratamiento de biodegradación basada en la colonización de los lodos con *Trametes versicolor* es viable. La posibilidad de utilizar estrategias de reinoculación sobre lodos no estériles presenta un avance respecto a su futura aplicabilidad. Bajo esta premisa, se requieren más estudios para estudiar la aplicabilidad del hongo a otros contaminantes emergentes. Queda pendiente optimizar el periodo de tiempo necesario para asegurarse que la eliminación de los contaminantes y sus metabolitos es total. También se han de realizar estudios para identificar los metabolitos generados por el hongo y estudiar los potenciales efectos adversos que éstos pueden conllevar.

3.2.5 Ecotoxicología de los PCPs

La presencia de estos compuestos en el medio ambiente es ya de por sí materia de preocupación debido a los potenciales efectos adversos que pueden causar sobre los ecosistemas, pero ésta se ve acrecentada por la falta de conocimiento referente a los posibles efectos ecotoxicológicos. Como se comentó en el Capítulo I, en Europa desde la entrada en vigor del reglamento REACH en 2007 es necesario proporcionar información acerca de la ecotoxicidad de cualquier nuevo compuesto sintetizado cuya aplicación busque fines comerciales a fin de registrarlo para asegurar que no suponen un riesgo ambiental. En el caso de los PCPs y pese a su extenso uso, los estudios realizados son a día de hoy escasos, y se limitan a un número limitado tanto de compuestos como de organismos acuáticos. En la Tabla 3 se recogen algunos de los datos ecotoxicológicos disponibles hasta la fecha.

Con el fin de aportar nueva información de toxicidad ambiental de los PCPs, se llevaron a cabo dos estudios dentro del marco de la presente Tesis. En la Publicación N° 7 se caracterizó la toxicidad de UV-Fs, biocidas y conservantes. La Tabla 8 recoge los valores ecotoxicológicos obtenidos en ambos estudios.

Los organismos seleccionados para el estudio de las toxicidades agudas están relacionados con el medio acuático. Todos ellos sirven de bioindicadores para estudiar la calidad del medio, y todos ellos aseguran resultados fiables en poco tiempo.

En este caso, la *Daphnia magna* sirve de representante de los dáfnidos, organismos que se pueden encontrar prácticamente en cualquier masa de agua. Su tiempo de incubación es corto al igual que su ciclo vital, y el estudio de los efectos ecotoxicológicos es fácilmente observable, puesto que se centra en la inmovilización/mortandad a las 48 h de los individuos expuestos a los compuestos químicos seleccionados.

La *Raphidocelis subcapitata* y el *Phaeodactylum tricornutum* son algas verdes. La primera habita aguas continentales, mientras que la segunda es nativa de las aguas marinas. Las algas verdes se encuentran en los niveles tróficos más bajos de los ecosistemas, por lo que cualquier variación en su desarrollo es un buen indicador de la calidad de sus aguas. La inhibición del crecimiento de las algas verdes es considerada el criterio de toxicidad, y su medida se realiza espectrofotométricamente. Su cultivo y mantenimiento es rápido y sencillo, y ofrece resultados fiables en 72 h.

La *Vibrio fischeri* es una bacteria fotolumínica que habita medios marinos. Presenta la característica de ser luminiscente, y su sensibilidad a los cambios ambientales es alta. Su manipulación y cultivo ha de ser cuidadosos, puesto que no tolera bien altas temperaturas. Surespuesta a la presencia de compuestos xenobióticos se puede apreciar a los 15 min del inicio del bioensayo bajo el criterio de disminución de la luminiscencia producida.

Los bioensayos utilizados están estandarizados para garantizar la fiabilidad de los resultados. Las normas ISO que rigen estos tests son las siguientes: ISO 6341 (*Daphnia magna*), ISO 8692 (*Raphidocelis subcapitata*), ISO 10253 (*Phaeodactylum tricornutum*) e ISO 11348-3 (*Vibrio fischeri*). En ellas se estipula el procedimiento, los objetivos y como se han de interpretar los resultados.

Tabla 8. Valores de EC₅₀ determinados. En negrita, el valor de ecotoxicidad de referencia del test según las especificaciones del mismo.

Organismo	Criterio	Categoría	Compuesto	Tiempo	EC ₅₀ (mg l ⁻¹)	
<i>Daphnia magna</i>	Inmovilización	UV-Fs ^a	BP1	24, 48 , 72 h	7,2; 5,2 ; 3,9	
			BP3	24, 48 , 72 h	2,7; 1,9 ; 1,6	
			BP4	48 , 72 h	30,4 ; 25,9	
			4HB	24, 48 , 72 h	20,5; 19,3 ; 16,7	
			EtPABA	24, 48 , 72 h	11,2; 6,8 ; 5,0	
			ODPABA	24, 48 , 72 h	> Solubilidad	
			EHMC	24, 48 , 72 h	4,9; 3,4 ; 2,9	
			4MBC	48 , 72 h	6,2 ; 2,3	
		Bio. ^b	BZT	24, 48 , 72 h	>50	
			MeBZT	24, 48 , 72 h	>50	
		Nano. ^c	TiO ₂	24, 48 , 72 h	20; 3,1 ; 0,05	
			Cons. ^d	MePB	24, 48 , 72 h	54,04; 32,5 ; 8,9
PrPB	24, 48 , 72 h			18,7; 3,8 ; 2,3		
BzPB	24, 48 , 72 h	33,6; 1,35 ; 0,6				
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Inhibición del crecimiento	UV-Fs	Nano.	TiO ₂	24, 48, 72 h	7,8; 13,6; 2,27
			Cons.	BzPB	24, 48, 72 h	21,9; 28,5; 10,6
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	Inhibición del crecimiento	UV-Fs		BP1	48, 72 h	13,3; 10, 5
				EtPABA	24, 48, 72 h	> 25
				ODPABA	24, 48, 72 h	0,07; 0,05; 0,03
				EHMC	24, 48, 72 h	3,7; 2,1; 1,8
		4MBC	24, 48, 72 h	> Solubilidad		
		Bio.	BZT	24, 48, 72 h	>50	
MeBZT	24, 48, 72 h		>50			
<i>Vibrio fischeri</i>	Bioluminiscencia	UV-Fs		4DHB	15 , 30 min	9,9 ; 9,9
				EtPABA	15 , 30 min	12,6 ; 13,2

^a Filtros UV

^b Biocidas

^c Nanomaterial

^d Conservantes

El estudio de los efectos ecotoxicológicos de una sustancia es relativamente simple, pero presenta una contrapartida y es su elevado coste, a no ser que se disponga del material necesario para cultivar y mantener los diferentes organismos en el laboratorio. Los experimentos dependen en gran medida de los precios estipulados por los diferentes proveedores, lo que implica que un estudio de ecotoxicidad que abarque un grupo amplio de compuestos puede fácilmente incurrir en sobrecostes. Este fue uno de los principales puntos en contra presentados por el sector químico europeo durante la implantación del REACH [190]. Este mismo motivo obligó a limitar el número de compuestos de exposición a los organismos en los estudios aquí discutidos.

En general se observa que las EC₅₀ (valores de concentración indicados a lo largo de toda la sección) calculadas son del orden de los pocos mg l⁻¹ en todos los organismos expuestos. Los compuestos menos lipofílicos (BP4, BZT, MeBZT y MePB) cuyas concentraciones en el medio han sido generalmente altas, presentan también umbrales de toxicidad más altos frente a la *Daphnia magna*; 30,4 mg l⁻¹ para BP4, >50 mg l⁻¹ para ambos benzotriazoles y 32,5 mg l⁻¹ para

MePB. Este patrón se observa nuevamente en el alga *Raphidocelis subcapitata* para el caso de las benzofenonas BP1, BP3 y 4HB. Por orden ascendente de Log K_{ow} , 4HB presenta la menor toxicidad (19,3 mg l⁻¹), seguida de BP1 (5,2 mg l⁻¹) y de BP3 (1,9 mg l⁻¹).

Todo ello parece indicar que la toxicidad depende en gran medida de su potencial para ser absorbidos en los tejidos biológicos. Esto está relacionado con la presencia de compuestos poco lipofílicos en tejidos vivos; los compuestos de menor Log K_{ow} presentarían una peor absorción en el organismo, favoreciendo una rápida excreción.

En *Daphnia magna*, EHMC (3,4 mg l⁻¹) y 4MBC (6,2 mg l⁻¹) son compuestos más lipofílicos que las benzofenonas, por lo su toxicidad ha de estar relacionada con su estructura molecular. Así mismo, capacidad de metabolización de éstos por parte de los organismos puede generar metabolitos que favorezcan la excreción o la transformación en compuestos menos nocivos.

Los conservantes MePB, PrPB y BzPB, muestran los mismos patrones. La toxicidad aumenta a medida que aumentan la longitud de la cadena alquílica del compuesto (1,35 – 32,5 mg l⁻¹). Esto había sido observado anteriormente al evaluar su actividad estrogénica [145].

Por otra parte, el ODPABA no presenta toxicidad alguna para la *Daphnia magna*, pero mostró los valores de toxicidad más altos en *Raphidocelis subcapitata*. Las potenciales diferencias existentes a nivel metabólico entre ambas especies es la razón de estas diferencias, mientras que el EtPABA presenta mayor toxicidad aguda en microcrustaceos que en bacterias y en algas.

Respecto al nanomaterial de base metálica TiO₂, se observan niveles de toxicidad similares tanto en *Daphnia magna* (3,1 mg l⁻¹) como en *Phaeodactylum tricornutum* (2,3 mg l⁻¹). La toxicidad del TiO₂ puede tener un origen similar a la observada en estudios de nanopartículas metálicas como Ag o Au, en los que la alteración de la permeabilidad de la membrana celular y los daños a la misma parecen ser los responsables de la mayor parte de la toxicidad que causan en los organismos vivos [115, 114].

En todos los casos la toxicidad de una sustancia parece aumentar a medida que organismo y compuesto se encuentran más íntimamente unidos, sugiriendo procesos de sensibilidad química. Se sugiere que en estudios futuros se lleven a cabo investigaciones enfocadas a conocer los mecanismos que causan la toxicidad de los PCPs en organismos vivos.

3.2.6 Mezclas binarias

Uno de los mayores problemas que existe al respecto de la toxicidad de las sustancias químicas es la falta de estudios sobre los efectos causados por la presencia de dos o más contaminantes

simultáneamente. Como se ha mostrado a lo largo de los capítulos II, III y IV, la presencia de PCPs en la mayoría de casos se extiende a la presencia simultánea de varios compuestos. A todo esto, habría que sumarle la presencia de toda clase de contaminantes de otro tipo tales como insecticidas, fármacos, metales pesados, también presentes en el medio. Esto hace necesario el estudio de mezclas de compuestos para determinar la toxicidad conjunta.

En la Publicación N° 7 se realizó este tipo de estudio para UV-Fs, conservantes y nanomateriales. Por las razones discutidas en la sección anterior, los estudios se limitaron a un solo organismo, *Daphnia magna*, y a un número limitado de compuestos.

La hipótesis de partida en estos estudios fue la de adición. Se tomaron los valores de EC_{50} de los dos compuestos a exponer conjuntamente y se calcularon las unidades tóxicas equivalentes. El objetivo tras ello era comprobar si los compuestos a concentraciones menores de las conocidas que causan un 50% de efecto (inmovilización) eran capaces de producir resultados similares en mezclas binarias.

Los resultados obtenidos correspondientes a los estudios incluidos en la Publicación N° 11 se muestran en la Tabla 9. En ella se puede comprobar que, en todos los casos, comparado con una incidencia del 50% cuando los compuestos se encuentran en solitario, las mezclas de UV-Fs orgánicos parecen ser en la mayor parte de los casos inocuos. Estos resultados sugieren un comportamiento antagónico por los centros de toxicidad; esto es, los UV-Fs compiten y bloquean el acceso a éstos, reduciendo la toxicidad total de la mezcla.

El mismo efecto se observa para la mezcla de BP3 y BZPB en un estudio actualmente en curso. BzPB es el más tóxico de los parabenos estudiados, pero la presencia de BP3 parece reducir la toxicidad de la mezcla a todas las concentraciones.

En cualquier caso, estudios futuros deberían centrarse en investigar lo que aquí se apunta, con tal de poder entender concretamente que parte de las células se ven afectadas por estos compuestos y son las causantes de la mortalidad, y cual es la razón de esta competición por los centros sensibles del organismo.

En ambos estudios, se analizó el efecto de los PCPs en presencia de nanomateriales, ya que los nanomateriales, especialmente aquellos de base carbono, pueden actuar como vectores para la introducción de contaminantes al interior del organismo. Existe cierta preocupación sobre la posibilidad de esta clase de compuestos de atravesar la barrera cutánea y de servir de “Caballo de Troya” para otros compuestos químicos. El efecto troyano de los nanomateriales está siendo estudiado en medicina, puesto que puede ayudar a suministrar medicamentos de forma más

precisa allí donde es necesario. Esta interesante aplicación de los nanomateriales por contrapartida representaría un problema mediambiental ya que podría causar un aumento de toxicidad de determinados contaminantes.

Tabla 9. Resultados de las mezclas binarias de la Publicación Nº 7.

Unidades de toxicidad		I (%) ^a	Unidades de toxicidad		I (%)
BP1	- BP3		BP3	- 4MBC	
0,2	0,8	0	0,2	0,8	0
0,5	0,5	13	0,5	0,5	0
0,8	0,2	0	0,8	0,2	10
BP1	- 4MBC		BP3	- EHMC	
0,2	0,8	0	0,2	0,8	0
0,5	0,5	13	0,5	0,5	0
0,8	0,2	1	0,8	0,2	0
BP1	- EHMC		4MBC	- EHMC	
0,2	0,8	8	0,2	0,8	0
0,5	0,5	0	0,5	0,5	5
0,8	0,2	0	0,8	0,2	0
BP1	- Nano-Ag		BP3	- Nano-Ag	
0,2	0,8	100	0,2	0,8	0
0,5	0,5	0	0,5	0,5	0
0,8	0,2	60	0,8	0,2	11
EtPABA	- Nano-Ag		4MBC	- Nano-Ag	
0,2	0,8	73	0,2	0,8	0
0,5	0,5	67	0,5	0,5	0
0,8	0,2	43	0,8	0,2	0
EHMC	- Nano-Ag				
0,2	0,8	0			
0,5	0,5	0			
0,8	0,2	0			

^a Incidencia del efecto

Los valores de los EC₅₀ estimados para los nanomateriales de base carbono fueron de 11 mg l⁻¹, 14 mg l⁻¹ y 20 mg l⁻¹ para el fullereno C60, el MWCNT y el grafeno respectivamente, mientras que el valor para la nano-Ag fue de 0,095 mg l⁻¹ [191].

Para la determinación de los efectos de las mezclas binarias de nanomaterial – UV-Fs se siguió el mismo procedimiento. Lo primero que se observó fue que, en el caso de los nanomateriales de base carbono, la toxicidad de las muestras disminuyó hasta suprimirse completamente. Esto sugiere que los nanomateriales adsorben sobre su estructura o incorporan en su interior los UV-Fs. Posteriormente, y tras su entrada en el organismo, no parece existir ningún mecanismo capaz de revertir este proceso, al menos en la escala temporal del estudio (72 h). De igual manera, esto

sugiere que la incorporación de los UV-Fs a la estructura de los nanomateriales de base carbono reduce la toxicidad de éstos.

Los nanomateriales metálicos, por otra parte, no presentan esta disminución total de toxicidad al mezclarse con los UV-Fs estudiados. La nano-Ag es un conocido biocida, por lo que su toxicidad inherente, producida por la generación de cationes Ag^+ en el medio de disolución, es capaz de producir efectos a muy bajas concentraciones. Al mezclar bajas concentraciones de este nanomaterial con BP1 y con EtPABA se observó un incremento de las toxicidades de las mezclas frente a la *D. magna*. BP1 y Nano-Ag mostraron un efecto global aditivo a mayores concentraciones de cada uno de los compuestos. Un efecto similar fue observado para las mezclas de TiO_2 con BP3 y con BzPB. El hecho de que a igualdad de unidades de toxicidad el efecto resultante sea nulo sugiere que la proporción de cada uno de los compuestos involucrados es un factor determinante de la toxicidad. No obstante, la existencia de efectos sinérgicos entre diferentes PCPs es probable, dado que este tipo de efecto comportamiento ya ha sido observado con anterioridad en mezclas binarias de biocidas como TCS y TCC [192].

Por otra parte, la mezcla nano-Ag y EtPABA presenta un incremento de la toxicidad a todas las concentraciones, pero ésta disminuye a medida que la proporción de EtPABA aumenta. En el caso de BP3, 4MBC y EHMC, no se observó un incremento significativo de la toxicidad, pudiendo bloquear la inherente toxicidad del nanomaterial. En estos casos, al igual que ocurría con la disminución de la toxicidad al incrementar la proporción de EtPABA, parece ser que la adsorción de los contaminantes sobre la superficie del nanomaterial puede ser suficiente para evitar la toxicidad de éste. Este efecto también ha sido descrito en bioensayos de mezclas de nano-Ag con ácidos húmicos [193]. En este caso, los ácidos húmicos se vió que creaban una capa alrededor del metal, anulando su potencial toxico.

En cualquier caso, todo parece indicar que las mezclas binarias entre UV-Fs y de UV-Fs con nanomateriales de base carbono causan una reducción del potencial tóxico de los compuestos involucrados. Sin embargo, en el caso de los nanomateriales metálicos el fenómeno que tiene lugar no está claro.

La presencia de nanomateriales en el medio, especialmente aquellos metálicos, presenta una serie de potenciales riesgos para el medio ambiente. Con el desarrollo de técnicas de tratamiento de aguas como las membranas de microfiltración recubiertas de nanomateriales y el desgaste de éstas mediante la liberación de cationes [194], se espera que la presencia de estos materiales en el medio aumente. Es por ello que la interacción entre los nanomateriales y

contaminantes emergentes como los PCPs ha de ser mejor estudiada con el fin de asegurarse que una vez finalizado el proceso la toxicidad sea menor.

3.2.7 Estimación del riesgo ambiental

A lo largo de los Capítulos anteriores se ha discutido la presencia de PCPs en diferentes matrices ambientales, los mecanismos involucrados en su distribución en el medio ambiente, los focos de contaminación y su eliminación en las EDARs. Se ha discutido como estos contaminantes se distribuyen en el interior de un organismo, como se transmiten entre generaciones y el alcance de su presencia. No obstante, no se ha discutido el riesgo que estos compuestos suponen para el medio ambiente en escenarios de estudio reales.

En las Publicaciones Nº 1, 2, 4, 5 y 7 se incluyen las estimaciones de riesgo ambiental para las diversas matrices estudiadas. Los valores calculados han sido compilados en las Figuras 6, 7, 8, 9 y 10 para ofrecer una visión global de todos los casos de estudio.

En la sección 1.4.2 del Capítulo 1, se introdujo el concepto de HQ. Estos valores indican la posibilidad de riesgo en el ecosistema. Valores de HQ inferiores a 0,5 indican riesgo nulo o bajo, valores de HQ entre 0,5 y 1 presentan un riesgo moderado y valores de HQ iguales o superiores a 1 indican una situación de riesgo.

Los valores han sido calculados teniendo en cuenta los datos de toxicidad disponible en la bibliografía al tiempo de la realización de cada estudio. Para la estimación de los HQs se tomaron los valores de EC_{50} , LC_{50} y NOEC más restrictivos para aquellos organismos disponibles. Se entiende por restrictivo aquellos valores que suponen un EC_{50} determinado a concentraciones más bajas, cuando existen más de dos determinaciones para un mismo organismo.

En las aguas superficiales de la Publicación Nº 1 (Figura 6) se observa que las concentraciones ambientales presentes en los ríos Besòs y Llobregat se encuentran, en su mayoría, por debajo del umbral de riesgo. La toxicidad aguda de los UV-Fs se halla entre uno y dos órdenes de magnitud por debajo. Las concentraciones de benzotriazoles, por otra parte, presentan niveles más preocupantes. Las concentraciones máximas de estos compuestos en las aguas del río Besòs conllevan valores de HQ próximos a 1. Esto quiere decir que, pese a que siguen por debajo, la probabilidad de que se generen daños para el ecosistema es moderada, y dado que el uso de esta clase de compuestos está en aumento, se espera que puedan llegar a superar el umbral de riesgo. Es posible que, en episodios de bajo caudal (menor efecto dilución de los contaminantes y mayor proporción de las aguas residuales en los ríos) a lo largo del año, BZT y MeBZT supongan un riesgo para dáfnidos y colonias bacterianas.

Respecto a la toxicidad crónica de los organismos acuáticos a las concentraciones presentes no se espera situación de peligro en ninguno de los dos ríos. No obstante, la toxicidad crónica suele requerir de concentraciones más bajas para generar situaciones de peligro al tener una mayor exposición temporal, por lo que es posible que existan organismos afectados cuyos efectos se hagan evidentes a mayor largo plazo que el que puede simular el bioensayo.

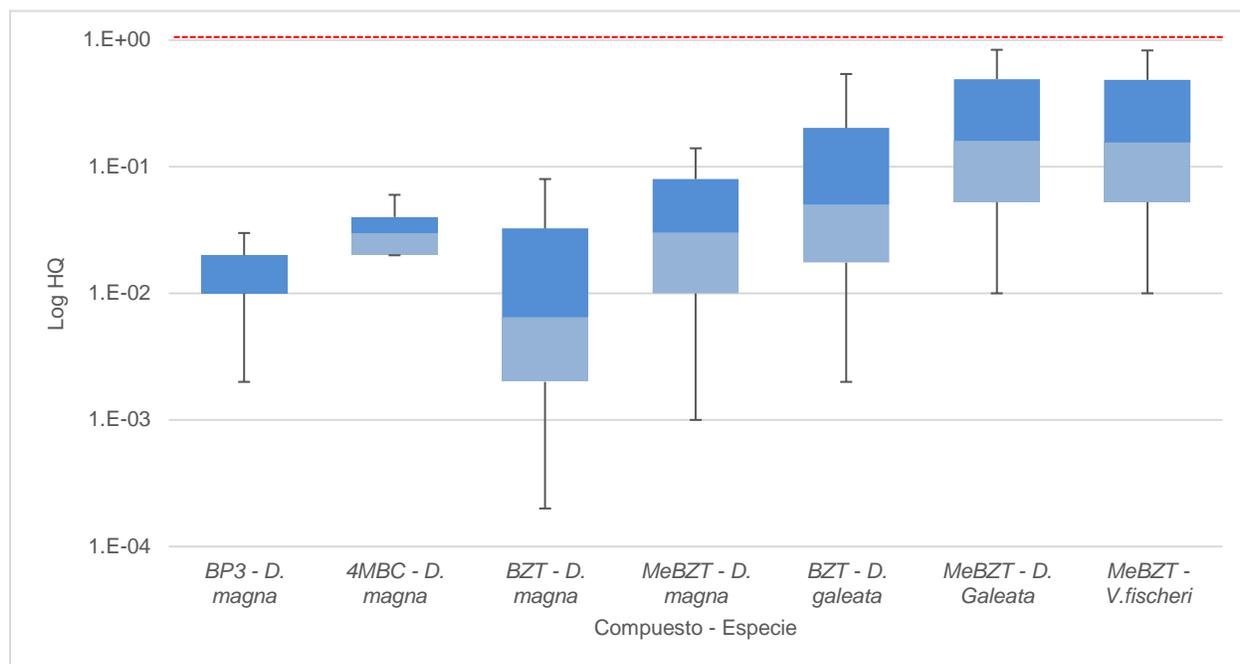
Siguiendo con las aguas superficiales, los niveles de IRs (Publicación 2) en las cuencas de los ríos europeos no suponen, en la mayor parte de sus cauces, un riesgo para los organismos seleccionados (Figura 7). En este caso, y ante la ausencia de datos para Bayrepel, se han incluido los valores de toxicidad estimados por el programa ECOSAR desarrollado por la US Environmental Protection Agency. Los HQs estimados se encuentran entre uno y tres ordenes de magnitud por debajo de $HQ = 1$. No obstante, existen algunos puntos en los cauces de los ríos Eurotas y Sava donde las concentraciones actuales constituyen un riesgo moderado - alto para dáfnidos, algas y peces. Estos puntos se corresponden con zonas donde la presión antropogénica es más elevada (nucleos urbanos y proximidad de EDARs). En el caso de las aguas del Adigio, las concentraciones halladas eran las más bajas de los tres ríos estudiados, por lo que el riesgo que estos compuestos suponen es bajo.

Las concentraciones actuales, respecto a la toxicidad crónica, conllevan un riesgo bajo. No obstante, las concentraciones de DEET observadas en el curso del río Eurotas suponen un riesgo entre moderado y alto para las algas verdes.

Se ha de tener en cuenta, especialmente en los ríos Llobregat, Besòs y Eurotas, que la estacionalidad de las lluvias y las variaciones de caudal de agua juegan un factor importante en la toxicidad de las aguas. El río Besòs y el Eurotas pasan por épocas de gran escasez de agua, por lo que de forma puntual se podrían superar los umbrales de riesgo al aumentar las concentraciones de los contaminantes en los ríos.

En la Publicación 7 (Figura 8) se estimaron los HQs para aguas subterráneas de los acuíferos bajo Barcelona y el río Besòs. En este caso, las concentraciones de PCPs medidas fueron bajas, y con ello el riesgo que suponen, al encontrarse sus HQs entre cuatro y cinco órdenes de magnitud por debajo de la unidad.

a)



b)

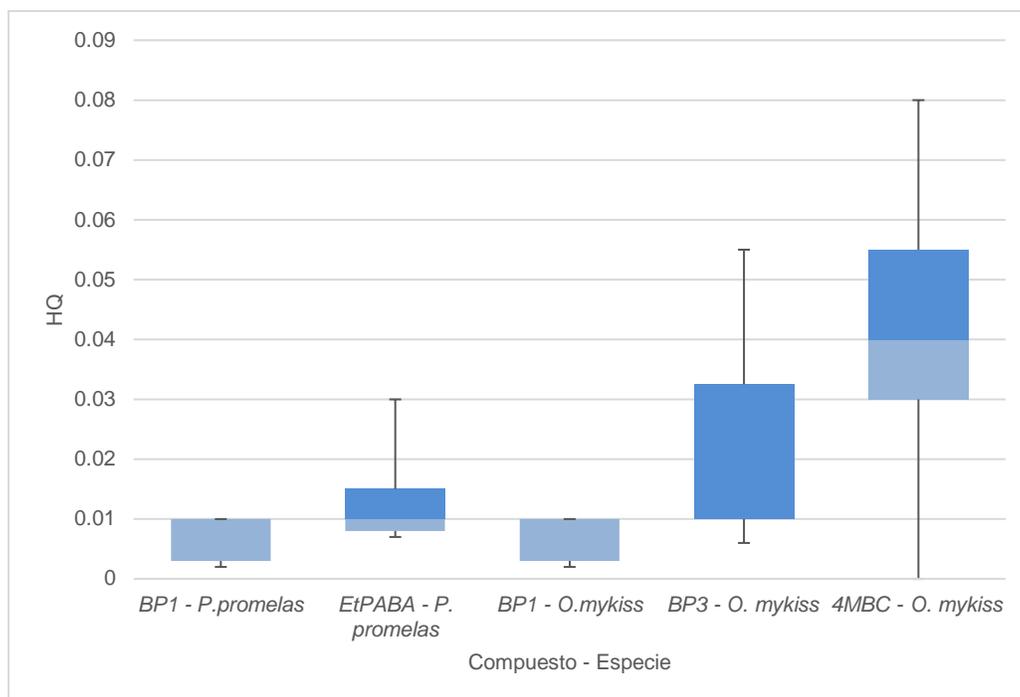
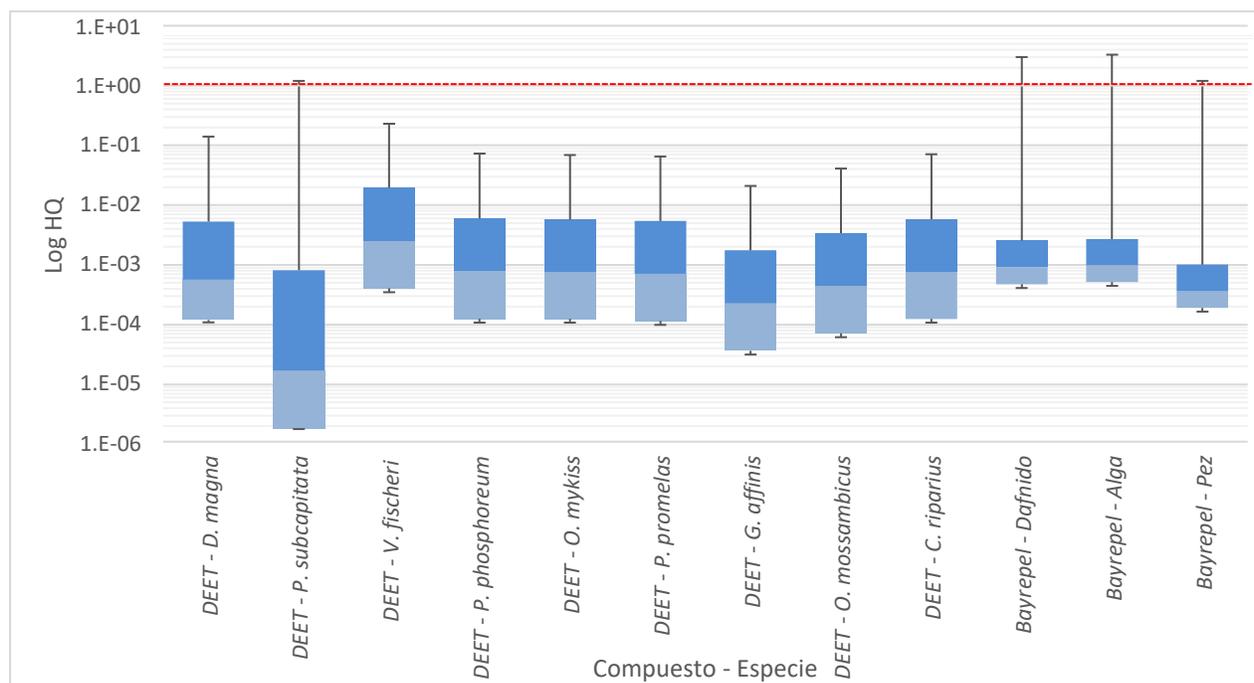


Figura 6. Coeficientes de riesgo (HQ) en aguas superficiales para UV-Fs y biocidas (Publicación N° 1): a) toxicidad aguda, b) toxicidad crónica.

a)



b)

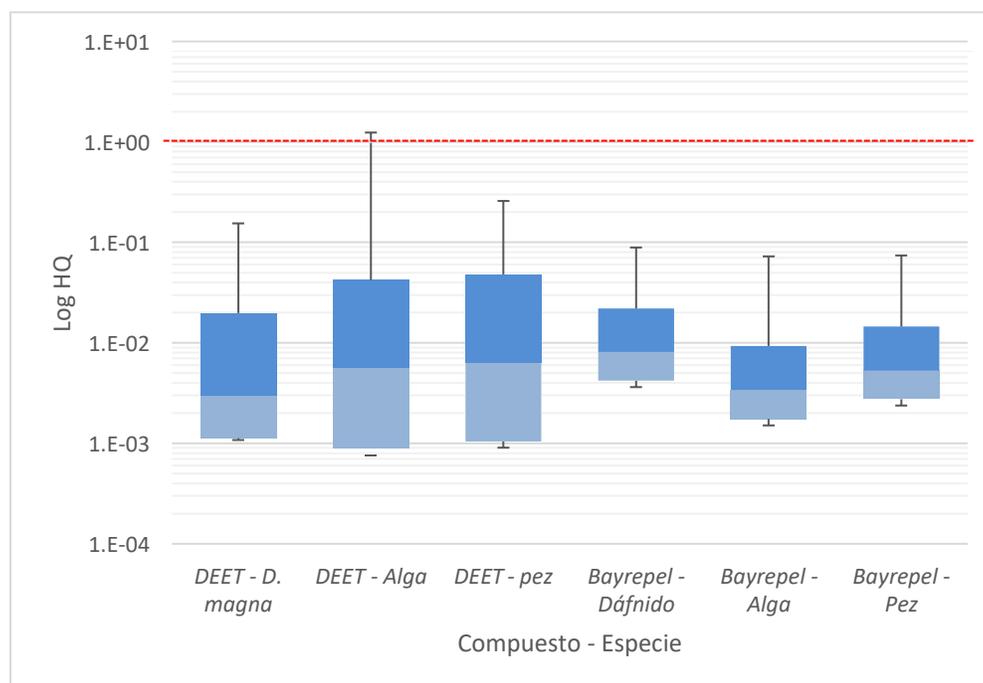


Figura 7. Coeficientes de riesgo (Log HQ) en aguas superficiales para IRs (Publicación Nº 2): a) toxicidad aguda, b) toxicidad crónica.

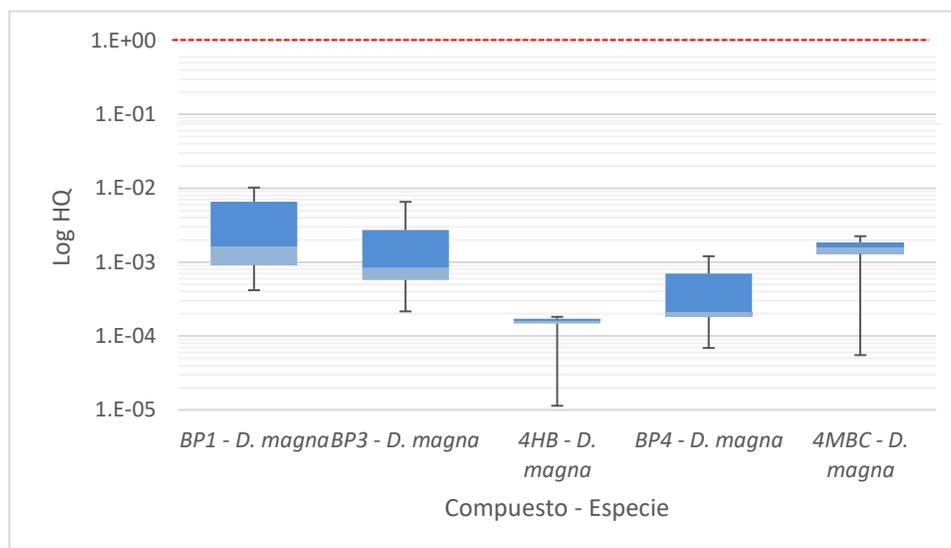


Figura 8. Coeficientes de riesgo (Log HQ) en aguas subterráneas para UV-Fs (Publicación N° 7).

Las aguas residuales estudiadas en las Publicaciones N° 1, 3 y 4 presentaron elevadas concentraciones de PCPs y pobres eliminaciones en las EDARs algunos casos, especialmente de aquellos menos lipofílicos. La Figura 9 muestra el riesgo que los influentes supondrían para el ecosistema. En este caso, los HQs pueden variar 5 órdenes de magnitud, y en más de un punto las concentraciones de PCPs suponen un riesgo moderado o alto. De ellos, BZT, MeBZT y PrPB presentan las concentraciones más preocupantes, al poseer HQ = 1 para dáfnidos, bacterias y peces.

Si tomamos en consideración las toxicidades derivadas de la exposición crónica, el riesgo es mucho mayor, con prácticamente todos los PCPs suponiendo un riesgo entre moderado y alto en diversos influentes. En este caso, los parabenos presentan las concentraciones más preocupantes, al superar los umbrales de riesgo para dáfnidos y peces. BP3 supone un riesgo moderado, y el HQ de la BP4 superó la unidad en una EDAR. En el momento de la realización del estudio no había datos de toxicidad crónica de benzotriazoles, por lo que se desconoce el riesgo que suponen. No obstante, y dado su carácter biocida, es de esperar que supongan un riesgo para dáfnidos y bacterias.

De todos los casos de estudio s discutidos en esta memoria, el río Eurotas, la cuenca del río Iguazú y la bahía de Guanabara presentan puntos de vertido de aguas residuales sin tratar, por lo que es de esperar que la contaminación por PCPs esté afectando al ecosistema de forma visible a la vista de los resultados obtenidos para los influentes en EDARs.

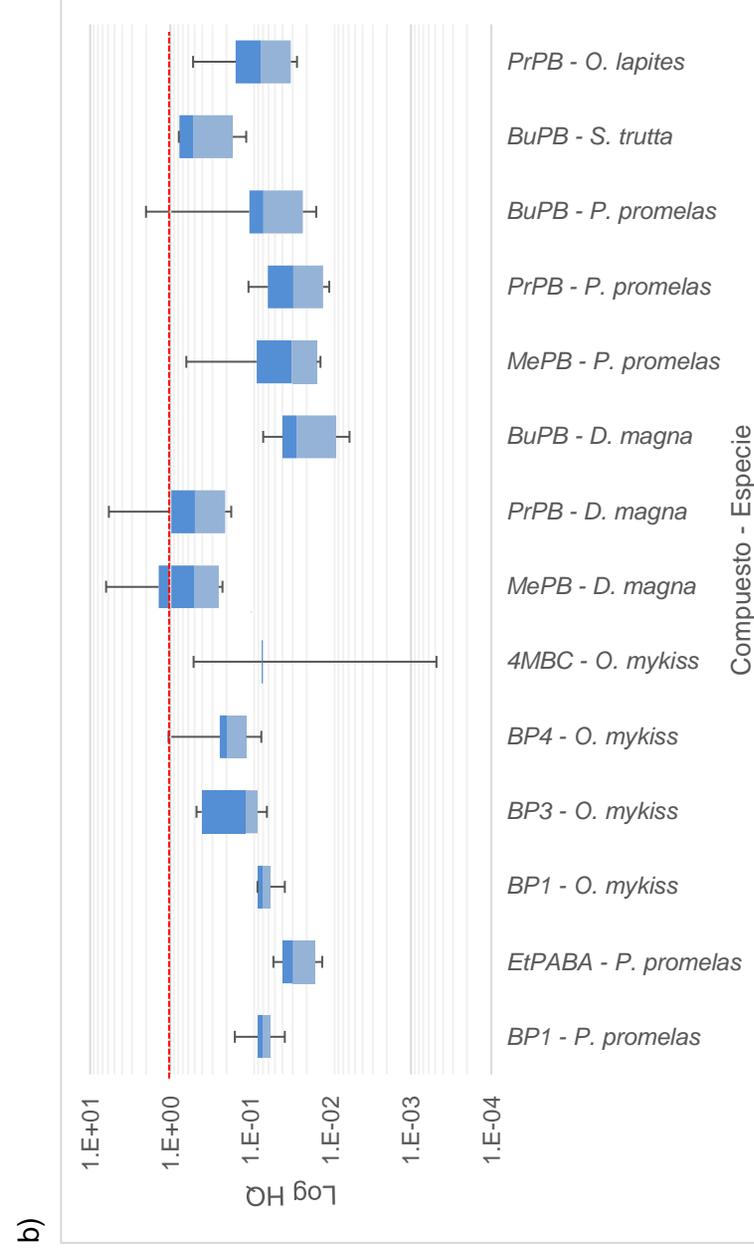
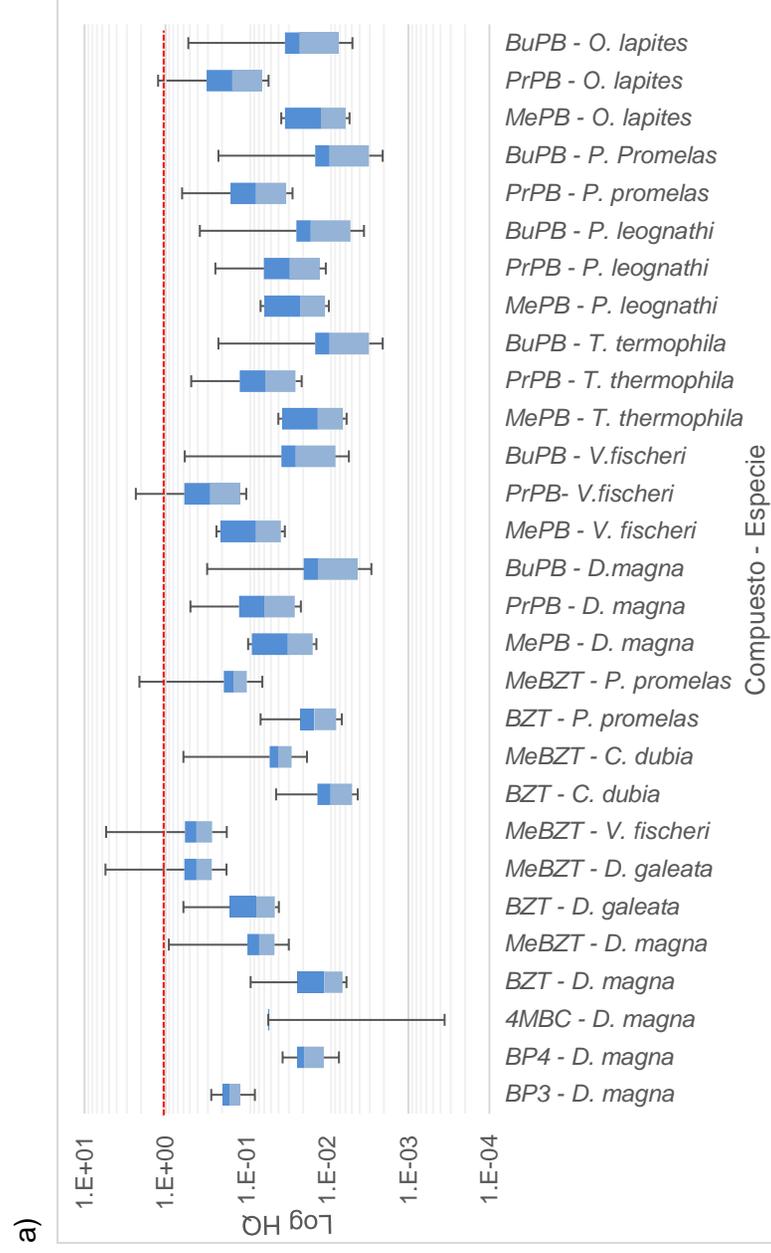
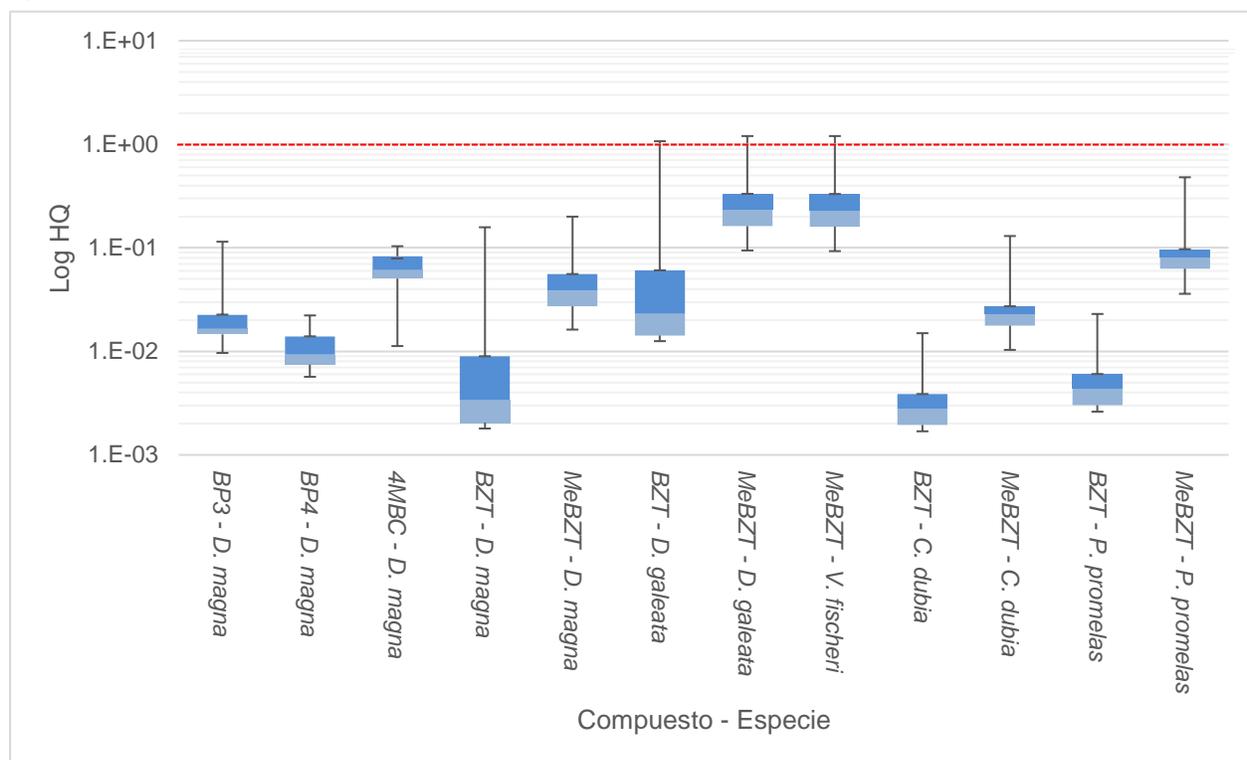


Figura 9. Coeficientes de riesgo (Log HQ) de UV-Fs, biocidas y conservantes en influentes (Publicaciones Nº 1, 4 y 5): a) toxicidad aguda, b) toxicidad crónica.

a)



b)

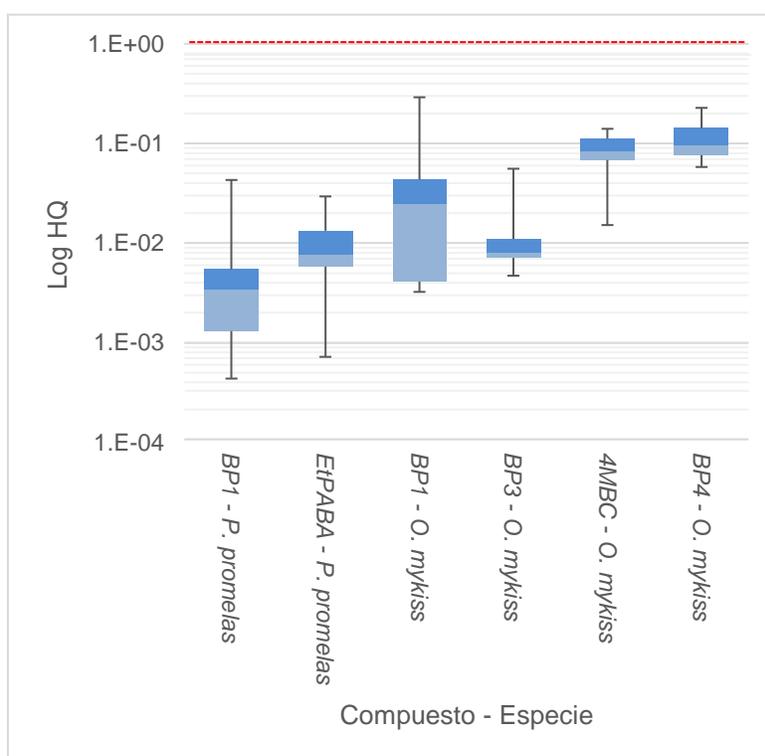


Figura 10. Coeficientes de riesgo (Log HQ) de UV-Fs, biocidas y conservantes en efluentes (Publicaciones N° 1, 4 y 5): a) toxicidad aguda, b) toxicidad crónica.

Una vez tratadas las aguas residuales, los efluentes son vertidos al medio. Dada la gran variabilidad en la eliminación de los PCPs es previsible que sigan existiendo situaciones de riesgo medio y alto, como se muestra en la Figura 10. Los HQs en aguas tratadas suponen un riesgo bajo en la mayoría de los casos, incluyendo la BP4. No obstante, BZT y MeBZT sufren eliminaciones variables y más bien bajas en algunas EDARs, por lo que se vierte al medio una gran cantidad de estos contaminantes. Es de esperar que en las proximidades de algunos emisarios las concentraciones de estos compuestos supongan un riesgo para dáfnidos y bacterias, y un riesgo moderado para peces.

La exposición crónica a estas concentraciones supone un riesgo bajo, siendo BP1, BP4 y 4MBC los compuestos que mayor riesgo suponen en algunos de los efluentes considerados. Al igual que en las aguas residuales, la ausencia de datos sobre BZT y MeBZT impide conocer el impacto que estas benzotriazoles pueden estar causando en el medio.

A lo largo de esta sección se ha mostrado uno de los mayores problemas con los que la estimación de HQs se topa, y es la de la falta de datos de toxicidad. La bibliografía actual presenta aún multitud de huecos de información referente a las ecotoxicidades de los PCPs. De los dos tipos, aguda y crónica, la escasez de datos se la última puede afectar gravemente la caracterización del riesgo potencial.

No obstante, y como se ha discutido en la sección 3.2.6, estos compuestos no se presentan en solitario en el medio, por lo que la acción combinada de mezclas de contaminantes hace difícil predecir el riesgo real al que los ecosistemas se enfrentan. En los próximos años, se espera un aumento del uso de los PCPs, y ello podría conllevar un incremento en la degradación potencial del ecosistema.

3.3 Conclusiones

En este capítulo se han descrito las metodologías para el análisis de PCPs en aguas residuales y lodos de EDARs de Cataluña. Las metodologías descritas son sensibles y selectivas y buscan la mayor simplicidad de análisis. Dadas las propiedades fisicoquímicas de los compuestos, éstas han sido desarrolladas con el fin de poder trabajar tanto en ionización positiva como en negativa.

Las concentraciones de PCPs en los influentes presentan niveles que oscilan entre los pocos ng l⁻¹ y los µg l⁻¹. Los compuestos más polares se encuentran en concentraciones generalmente superiores y su presencia parece ser constante, independientemente del origen de las aguas residuales. Los valores determinados de PCPs más elevadas corresponden a aquellas

provenientes de zonas densamente pobladas y con un gran tejido industrial. En el caso de BZT y MeBZT se identifica su extenso rango de aplicación como el motivo de sus altos niveles.

Globalmente las concentraciones presentes en los efluentes son menores, especialmente para aquellos compuestos más lipofílicos. Los compuestos más polares siguen mostrando un rango de concentraciones amplio, adentrándose en algunos puntos en los $\mu\text{g l}^{-1}$. Se ha observado que la eliminación en las EDARs estudiadas es altamente variable. Los compuestos más polares presentan el rango más variable de eliminaciones, indicando que los procesos de tratamiento actuales no son eficientes para eliminar esta clase de compuestos. Por su parte, los parabenos son eliminados prácticamente en su totalidad.

La presencia de EDARs donde las concentraciones en el efluente son mayores que en el influente puede tener sus raíces en aportes causados por procesos de transformación desde moléculas más complejas y complejos moleculares presentes en las aguas de entrada. La falta de bibliografía sobre el tema requiere de estudios para determinar las causas exactas.

Se ha observado también que, donde existen medidas de eliminación de EDARs en distintos periodos temporales, la eliminación de los benzotriazoles es altamente variable. Se aconseja estudiar los motivos por los cuales esto puede estar causado.

Las emisiones al medio por parte de las EDARs han sido estimadas entre los pocos $\text{mg año}^{-1} \text{hab}^{-1}$ hasta los cientos de $\text{mg año}^{-1} \text{hab}^{-1}$ y se espera que valores similares sean determinados en futuras publicaciones. Puesto que el consumo de PCPs en el mundo está en aumento, es esperable que estas emisiones al medio ambiente se incrementen dada la imposibilidad de eliminarlos totalmente con los tratamientos actuales.

El estudio de biodegradación de PCPs en lodos de EDAR ha revelado que el hongo *Trametes versicolor* puede facilitar la eliminación de estos contaminantes. El hongo puede ser reinoculado en lodos no estériles y sin sustrato previo, obteniendo eliminaciones del orden del 80% para los UV-Fs. Futuros estudios deberían estar enfocados a estudiar la aplicabilidad a gran escala, su uso para la eliminación de un mayor rango de contaminantes emergentes, y al estudio de la potencial toxicidad de los metabolitos producidos durante la degradación.

Respecto a los efectos de los PCPs, en esta sección se han presentado también los resultados de los estudios de ecotoxicidad aguda. Se realizaron con organismos que ofrecen una respuesta rápida e inequívoca a la presencia de compuestos xenobióticos en el medio, y que son usados como bioindicadores de la calidad del medio. Los compuestos estudiados fueron UV-Fs, biocidas, conservantes y nanomateriales.

Los resultados mostraron que las toxicidades de estos contaminantes están en el rango de los mg l⁻¹. Se observó que la ecotoxicidad en estos compuestos depende en gran medida de su lipoficidad. El ODPABA mostró la mayor toxicidad de los estudios realizados en algas verdes. BZT y MeBZT fueron los compuestos con menor toxicidad frente a *Daphnia magna* y *Raphidocelis subcapitata*.

Se estudiaron las mezclas binarias de compuestos en *Daphnia magna*. Los resultados indican que la toxicidad disminuye cuando dos compuestos entran en contacto simultáneamente con el organismo. Esto parece indicar que los PCPs estudiados compiten por los centros de toxicidad de las células del organismo.

Se estudiaron los efectos de las mezclas de PCPs con nanomateriales. En presencia de nanomateriales de base carbono, la toxicidad de la disolución quedaba anulada. Los nanomateriales absorben en su interior o adsorben en su gran superficie exterior los contaminantes y los hace inaccesibles al organismo.

Los nanomateriales metálicos, pueden incrementar la toxicidad de las mezclas con PCPs. Nano-Ag en presencia de BP1 y EtPABA presentó una toxicidad mayor que con los compuestos en solitario, sugiriendo actividad aditiva o sinérgica dependiendo de las proporciones de cada uno. Un comportamiento similar fue observado para las mezclas de TiO₂ con BP3 y BzPB. La generación de cationes metálicos que alteran la permeabilidad de la membrana celular puede ser la causa, facilitando la entrada de otros contaminantes al interior de la célula. No obstante, la toxicidad puede disminuir con algunos PCPs al formarse una capa que estabiliza el catión metálico.

Debido a su capacidad para adsorber contaminantes y su potencial biocida, se espera que el uso de los nanomateriales en procesos de eliminación y bioremediación se incremente en el futuro, por lo que es necesario estudiar el destino final de éstos en el medio ambiente.

Se estudió el riesgo representado por los PCPs para los ecosistemas en el medio acuático estimando los HQs. Los resultados mostraron que, salvo algunas excepciones, las concentraciones actuales determinadas experimentalmente en nuestros casos de estudio no suponen un riesgo elevado para el ecosistema. En aguas superficiales, DEET, BZT y MeBZT suponen un riesgo entre moderado y alto en diversos puntos de las cuencas fluviales estudiadas, especialmente en la proximidad de centros de mayor densidad poblacional. En el caso de los ríos mediterráneos, las variaciones estacionales en el caudal pueden elevar el riesgo que estos compuestos suponen. Por otra parte, las aguas subterráneas no están en riesgo.

En cuanto a las aguas residuales, las concentraciones de contaminantes del influente, en general elevadas, suponen un riesgo más alto para el ecosistema, especialmente en lugares donde las aguas residuales son directamente vertidas al medio sin ser tratadas. En cuanto a las concentraciones de los efluentes, el riesgo es menor, pero no nulo; las elevadas concentraciones de BZT y MeBZT constituyen un riesgo en algunos puntos.

El estudio de la toxicidad crónica indica que las concentraciones de PCPs en las diversas matrices representan un riesgo entre bajo y moderado, pero la falta de datos de toxicidad con los cuales realizar las estimaciones dificulta la estimación.

Capítulo IV

Presencia en biota y humanos

4.1 Introducción

En los Capítulos II y III se ha discutido la presencia de PCPs en el medio acuático, así como la eliminación en las EDARs y las emisiones causadas por las mismas. En el Capítulo I se menciona ya la presencia de PCPs en biota y se hizo al respecto de los efectos adversos que éstos podían causar.

Como ya se ha comentado con anterioridad, los organismos acuáticos se encuentran expuestos a los PCPs crónicamente dado su contacto y dependencia con el agua. Entre los organismos más estudiados se encuentran los peces, pero existe una gran carencia de investigaciones sobre la presencia de estos compuestos en otros organismos debido a las dificultades que presenta la toma de muestra de otras especies y la obtención de sus tejidos. Los huevos de las aves son un buen ejemplo de tejido relativamente fácil de muestrear. No todos los huevos de una puesta son viables, por lo que el análisis de los huevos no eclosionados de aves abre las puertas al estudio de los contaminantes emergentes en aves de forma no intrusiva.

Por otra parte y a diferencia de otros organismos, los seres humanos nos exponemos involuntaria pero también voluntariamente a estos compuestos. La principal vía de entrada de los PCPs a nuestro organismo es la aplicación cutánea de compuestos químicos sobre la piel, mucosas, cuero cabelludo y uñas y su posterior absorción. Estudiar la presencia de PCPs en seres humanos requiere de voluntarios y la biopsia de tejidos suele ser un método intrusivo. Por otra parte, fluidos como la leche materna o tejidos como la placenta no requieren de métodos intrusivos, puesto que ambos son accesibles tras el parto, y ofrecen información sobre la carga de PCPs que potencialmente se transfiere de la madre al feto y/o al neonato.

El foco de este capítulo se centra en la presencia y bioacumulación de PCPs en organismos vivos en dos esferas diferentes: la medioambiental y la humana. Se presentan estudios sobre la presencia de PCPs en diferentes tejidos de pez, en huevos de aves y en placenta y leche materna humanas.

4.1.1 Objetivos

El principal objetivo de este capítulo es caracterizar la presencia de PCPs en tejidos de seres vivos. Se determinarán niveles de UV-Fs en tejido hepático, muscular y branquial de *Mugil liza* procedente de un área altamente impactada por la actividad humana. También se analizará la presencia de estos compuestos en huevos de diferentes aves de una zona natural protegida.

La caracterización de las concentraciones de UV-Fs y conservantes en seres humanos se llevará a cabo mediante los análisis de leche materna y placenta procedentes de madres de Cataluña.

Adicionalmente, para el análisis de leche materna se describirá el desarrollo y la aplicación de una metodología de análisis en línea basada en la cromatografía de flujo turbulento y HPLC-MS/MS.

Con todo ello se pretende expandir el conocimiento sobre la presencia de PCPs en organismos vivos y los posibles mecanismos de bioacumulación.

4.1.2 Estructura

El presente capítulo incluye las cuatro publicaciones siguientes:

D. Molins-Delgado, R. Muñoz, S. Nogueira, M.B. Alonso, J.P. Torres, O. Malm, R.L. Zioli, R.A. Hauser-Davis, E. Eljarrat, D. Barceló, M.S. Díaz-Cruz, "Occurrence of organic UV filters and metabolites in lebranche mullet (*Mugil liza*) from Brazil," *Science of the Total Environment* (enviado).

D. Molins-Delgado, M. Máñez, A. Andreu, F. Hiraldo, E. Eljarrat, M. S. Díaz-Cruz, D. Barceló, "A potential new threat to wild life: presence of UV filters in bird eggs from a preserved area," *Environmental Science and Technology* (en prensa) DOI:10.1021/acs.est.7b03300.

D. Molins-Delgado, M.M. Olmo-Campos, G. Valeta-Juan, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, "Determination of UV filters in human breast milk using turbulent flow chromatography and babies' daily intake estimation," *Environmental Research* (enviado).

J. Valle-Sistac, D. Molins-Delgado, M. Díaz, L. Ibáñez, D. Barceló, M.S. Díaz-Cruz, "Determination of parabens and benzophenone-type UV filters in human placenta. First determination of the existence of benzyl paraben and benzophenone-4," *Environment International*, vol. 88, pp. 243-249, 2016.

Seguidamente se describirán las metodologías aplicadas y se procederá a discutir los resultados obtenidos en peces, huevos de aves, y muestras humanas. También se discutirá la transferencia de contaminantes madre –feto/neonato.

Publicación Nº 8

Occurrence of organic UV filters and metabolites in lebranche mullet (Mugil liza) from Brazil

Por

D. Molins-Delgado, R. Muñoz, S. Nogueira, M.B. Alonso, J.P. Torres, O. Malm,
R.L. Ziolli, R.A. Hauser-Davis, E. Eljarrat, D. Barceló, M.S. Díaz-Cruz

en

Science of the Total Environment (enviado)

Información adicional disponible en el Anexo IV

Atención!!

Por razones de copyright, las páginas 178 a 194 de la tesis, que contienen el pre-print del artículo citado, deben consultarse en la web del editor

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969717330917>

Publicación Nº 9

*A potential new threat to wild life:
presence of UV filters in bird eggs from a preserved area*

Por

D. Molins-Delgado, M. Máñez, A. Andreu, F. Hiraldo, E. Eljarrat,

D. Barceló, M. S. Díaz-Cruz

en

Environmental Science and Technology (en prensa) DOI: 10.1021/acs.est.7b03300.

Información adicional disponible en el Anexo IV

Atención!!

Por razones de copyright, las páginas 196 a 204 de la tesis, que contienen al artículo citado, deben consultarse en la web del editor

<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.est.7b03300>

Publicación Nº 10

Determination of UV filters in human breast milk using turbulent flow chromatography and babies' daily intake estimation

Por

D. Molins-Delgado, M.M. Olmo-Campos, G. Valeta-Juan, V. Pleguezuelos-Hernández,
D. Barceló, M.S. Díaz-Cruz

en

Environmental Research (enviado)

Información adicional disponible en el Anexo I

Atención!!

Por razones de copyright, las paginas 206 a 224 de la tesis, que contienen el pre-print del artículo, deben consultarse en la web del editor

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935117317073>

Publicación Nº 11

Determination of parabens and benzophenone-type UV filters in human placenta. First determination of the existence of benzyl paraben and benzophenone-4

Por

J. Valle-Sistac, D. Molins-Delgado, M. Díaz, L. Ibáñez,
D. Barceló, M.S. Díaz-Cruz

en

Environment International, vol. 88, pp. 243-249, 2016

Atención!!

Por razones de copyright, las paginas 226 a 232 de la tesis, que contienen el artículo citado, deben consultarse en la web del editor

<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.est.7b03300>

4.2 Discusión

4.2.1 Metodologías analíticas

En los Capítulos II y III se han discutido las metodologías empleadas para el análisis de aguas naturales, residuales, sedimentos y lodos de depuradora. En este capítulo se completa la discusión de las metodologías con aquellas enfocadas al análisis de muestras biológicas.

Las metodologías referentes al análisis de muestras de origen biológico presentan una problemática propia derivada del origen de la muestra. Los tejidos biológicos poseen grandes cantidades de lípidos y proteínas, los cuales pueden complicar enormemente un análisis de estas características. Esto dificulta en gran parte la tendencia manifiesta hacia la automatización de los procesos, puesto que la eliminación de las interferencias requiere la introducción de pasos adicionales de purificación.

En el caso de muchos otros contaminantes orgánicos persistentes o emergentes, las interferencias de la matriz se suelen eliminar mediante un ataque ácido. Muchos de los PCPs no son estables en medio ácido, por lo que un tratamiento de estas características a las muestras o a los extractos supondría la eliminación de un gran número de estos contaminantes, y por lo tanto, resulta un método inviable.

En la Publicación N° 8, se utilizó una metodología para el análisis de peces basada en una metodología previamente desarrollada en nuestro grupo por Gago-Ferrero et al. [195]. La metodología está descrita para el análisis de UV-Fs en muestra homogeneizada de pez. El método requirió de 1 g dw de tejido. Al tejido se le realizó una extracción y purificación mediante PLE usando Florisil ($MgSiO_3$) como adsorbente en la propia celda de extracción. El Florisil permite realizar la purificación de muestras que poseen lípidos y proteínas. Pero este proceso demostró no ser suficiente, y fue necesario incluir una purificación del extracto PLE mediante SPE utilizando cartuchos de C18 para completar la separación de los analitos de las interferencias. El análisis de los extractos se realizó mediante HPLC-MS/MS. En el caso de la Publicación N° 7, se analizaron diferentes tejidos biológicos de un mismo organismo y se adaptó la metodología para utilizar únicamente 0,5 g dw de tejido)

La misma metodología recién optimizada se utilizó en el análisis de las muestras de huevos de aves de la Publicación N° 9. En este caso, la cantidad de masa analizada se redujo aún más, hasta los 0,1 g de tejido liofilizado (dw). Se tomó la decisión después de comprobar que la fracción proteica de los huevos era considerable, llegando a obstruir el paso de los extractos PLE por los

cartuchos de SPE. La reducción de las cantidades de masa en ambos casos no supuso una reducción de la sensibilidad ni de la selectividad en el análisis, y demostró ser muy adecuado, puesto que los requerimientos de disolventes y tiempo de análisis se redujeron considerablemente.

Para el análisis de muestras de origen humano se optó por otra estrategia. El estudio de leche materna (Publicación Nº 10) requirió del desarrollo de un método específico para una mayor cantidad de muestra. En concreto utilizamos 2 g de leche. La precipitación de las proteínas y la extracción de los analitos se realizó usando acetonitrilo y una extracción líquido-líquido asistida por ultrasonidos (USE). La centrifugación a baja temperatura permitió la separación de la materia sólida del extracto. El pretratamiento de la muestra se continuó en línea utilizando un equipo capaz de realizar una cromatografía de flujo turbulento (TFC) antes del análisis mediante HPLC-MS/MS.

El fundamento de esta técnica de extracción de flujo radica en la separación de los analitos de cualquier molécula lipídica y/o proteica utilizando una columna polimérica porosa en la cual los analitos son introducidos mediante un flujo turbulento. Esto permite una purificación exhaustiva en línea de las muestras para su inmediato análisis, minimizando, como es el caso en las otras técnicas en línea comentadas en esta memoria, las pérdidas de analitos por exceso de pasos y la obtención de buenos resultados. Al igual que en el caso de los análisis realizados en línea para IRs en muestras de agua superficial (Capítulo I), la columna de flujo turbulento es reutilizable y requiere de un buen mantenimiento. Por otra parte, es necesario hacer lavados exhaustivos entre series de análisis para evitar posibles efectos memoria.

En el caso de las placentas humanas, la metodología se desarrolló para el análisis de UV-Fs y parabenos. Las placentas se analizaron en fresco utilizando una extracción sólido-líquido mediante USE, requiriendo 1,5 g de tejido por muestra. Los extractos necesitaron de dos centrifugaciones mientras se redujo la cantidad de volumen del mismo y se añadió la fase móvil. El proceso culminó con el análisis de los analitos por medio de HPLC-MS/MS. La metodología descrita en la Publicación Nº 11 demostró ser rápida, requerir poca cantidad de disolventes y permitió la preparación simultánea de múltiples muestras, sin sacrificar una buena sensibilidad y selectividad a la hora del análisis. Nuevamente, y retomando lo comentado en la sección 3.2.2 sobre el análisis de parabenos, BP4 (y teniendo en cuenta la inclusión de BP2), la detección mediante MS/MS se realizó en modo de ionización negativo.

Las muestras de origen biológico son muestras complejas y, como ya se ha discutido en el caso de las aguas residuales (sección 3.2.1), el efecto de la matriz juega un papel importante a la hora del análisis. En el caso de las muestras biológicas podríamos diferenciar tres estrategias viables: (1) poseer suficiente cantidad de muestra, realizar las rectas de calibrado en matriz; (2) utilizar la calibración-cuantificación por adición estándar; y (3) diluir la muestra lo suficiente para minimizar el efecto de la matriz.

En el caso de las publicaciones aquí presentadas se optó siempre por el uso de rectas en matriz. No obstante, al no disponer de muestra suficiente se recurrió a matrices similares (en este caso a leches y huevos comerciales). La adición estándar es una opción plenamente viable, pero requiere de una mayor cantidad de recursos y de tiempo, puesto que técnicamente se está construyendo una recta en matriz para cada muestra. Los análisis consecutivos de todo el grupo de muestras por cada adición incurrir en un encarecimiento del análisis. Por otra parte, la dilución de las muestras, aunque minimiza los efectos de la matriz, puede llegar a comprometer la habilidad para poder discernir bajas concentraciones de analitos.

La obtención de muestras de origen biológico es difícil, lo que lleva a la búsqueda de metodologías rápidas y eficientes de análisis. En las cuatro metodologías aquí descritas se ha buscado siempre la reducción de la cantidad de muestra, del tiempo total de análisis y del consumo de disolventes y demás reactivos. Todo esto se llevó a cabo con el objetivo de avanzar hacia la optimización de metodologías de análisis lo más automatizadas posibles y que posibiliten el análisis continuado de gran número de muestras en el menor tiempo posible. A medida que aparecen nuevas tecnologías y éstas se vuelven más asequibles, se facilitan los estudios de monitoreo ambiental de contaminantes.

*4.2.2 Bioacumulación de PCPs en tejidos de *Mugil liza**

El primer caso de estudio (Publicación N° 8) se centra en el estudio de diferentes tejidos de lebrancho (*Mugil liza*) provenientes de la bahía de Guanabara, en el estado brasileño de Río de Janeiro. El estudio de individuos de dicha especie en esta región se de gran interés dado el estado ambiental de la Bahía y la importancia económica del pescado en cuestión.

La bahía de Guanabara es uno de los ecosistemas estuarinos más importantes de Brasil. El área comprende un total de 400 km² y en su cercanía inmediata se conglomeran una población de cerca de 11 millones de habitantes. Al igual de lo que ocurre al sur del país en la cuenca del río Iguazú, la bahía recibe un importante aporte de aguas residuales domésticas e industriales, en muchos casos sin ningún tipo de tratamiento. Se estima que solo el 50 % de los hogares de la región

tienen acceso a las infraestructuras de saneamiento, pero los datos oficiales no tienen en cuenta los asentamientos ilegales, por lo que la cifra real es mayor. Se estima que solo los asentamientos ilegales emiten un total de $18 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ de aguas residuales directamente a la bahía. La presencia de un vertedero localizado cerca de la playa de Ipiranga es considerado otro de los focos de contaminación de la región. Todo esto causa un importante impacto en forma de soporte de materia orgánica, metales pesados y contaminantes orgánicos. La región es, además, un centro de atracción turístico y sede de las regatas de Vela durante los Juegos Olímpicos de Río de Janeiro de 2016, por lo que el baño recreativo en las aguas próximas a la bahía es un factor importante a tener en cuenta.

La actividad pesquera en la bahía es uno de los motores económicos de la región y mantiene un importante bosque de manglares de 90 km^2 que sirve de refugio para la biodiversidad local, siendo algunas zonas de la bahía consideradas áreas de referencia medioambiental. La disminución de la contaminación que existe a medida que el intercambio de aguas con el Océano Atlántico incrementa hace de la playa de Itaipu una de estas áreas de referencia. La producción pesquera que se lleva a cabo en las aguas de esta playa abastece a una porción significativa de la población de la región, y la especie de mayor producción es *Mugil Liza*.

Los individuos de *Mugil liza* son endémicos de la costa atlántica del continente americano (desde la península de Florida hasta el estuario de Río de la Plata) y habitan generalmente en aguas poco profundas. Los huevos de esta especie se ponen en mar abierto y su dieta durante el estadio larval es plenamente planctófaga. Al crecer y pasar a su estadio juvenil, migran a aguas poco profundas y estuarinas, donde cambian su dieta a una detritívora. El ciclo se cierra cuando los individuos maduros migran nuevamente a mar abierto para la puesta.

Dada la importancia económica de esta especie y el hábitat contaminado en el que habita, se realizó el estudio para comprobar la presencia de PCPs, concretamente UV-Fs, en sus tejidos. Los 11 especímenes maduros estudiados fueron suministrados por pescadores de la región. Se tuvo en cuenta el origen de los mismos, con 4 especímenes provenientes de las aguas cercanas a la playa de Ipiranga, en el interior del estuario, y 7 de Itaipu, en la costa atlántica a la entrada de la bahía. Una vez en el laboratorio se separaron las agallas, el músculo y el hígado de los individuos para su análisis por separado. El estudio de los tejidos por separado buscaba estudiar la distribución de los UV-Fs en un mismo organismo, y ver dónde se acumulaban en mayor medida. También es importante mencionar que el consumo del hígado de *Mugil liza* está muy extendido y es muy valorado en la región.

La Figura 11 ilustra las concentraciones totales de UV-Fs determinadas en cada uno de los especímenes, teniendo en cuenta los tres tejidos conjuntamente. Se detectaron 8 UV-Fs (BP1, BP3, 4HB, 4DHB, EHMC, 4MBC, ODPABA y OC) en todos los individuos. Las concentraciones de UV-Fs totales oscilaron entre los 176 y los 631 ng g⁻¹ dw, de los cuales los compuestos más abundantes fueron los metabolitos de la BP3, 4HB y 4DHB. Las concentraciones de los metabolitos oscilaron entre los 40,1 y los 462 ng g⁻¹ dw dependiendo del individuo. BP3 se encontró en concentraciones superiores a las de BP1, pero no alcanzaron los niveles de los metabolitos.

La presencia de compuestos más lipofílicos quedó patente con concentraciones detectables de EHMC, 4MBC, ODPABA y OC. Las proporciones de estos compuestos variaron de individuo a individuo, pero mantuvieron el mismo orden de magnitud. De todos ellos, ODPABA fue el único que se determinó en todos los individuos, por debajo de los límites de cuantificación.

Teniendo en cuenta sus características morfológicas, no se observó una diferencia significativa entre los individuos de Ipiranga (380, 389, 392 y 399) y los de Itaipu. Como se ha comentado, el ciclo vital de esta especie incluye una migración desde el interior de la bahía a mar abierto para la puesta de los huevos, por lo que es esperable que la exposición a los contaminantes no sea significativamente diferente. De igual manera se ha de reconocer que la cantidad de individuos estudiados es baja, por lo que cualquier diferencia apreciable podría hacerse más evidente al aumentar el número de especímenes estudiados.

Este estudio supone la primera evidencia de contaminación por UV-Fs en el área de la bahía. Conociendo las fuentes de contaminación más comunes de la región y lo que se ha discutido en los Capítulos II y III es esperable que futuros estudios centrados en las aguas y en los sedimentos de la región presenten residuos de estos contaminantes. Adicionalmente, los resultados de este estudio constituyen una prueba más de la capacidad de bioacumulación de esta clase de compuestos por los organismos vivos.

La distribución de estos compuestos en los diferentes tejidos del organismo fue estudiada a continuación. La Figura 12 muestra la cantidad total de UV-Fs en cada uno de los tejidos. Se observó que la presencia de UV-Fs en el hígado era mayor que en el resto de tejidos analizados, con unas concentraciones medias de 182 ng g⁻¹ dw y una concentración máxima de 587 ng g⁻¹ dw. Los compuestos más abundantes en este tejido fueron 4HB y 4DHB. Esto tiene sentido dado que la mayor parte del metabolismo de los organismos suele llevarse a cabo en el tejido hepático. Estos compuestos, junto a la BP1, son metabolitos de fase I, concretamente, su mecanismo de

transformación consiste en la oxidación de la molécula. La presencia de BP1 y BP3 fue ubicua, con concentraciones inferiores a 74,4 ng g⁻¹ dw, mientras que los compuestos más lipofílicos se observaron a niveles de hasta 98,8 ng g⁻¹ dw.

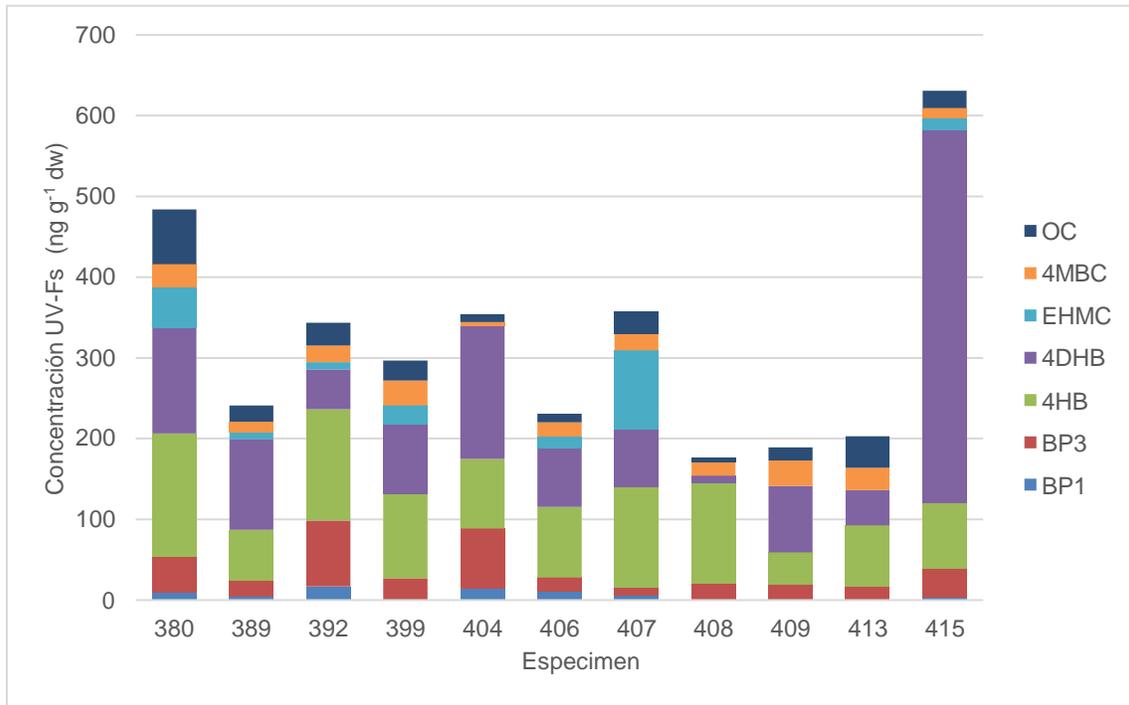


Figura 11. Concentración de UV-Fs en Mugil liza.

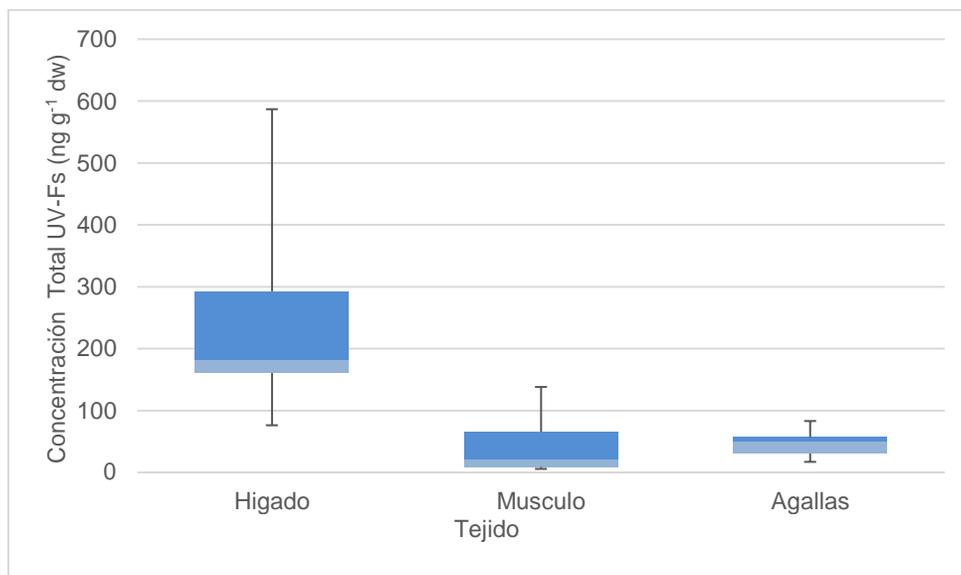


Figura 12. Concentraciones totales de UV-Fs en tejidos de Mugil liza.

Las concentraciones medias en músculo fueron las más bajas, con valores totales en el rango 3,1 – 138 ng g⁻¹ dw. La presencia de metabolitos en este tejido fue escasa, y sus bajas concentraciones se atribuyeron al transporte intraorgánico desde el hígado. BP1 y BP3 también fueron detectados a concentraciones inferiores a 15,4 ng g⁻¹ dw. Por otra parte, la presencia de 4MBC, EHMC, OC y ODPABA en el músculo presentó niveles medios superiores a los otros tejidos.

Las agallas o branquias son los órganos respiratorios de numerosos animales acuáticos. Al permanecer en contacto constante con el medio acuático, se considera una de las vías de entrada de contaminantes al organismo. Los resultados indicaron que las concentraciones medias de UV-Fs halladas en las branquias fueron superiores a las medidas en músculo. En este tejido se observaron concentraciones cuantificables de los metabolitos 4HB y 4DHB en el rango 3,3 – 31,6 ng g⁻¹ dw. Estos niveles son superiores a los determinados en el músculo, por lo que el transporte desde el hígado puede no explicar completamente su presencia. Es conocido que las agallas son capaces de llevar a cabo procesos metabólicos a menor escala que la que tiene lugar en el hígado, de forma que tal vez pudiera metabolizar los residuos de BP1 que le lleguen. La presencia de BP1 y BP3 fue determinada a niveles inferiores a 24 ng g⁻¹ dw, y los compuestos más lipofílicos se encontraron a niveles comprendidos entre 2,4 y 16, 8 ng g⁻¹ dw.

Se considera que la mayor parte de los contaminantes que un organismo metaboliza suelen ser excretados. En este caso se ha observado que la presencia de UV-Fs en los diferentes tejidos de *Mugil liza* indica que, pese a ello, una parte importante acaba acumulada en el organismo y distribuida de desigual manera entre los diferentes tejidos.

La exposición de los individuos de esta especie a los contaminantes podría seguir dos caminos. Por un lado, la exposición continua debida al contacto con aguas contaminadas provoca que parte de estos compuestos entren en el organismo a través de las agallas, donde parte de ellos sufren procesos metabólicos. Por otra parte, la dieta detritívora de esta especie hace que esté en contacto con el fondo estuarino, por lo que la ingesta de detritos y sedimentos ha de contribuir en mayor manera a la introducción de estos contaminantes. La presencia de compuestos lipofílicos en los diferentes tejidos y, como se ha discutido en el Capítulo II, su escasa presencia en aguas superficiales sugiere que éstos entran en el organismo principalmente a través de la dieta. La presencia de UV-Fs en la región no ha sido estudiada a día de hoy, pero estos resultados sugieren que deben estar presentes tanto en las aguas como en el sedimento de la bahía.

Hasta la fecha, solo se ha realizado un estudio referente a la posible bioacumulación de PCPs a través de la cadena trófica. En nuestro estudio previo [196] se determinaron concentraciones de OC en tejido hepático de delfín *Pontoporia blainvillei* en la costa de Brasil. En este caso los delfines de las zonas con una gran densidad poblacional registraron concentraciones superiores en hígado de delfin. Puesto que *Mugil liza* son presas de esta clase de delfín, la hipótesis de que ocurran procesos de biomagnificación no se puede descartar.

Como se ha mencionado, *Mugil liza* es una de las especies de importancia económica para la región de estudio, por lo que la población humana está expuesta a través de la alimentación a los UV-Fs. El consumo diario por cápita de productos del mar asciende a 25 g según el ministerio de pesca y agricultura de Brasil [197] por lo que la exposición media diaria es de 4,8 ng d⁻¹ kg⁻¹ bw considerando solo el músculo, y de 26,2 ng d⁻¹ kg⁻¹ bw si se considera el consumo de hígado. Dada la actividad disruptora endocrina de algunos de estos compuestos, la exposición a través de la dieta podría ser motivo de preocupación.

4.2.3 Bioacumulación de PCPs en huevos de aves

Por otra parte, se estudió la presencia de PCPs, concretamente UV-Fs, en huevos no eclosionados del Parque Nacional de Doñana. El área sirve de santuario para diversas especies salvajes de aves residentes y es un lugar de paso para las aves migratorias en su ruta Europa – África. La zona comprende un espacio de 1081 km², es un area de escasos núcleos urbanos y de baja densidad de población y corresponde a la desembocadura del río Guadalquivir. En un estudio previo realizado en nuestro grupo ya se observó que peces de dicho río contenían UV-Fs [94].

Las 39 muestras de huevos analizadas en este estudio provenían de 7 especies de aves salvajes pertenecientes a 4 órdenes y fueron recolectados entre 2010 y 2012.

La Figura 13 muestra las concentraciones medias de UV-Fs observadas por especie. El estudio reveló la presencia de UV-Fs en casi todas las muestras (95-100%). De los compuestos estudiados, 4DHB, ODPABA, OC y UVP se determinaron concentraciones inferiores a los respectivos límites de cuantificación del método en la mayor parte de las muestras. BP3 se encontró en concentraciones comprendidas entre 16,87 y 49,28 ng g⁻¹ dw, mientras que 4HB se observó a concentraciones elevadas en todas las muestras, alcanzando un valor máximo de 3.487,74 ng g⁻¹ dw. Bajo la misma premisa que en la sección anterior, el origen más probable de la presencia y concentración de 4HB y 4DHB es metabólico. Puesto que los procesos metabólicos no ocurren en los huevos sin vida viable, éstos deben provenir íntegramente de la madre. BP1

fue encontrado en concentraciones elevadas en la mayor parte de las muestras y se considera que su prevalencia sobre los niveles de BP3 puede estar relacionada con aportes debidos a la metabolización de BP3. Los compuestos más lipofílicos (OC y UVP) fueron determinados en todas las muestras a concentraciones de unos pocos $\text{ng g}^{-1} \text{dw}$.

Los UV-Fs derivados del benzotriazol se usan ampliamente en la producción de materiales para su protección de la radiación UV del sol. Las concentraciones de UVP en plásticos y pinturas pueden variar, pero está alrededor del 0,3 % del total del producto. Su limitado uso puede explicar sus bajos niveles encontrados. Así mismo, este compuesto es fotoestable y poco degradable. Por otra parte, como se ha explicado en el Capítulo III, la eliminación de los UV-Fs en las EDARs es incompleta, por lo que las aguas residuales provenientes de las zonas colindantes son consideradas como el foco principal de contaminación.

Estos resultados constituyen la primera determinación mundial de contaminación por UV-Fs de huevos de aves y, por tanto, los primeros resultados referentes al interior de una zona natural protegida como es el Parque Nacional de Doñana. Los niveles de UV-Fs determinados son entre uno y dos órdenes de magnitud superiores a los de otros contaminantes orgánicos como los retardantes de llama y los policlorobifenilos [198] también estudiados en esas muestras. La distribución de UV-Fs y de dicloranos [199] entre las diferentes especies se ha observado que siguen un patrón similar.

La contaminación en los huevos es reflejo del ciclo vital de la madre. Es de esperar que, a mayor cantidad de lípidos, mayor sea la presencia de contaminantes lipofílicos, independientemente de la especie estudiada. Bajo esta premisa se investigaron los patrones de bioacumulación de los contaminantes entre las distintas especies.

Se observaron diferencias respecto a la bioacumulación de BP1, BP3 y 4HB entre las muestras estudiadas. Un primer grupo presentaba el patrón de concentraciones $4\text{HB} > \text{BP1} > \text{BP3}$, correspondiente a las especies *Falco tinnunculus*, *Circus aeruginosus*, *Anas straperas* y *Gelachelion nilotica*. Un segundo grupo ($4\text{HB} > \text{BP3}$, $\text{BP1} < \text{LOQ}$) por las especies *Ciconia ciconia* y *Chrococephalus genei*, y un tercer grupo con $\text{BP1} > 4\text{HB} > \text{BP3}$ representados por la especie *Chrococephalus ridibundus*. Los diferentes patrones de bioacumulación y metabolización pueden estar relacionados por la afinidad de los ligandos a las enzimas y la cinética de metabolización, tal como se ha descrito para los policlorobifenilos [200]. Por su parte, el OC solo fue detectado en el primer y segundo grupos, mientras que el UVP solo lo fue en el segundo.

Estos resultados parecen indicar que los falconiformes y anseriformes deben seguir patrones metabólicos similares, mientras que los ciconiiformes poseen uno distinto. El grupo de los charadriiformes, la especie *Chrococephalus ridibundus* no comparte el mismo grupo de distribución que las otras dos. Esto puede implicar que los hábitos alimenticios suponen la principal fuente de variabilidad en este grupo, las tres especies que la conforman, la especie *Chrococephalus ridibundus* no se alimenta de pescado y suple su dieta con desechos de origen antropogénico (vertederos).

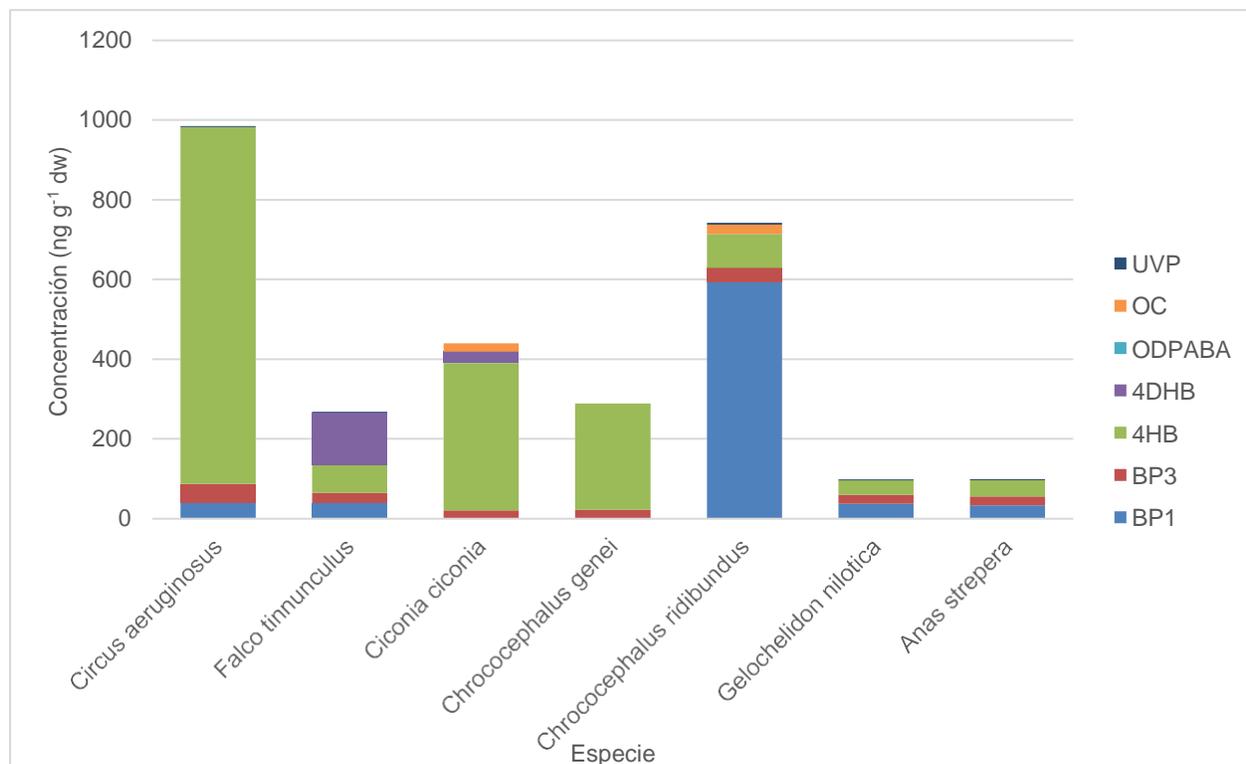


Figura 13. Concentraciones medias de UV-Fs en huevos de distintas especies de aves.

Si se tiene en cuenta su patrón migratorio, las especies del primer grupo son principalmente especies residentes en el Parque durante todo el año, mientras que las especies del segundo y tercer grupo presentan algún grado de comportamiento migracional. Esto sugiere la existencia de una relación entre el comportamiento migratorio de las especies y la bioacumulación de los contaminantes de origen antropogénico en su organismo.

Los procesos metabólicos involucrados en la transformación de los PCPs son aún desconocidos. Si se comportan como otros compuestos orgánicos lipofílicos, su absorción debe ocurrir en el intestino delgado siguiendo el mismo mecanismo de absorción de los lípidos. A partir de ahí, la mayor parte del metabolismo podría llevarse a cabo en el hígado, tal como se ha discutido en la sección anterior, y los metabolitos formados serían excretados o distribuidos en los diferentes

tejidos, donde acabarían retenidos en mayor o menor grado. En este caso, la distribución de los contaminantes no dependería de su Log K_{ow} . En cualquier caso, la metabolización y acumulación de los contaminantes por parte de las aves puede favorecer su posterior transferencia a los huevos y, por ende, a las crías.

La presencia de estos contaminantes en los huevos implica que los depredadores pueden estar expuestos a través de la dieta (presas contaminadas). Las especies estudiadas en la Publicación Nº 9 pertenecen a distintos eslabones de la cadena trófica, pero no son lo suficientemente distintas como para poder asegurar que no ocurren procesos de biomagnificación, por lo que estudios futuros deberían centrarse en investigar este fenómeno.

4.2.4 Presencia de PCPs en matrices humanas

Una vez estudiada la presencia de PCPs en muestras de biota, es evidente que el impacto de estas sustancias alcanza la totalidad del ecosistema, a diferentes niveles tróficos y en ambientes muy diferentes. Los seres humanos no solo se exponen a través de la dieta, como hemos discutido en la sección 4.2.2, sino que el uso que le damos a determinados productos en el día a día es la vía principal de exposición.

Como ya se ha discutido en el Capítulo I, una fracción importante de los PCPs puede ser absorbida percutáneamente tras su aplicación sobre la piel. La presencia de PCPs ha sido anteriormente reportada en matrices humanas a niveles de ng ml^{-1} y $\text{ng g}^{-1} \text{dw}$ (Tabla 1).

El análisis de muestras de origen humano presenta una problemática adicional a las muestras provenientes del medio ambiente. Los estudios asociados con matrices humanas conllevan una percepción negativa puesto que la ética tras las investigaciones de este tipo está siempre en entredicho. Se ha de asegurar que las muestras sean tomadas con consentimiento expreso de voluntarios y con carácter anónimo, y han de ser lo menos intrusivas posible. Bajo estas premisas, conseguir muestras mediante biopsias puede ser complicado, por lo que el análisis de contaminantes suele centrarse en matrices de más fácil acceso y, por supuesto, que no suponga daños al voluntario. Para los estudios incluidos en esta sección se seleccionaron dos matrices obtenidas con consentimiento, de forma no-agresiva, de fácil acceso, y siguiendo las normas éticas del Banco de Leche Materna y del Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona: leche materna y placenta humanas.

La Publicación Nº 10 se centra en el estudio de la presencia de PCPs en leche materna de madres de Cataluña. La obtención de la leche materna se logró a través de la colaboración del *Banc de*

Llet del Banc de Sang i Teixits de Catalunya. La continua producción de leche durante los meses que siguen al parto permite conocer la transferencia de contaminantes a través de la dieta durante los primeros meses de vida del neonato. Así mismo, las propiedades físicoquímicas de la leche materna varían con el tiempo de lactancia, por lo que permite conocer si la transferencia de contaminantes está relacionada con las proporciones de macronutrientes.

A las madres voluntarias se les dio un formulario para cumplimentar con información referida a sus hábitos diarios, consumo de cafeína, medicamentos y otra información relevante referente a la gestación y al periodo de lactancia del bebé.

Se analizaron un total de 79 muestras de leche, de las cuales 28 (38 %) dieron positivo en UV-Fs. Las cocentraciones de UV-Fs alcanzaron valores máximos de 799.9 ng g⁻¹ leche. BP3 se encontró en un 23% de las muestras a concentraciones medias cercanas a los 145 ng g⁻¹ leche. Los metabolitos 4HB y 4DHB fueron detectados alrededor del 10% de las muestras a concentraciones inferiores a 43 ng g⁻¹ leche. Su origen, como se ha comentado anteriormente, es principalmente metabólico. El metabolismo de estos compuestos en los tejidos humanos es desconocido, por lo que se podría suponer que, al igual que ocurría en las muestras de *Mugil liza* (aunque el metabolismo en las branquias también pudiera contribuir en menor medida), estos compuestos han sido transportados desde el hígado.

Por su parte, 4MBC fue determinado en concentraciones inferiores a 11 ng g⁻¹ leche. Estudios anteriores han demostrado que el tiempo de vida media de este compuesto en el organismo antes de ser excretado o transformado es de 20 h tras su aplicación sobre la piel [201]. Ello sugiere que su presencia en muestras de leche estaría principalmente relacionada en el uso continuo de productos de higiene y cuidado personal por parte de la madre.

En las muestras se detectaron tres UV-Fs derivados del benzotriazol (TBHPBT, UV320 y UV329) alcanzando concentraciones máximas de 524 ng g⁻¹ leche. Estos compuestos se utilizan mayoritariamente en la protección de envoltorios y envases. Es conocido que, bajo ciertas condiciones de temperatura y contacto prolongado, estos compuestos pueden lixiviar desde el envoltorio al contenido [202].

Las concentraciones halladas son del mismo orden o de un orden de magnitud superior a aquellas reportadas en la bibliografía, tal como se muestra en la Tabla 2. Esto puede ser explicado por diferencias en los hábitos entre las madres de los diferentes estudios. Las muestras aquí discutidas fueron obtenidas durante el final del verano y el inicio del otoño, y es sabido que el uso de productos con protección solar, se incrementan durante el periodo estival. No obstante, puesto

que en los formularios que entregaron a las madres no se les pedía información sobre el uso de productos de higiene y cuidado personal, no se puede relacionar la utilización de éstos con las concentraciones determinadas.

Respecto al BP3, se observó que las muestras se agrupaban en 3 grupos en función de sus niveles de concentración media; un grupo presentó concentración media inferior a 2,8 ng g⁻¹ leche, un grupo de concentración media de 54 ng g⁻¹ leche y otro de concentración media superior a 100 ng g⁻¹ leche. Al comparar los resultados obtenidos con la información ofrecida por las madres, no se observó ninguna correlación. La correlación de las concentraciones individuales con parámetros como la edad de la madre, el periodo de lactancia y la cantidad de lípidos y otros macronutrientes no ofreció ninguna correlación significativa. Por otra parte, las concentraciones de BP3 y de 4DHB mostraron correlación ($\rho=0.650$), reforzando la idea del origen metabólico del 4DHB. En el estudio previo realizado por Schlumpf et al. [116] las correlaciones, entre las mismas variables que nosotros consideramos, mostraron resultados similares, sugiriendo que el uso de esos productos era el único factor correlacionado con la presencia en el organismo.

Se calculó la transferencia de UV-Fs de la madre al neonato a través de la lactancia, y se determinó que ésta era de media de 69 $\mu\text{g d}^{-1} \text{kg}^{-1} \text{bw}$. El valor medio sigue siendo bajo, pero aún así, dado que no se conocen los mecanismos de acción de estos compuestos en el organismo humano no se pueden descartar efectos adversos en el desarrollo del bebé. Concentraciones muy bajas de una sustancia pueden causar importantes efectos adversos si su nivel de actividad hormonal es muy elevado, como puede ser el caso del bisfenol A.

Tal como se describe en la Publicación N° 10, se analizó el plástico del envase de la leche facilitado a las madres con el fin de apoyar la hipótesis del lixiviado de algunos compuestos. Su estudio reveló la presencia de 6 UV-Fs a altas concentraciones. De todos ellos, BP3 presentó concentraciones medias elevadas de 2786 ng g⁻¹. Por otra parte, también se detectaron concentraciones variables de 4DHB, en el rango 300 – 10.587 ng g⁻¹. La elevada concentración de este metabolito puede estar relacionada con su uso como precursor de ciertos procesos de polimerización [203]. No obstante, no se detectaron concentraciones de derivados del benzotriazol. A la luz de estos resultados, la transferencia de contaminantes del plástico a la leche materna no puede descartarse, y estudios futuros deberían centrarse en investigar en profundidad esta hipótesis.

Por su parte, la placenta ofrece posibilidades para biomonitorrear disruptores endocrinos en el periodo anterior al nacimiento del bebé, dado que es un órgano que permite el transporte de

sustancias entre la madre y el feto. Puesto que la obtención de la placenta no es se hace de forma intrusiva dada su eliminación tras el parto, su análisis no conlleva problemas éticos.

En la Publicación N° 11 se determinó la presencia de conservantes y UV-Fs en 12 muestras de placenta de madres voluntarias que cumplían los requisitos de salud y hábitos de los estudios marcados por el hospital. La Figura 14 muestra las concentraciones de PCPs halladas en este estudio.

De media al menos 4 PCPs fueron detectados en todas las muestras. En el caso de las benzofenonas, BP1, BP3 y 4HB fueron detectados en algunas muestras y normalmente a concentraciones no cuantificables. De ellos, la presencia de BP1 fue constante en todas las muestras. La BP2 sólo se cuantificó en una muestra, mientras que la BP4, con un 75 % de presencia, fue cuantificable en más de la mitad de las muestras a concentraciones comprendidas entre 0,25 y 5,45 ng g⁻¹ ww.

Normalmente, la existencia de estos compuestos en el organismo está relacionada con su aplicación sobre la piel. De todos ellos, BP4 es el compuesto menos lipofílico, por lo que se considera que sus características fisicoquímicas favorecen su presencia en tejidos de bajo contenido graso como lo es la placenta humana. No obstante, hasta la fecha no ha habido evidencias de la acumulación de este compuesto en un tejido similar, lo que convirtió este trabajo en el primer estudio en detectarlo. De entre las benzofenonas estudiadas es la de carácter más ácido (pKa < 1) y la más hidrofílica. Debido a ello, su metabolización puede verse afectada por su acidez, lo que explicaría la bioacumulación de BP4 a concentraciones más elevadas. Su uso a nivel global está en aumento, por lo que se espera que las concentraciones de este compuesto en todos los compartimentos ambientales presenten un incremento en el futuro. Todo ello indica que sería de interés profundizar en el estudio de la BP4.

Estos resultados son similares a los obtenidos para los PCPs en otras matrices humanas, tal y como se muestra en la Tabla 2.

En el caso de los conservantes, la detección de parabenos fue más frecuente. Tres conservantes, MePB, BuPB y BzPB, fueron detectados en todas las muestras estudiadas, mientras que EtPB y PrPB lo fueron en un 80%. Las concentraciones determinadas oscilaron entre 0,02 y 11,77 ng g⁻¹ ww, siendo el MePB el más abundante de los conservantes estudiados. El uso preferente de este conservante frente al resto de derivados del parabeno, explicaría su mayor y más frecuente concentración en la placenta. Esta misma prevalencia ya fue observada y discutida cuando analizamos los parabenos en aguas residuales (Publicación N° 5).

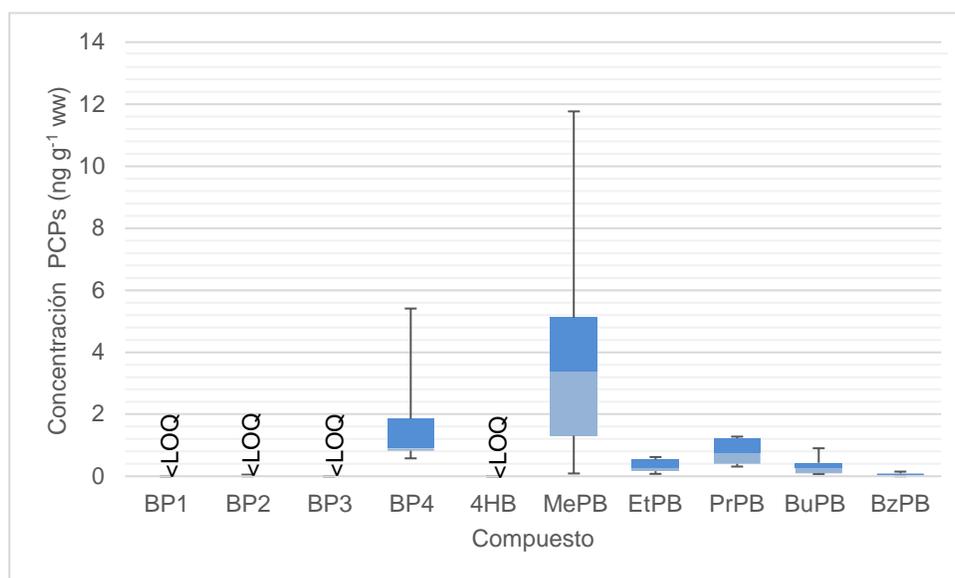


Figura 14. Concentraciones de PCPs en placenta humana.

El uso de parabenos en la industria alimentaria, además de en toda clase de productos de uso diario perecederos, hace que su entrada a través de la dieta sea más significativa que de forma percutánea. Otras de las posibles causas de la acumulación de parabenos en los tejidos pueden estar relacionadas con su metabolismo. En el estudio aquí presentado no se investigó la presencia de metabolitos de los parabenos por lo que no se pueden aportar datos sobre ello. A la luz de los resultados sería interesante que estudios futuros se centren en los procesos metabólicos relacionados con los parabenos. BzPB no había sido estudiado anteriormente en placenta humana, por lo que este estudio aportó la primera evidencia mundial de la presencia de este compuesto en placenta humana.

Complementando al estudio de la leche materna, este trabajo en placenta se añade a aquellos previos que muestran que la transferencia de contaminantes de la madre al feto ocurre antes del parto, en el período de desarrollo fetal, uno de los períodos, junto con el de la adolescencia de mayor crecimiento. Los niveles encontrados de PCPs son bajos, pero la ausencia de estudios sobre la actividad hormonal de estos contaminantes en seres humanos no permite indicar si tales concentraciones son suficientes o no para causar efectos negativos, como por ejemplo, disrupción endocrina.

4.3 Conclusiones

En este capítulo se han descrito las metodologías para el análisis de muestras biológicas. Se ha discutido su novedad, aplicabilidad, su sensibilidad y selectividad. Estas metodologías analíticas han sido aplicadas a muestras de distinta índole y origen con el fin de determinar la acumulación de PCPs en organismos vivos.

En el primero de los estudios descritos se han reportado por primera vez concentraciones de UV-Fs en muestras de *Mugil liza* de la bahía de Guanabara en Brasil. Dada la importancia económica de esta especie para la zona, su análisis permite hacerse una idea del estado del ecosistema de la bahía. Se determinó que en los tejidos de esta especie se bioacumulan UV-Fs de diversas lipofilicidades y que su distribución en los diferentes tejidos del pez es desigual.

La presencia de metabolitos en el hígado en grandes cantidades respecto al músculo y las branquias demuestra que la gran parte del metabolismo de estos compuestos se lleva a cabo allí, desde donde serían transportados a los diferentes tejidos del pez. La presencia de UV-Fs en las agallas sugiere que éstas son uno de las vías de entrada de estos compuestos y que parte de las benzofenonas pueden ser metabolizadas allí mismo. Esta especie es detritívora, por lo que se sospecha que la ingestión de sedimentos contaminados puede ser una de las principales fuentes de exposición.

Esta especie de pez es ingerida por predadores y consumida y apreciada por los humanos, por lo que constituye una de las vías de entrada de los UV-Fs a la cadena trófica.

El segundo estudio analizó la presencia de UV-Fs en huevos de diferentes especies de aves salvajes de una zona natural protegida. Los resultados demostraron que las aves están expuestas a estos contaminantes y que transmiten parte de la carga contaminante a la siguiente generación durante la puesta. Nuevamente, la presencia de metabolitos en los huevos analizados fue ubicua, demostrando la acumulación y no excreción o excreción parcial de éstos. Se sospecha que el origen de estos compuestos proviene de los núcleos urbanos cercanos y que la contaminación de las aguas debe afectar a las especies de nivel trófico inferior, base de la dieta de las distintas aves. Esto sugiere la existencia de procesos de transferencia de contaminantes a través de la cadena trófica.

Los resultados alcanzados en los dos estudios no permiten asegurar que existan procesos de biomagnificación a través de la cadena trófica, pero sugieren que podría ser así. Según los

estudios tanto el *Mugil liza* como de los huevos de las aves pueden ser buenos bioindicadores de la contaminación medioambiental.

La exposición de los seres humanos a los PCPs es continua y es conocido que éstos son capaces de ser absorbidos percutáneamente. No obstante, los resultados obtenidos en los estudios realizados muestran que una parte de la exposición también se puede atribuir a la dieta. El estudio de la placenta y la leche materna humana ha demostrado que estos compuestos se acumulan también en seres humanos. Al igual que en el caso de peces y aves, se ha observado la presencia de metabolitos en ambas matrices.

La presencia de estos contaminantes en la placenta sugiere que la transferencia y exposición a los PCPs empieza antes del parto, y que ésta continúa durante el periodo de lactancia del bebé. Las concentraciones a las que feto, bebé y adulto se encuentran expuestos son bajas, pero la cantidad de estudios referentes a los posibles efectos adversos que estos compuestos pueden causar sobre la salud es aún muy escasa.

Capítulo V

Conclusiones globales

5.1 Conclusiones

Lo 11 estudios realizados en la Tesis Doctoral e incluidos en la presente Memoria, nos permiten exponer las siguientes conclusiones:

- Ha sido necesario el desarrollo de diversas metodologías de análisis de PCPs a nivel traza basadas en HPLC-MS/MS en muestras de diferente naturaleza. Para el análisis de muestras de aguase optó por el análisis en línea, que permitía realizar el pretratamiento de la muestra y el análisis de la misma de forma continua. En el caso de las muestras de sedimento y biota, ha sido necesaria la aplicación de un pretratamiento más exhaustivo y se tuvo que desarrollar métodos que requerían de PLE y SPE previos al análisis mediante HPLC-MS/MS. Para el análisis de muestras de leche humana, dada la mayor complejidad de la matrix en comparación con el agua, también se desarrolló un método on-line, pero en esta ocasión basado en cromatografía de flujo turbulento y posterior HPLC-MS/MS. En todos los casos, las metodologías analíticas han sido sensibles, selectivas, rápidas y han perseguido obtener la máxima eficacia y robustez, priorizando una mayor automatización, un menor consumo de muestra y disolventes, y una mejora de los límites de detección y de cuantificación respecto a las metodologías descritas previamente en la bibliografía.
- El estudio de las aguas superficiales de diversas cuencas europeas ha permitido documentar la ubicuidad de los compuestos estudiados independientemente de las actividades económicas que se llevan a cabo a lo largo de sus cursos. Los biocidas BZT y MeBZT han presentado los mayores niveles de concentración, seguidos por los repelentes de insectos DEET y Bayrepel (concentraciones máximas en el rango de los $\mu\text{g l}^{-1}$). Los filtros solares se han encontrado, generalmente, en el rango de los ng l^{-1} , correspondiendo las concentraciones más elevadas a BP3, ODPABA y EtPABA. Se ha demostrado que la existencia de núcleos urbanos cercanos, las EDARs ubicadas en la cuenca, el caudal del río y las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos son factores determinantes en la aparición de concentraciones elevadas de éstos y de su diseminación en el medio ambiente.
- En sedimentos y material particulado en suspensión, el biocida BZT, y los filtros solares OC y EHMC resultaron ser los compuestos que alcanzaron las concentraciones más elevadas, pudiendo ser éstas entre uno y dos órdenes de magnitud superiores a las de los otros compuestos estudiados. La abundancia en el medio, el pKa y las características lipofílicas de algunos de ellos favorece su adsorción sobre el componente orgánico del

sedimento y del particulado en suspensión. En todos los casos, las concentraciones más elevadas correlacionaron con la presencia de núcleos urbanos próximos y el vertido de aguas residuales (tratadas y no tratadas).

- El estudio de las aguas residuales ha permitido caracterizar la eliminación de los PCPs en las EDARs. Los biocidas BZT y MeBZT, el filtro solar BP4, y los conservantes MePB y PrPB resultaron ser los de mayor concentración en el influente (máx. $47 \mu\text{g l}^{-1}$). Por otra parte, BZT, MeBZT y BP4 presentaron los niveles más altos en el efluente (máx. $17 \mu\text{g l}^{-1}$). Esto se corresponde con unas ratios de eliminación variables: mientras que los conservantes son eliminados prácticamente en su totalidad, los UV-Fs y los biocidas presentan eliminaciones variables (del 4 al 95%). Los mejores resultados se obtuvieron para los compuestos más lipofílicos, indicando que esta propiedad es uno de los factores determinantes para la eliminación de los PCPs en los tratamientos convencionales de las EDARs. Esto se traduce en unas emisiones al medio de PCPs a través del efluente que oscilan entre $< 1 \text{ mg año}^{-1} \text{ hab}^{-1}$ hasta cerca de $200 \text{ mg año}^{-1} \text{ hab}^{-1}$.
- El desarrollo de nuevos tratamientos de los lodos de EDAR ha permitido determinar la eficacia del hongo *Trametes versicolor* para la eliminación de UV-Fs. La aplicación de este hongo sobre lodos no estériles y sin sustrato previo permitió la eliminación de UV-Fs con ratios cercanos al 80%.
- Respecto a los efectos toxicológicos, los ensayos realizados han revelado que, generalmente, las EC_{50} de estos compuestos para micro crustáceos, algas verdes y bacterias se encuentran en el orden de los mg l^{-1} . Tanto BZT como MeBZT presentaron la menor toxicidad en los organismos seleccionados, mientras que ODPABA resultó ser el más tóxico para las algas verdes. Los resultados indicaron que la toxicidad correlaciona con la lipofilicidad del compuesto. Las mezclas binarias de PCPs y de PCP-nanomaterial presentaron menor toxicidad en microcrustáceos que la que muestran en solitario. Por otra parte, las mezclas de nano-Ag con BP1 y EtPABA y TiO_2 con BP3 y BzPB resultaron ser más tóxicas, posiblemente por la acción de los cationes metálicos que facilitan la entrada de los PCPs orgánicos al interior de la célula.
- En la mayor parte de los casos, las concentraciones de PCPs determinadas no suponían un riesgo ni en aguas superficiales ni en aguas subterráneas ($\text{HQ} < 0,5$). En aguas superficiales, BZT, MeBZT y DEET sí que comportaron un cierto riesgo, entre moderado ($0,5 < \text{HQ} < 1$) y alto ($\text{HQ} > 1$) en las zonas con gran densidad poblacional y en las proximidades de las EDARs. En aguas residuales, únicamente en algunos de los efluentes estudiados las concentraciones de BZT y MeBZT comportaban riesgo para el medio ambiente receptor.

- La presencia de PCPs también ha sido demostrada en biota, concretamente en diferentes tejidos de la especie *Mugil liza* y en los huevos de diversas especies de aves. En pez, las concentraciones de PCPs alcanzaron niveles elevados, $> 600 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$, observándose las mayores concentraciones en el hígado. No obstante, la presencia de PCPs se ha determinado también en el músculo y las agallas. La presencia de los dos metabolitos hidroxilados de la BP3, 4HB y 4DHB, indica que éstos se generan en el hígado, y de ahí una parte se excreta y otra se distribuye y acumula en los otros tejidos. Esta especie de pez es muy apreciada en la región de la bahía de Guanabara, por lo que la población se encuentra expuesta a concentraciones de entre 4,8 y 26,2 $\text{ng d}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ a través de la dieta.
- En los huevos de las aves del Parque Nacional de Doñana, se encuentran concentraciones significativas de BP3 y de sus dos metabolitos hidroxilados, 4HB y 4DHB, alcanzando concentraciones máximas de 3,5 $\mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$ correspondiente a 4HB. La presencia de estos compuestos en los huevos indica que existe transferencia materna y que su presencia en huevos de especies de aves que se alimentan de huevos sugiere la transferencia de contaminantes a través de la cadena trófica.
- La transferencia de PCPs de la madre al neonato comienza antes del parto, como indican las concentraciones de UV-Fs (principalmente BP4) y de conservantes (parabenos) determinadas en muestras de placenta humana. Esta transferencia continúa durante el periodo de lactancia, como constata la presencia de PCPs en leche materna. Los compuestos más comunes en la leche materna fueron BP3, los metabolitos 4HB y 4DHB, y los benzotriazoles UV320 y UV329, alcanzando valores máximos de hasta 800 ng ml^{-1} de leche.

Las grandes aglomeraciones urbanas y una eliminación incompleta de estos compuestos suponen la principal vía de entrada de los PCPs al medio ambiente. La presencia de estos compuestos en los compartimentos ambientales estudiados indica que constituyen un factor de riesgo, puesto que muchos de ellos son disruptores endocrinos y los efectos de la exposición constante a largo plazo para el ecosistema y la salud humana son todavía desconocidos.

Los datos aportados en esta Tesis constituyen la primera evidencia de la presencia de ciertos PCPs en sedimentos y peces de Sudamérica, en las cuencas de ríos europeos, en huevos de aves y en placenta humana. Toda ello, junto a la información existente en la bibliografía demuestra que la contaminación por PCPs es de extensión global, y, de seguir igual, es un problema que se agravará.

Sabiendo todo esto, el desarrollo de nuevas técnicas de eliminación enfocadas a los PCPs es necesario y ello ha de estar acompañado de cambios en la legislación. Pese a su baja toxicidad, las concentraciones de BZT y MeBZT en el ecosistema acuático acrecientan su potencial tóxico, por lo que se recomienda su inclusión en la “*watch list*” de la WFD. Por otra parte, la BP3 y la BP4 presentan ubicuidad, eliminación variable y potencial de disrupción endocrina, por lo que su inclusión también sería recomendable. Así mismo, la realización de nuevos estudios sobre los posibles efectos adversos de los PCPs será determinante para la inclusión de éstos en programas futuros de monitoreo y para conseguir cambios legislativos.

Referencias

- [1] J. Melak, «Freshwater ecosystems: revitalizing educational programs in limnology, » *Eos, Transactions American Geophysical Union*, vol. 48, nº 78, pp. 552-557, 1997.
- [2] A. Bennet, «Environmental consequences of increasing production: some current perspectives, » *Agriculture, Ecosystems & Environment*, vol. 82, nº 1, pp. 89-95, 2000.
- [3] T. Sato, M. Qadir, S. Yamamoto, T. Endo y A. Zahoor, «Global, regional, and country level need for data on wastewater generation, treatment, and use. *Agricultural Water Management*, » *Agricultural Water Management*, vol. 130, pp. 1-30, 2013.
- [4] G. Heilig, «World urbanization prospects, the 2011 revision, » United Nations, vol. 505.
- [5] Z. Bandbridge, J. Faithful, D. Sydes y S. Lewis, «identifying the land-based sources of suspended sediments, nutrients and pesticides discharged to the Great Barrier Reef from the Tully–Murray Basin, Queensland, Australia., » *Marine and Freshwater Research*, vol. 60, nº 11, pp. 1081-1090, 2009.
- [6] C. Wanf, H. Wang, S. He, J. Du y Z. Sun, «Sources and distribution of aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in Yellow River Delta Nature Reserve, China, » *Applied Geochemistry*, vol. 26, nº 8, pp. 1330-1336, 2011.
- [7] E. Edinger, J. Jompa, G. Limmon, W. Widjatmoko y M. Risk, «Reef degradation and coral biodiversity in Indonesia: effects of land-based pollution, destructive fishing practices and changes over time., » *Marine Pollution Bulletin*, vol. 36, nº 8, pp. 617-630, 1998.
- [8] E. de Andrade, H. Palácio, I. Souza, R. de Oliveira Leão y M. Guerreiro, «Land use effects in groundwater composition of an alluvial aquifer (Trussu River, Brazil) by multivariate techniques., » *Environmental Research*, vol. 106, nº 2, pp. 170-177, 2008.
- [9] C. Sindermann, «Ocean pollution: effects on living resources and humans». CRC Press, 1995.
- [10] F. Essl, D. Moser, T. Dirnböck, S. Dullinger, N. Milasowszky, M. Winter y W. Rabitsch, «Native, alien, endemic, threatened, and extinct species diversity in European countries, » *Biological Conservation*, vol. 164, pp. 90-97, 2013.
- [11] K. Kleinow, M. Goodrich, L. Cockerham y B. Shane, «Environmental aquatic toxicology., » *Basic Environmental Toxicology*, pp. 353-384, 1994.
- [12] N. Bolong, A. Ismail, M. R. Salim y T. Matsuura, «A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal., » *Desalination*, vol. 239, nº 1, pp. 229-246, 2009.
- [13] V. Lazarova y A. Bahri, *Water reuse for irrigation: agriculture, landscapes, and turf grass*, C. Press, Ed., 2004.
- [14] T. Asano, *Water reuse: issues, technologies, and applications.*, M. Professional, Ed., 2007.

-
- [15] M. Klavarioti, D. Mantzavinos y D. Kassinos, «Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes., » *Environment international*, vol. 35, nº 2, pp. 402-417, 2009.
- [16] M. Qadir, D. Wichelns, L. Raschid-Sally, P. S. Minhas, P. Drechsel, A. Bahri, P. McCornick, R. Abaidoo, F. Attia, S. El-Guindy, J. Ensink, B. Jimenez, J. Kijne, S. Koo-Oshima, J. Oster, L. Oyebande, J. Sagardoy y W. van der Hoek, «Agricultural use of marginal-quality water: opportunities and challenges., » de *Water for food, water for life: a Comprehensive Assessment of Water Management in Agriculture.*, M. D, Ed., London, Sri Lanka: International Water Management Institute (IWMI), 2007, pp. 425-457.
- [17] L. Raschid-Sally y P. Jayakodz, «Drivers and characteristics of wastewater agriculture in developing countries: results from a global assessment, » vol. 127, Colombo, IWMI, 2009.
- [18] S. Manzoor, M. Shah, N. Shaheen, A. Khalique y M. Jaffar, «Multivariate analysis of trace metals in textile effluents in relation to soil and groundwater., » *Journal of Hazardous Materials*, vol. 137, nº 1, pp. 31-37, 2006.
- [19] A. Papaioannou, E. Dovriki, N. Rigas, P. Plageras, I. Rigas, M. Kokkora y P. Papastergiou, «Assessment and modelling of groundwater quality data by environmetric methods in the context of public health., » *Water Resources Management*, vol. 24, nº 12, pp. 3257-3278, 2010.
- [20] J. Ellis y G. Mitchell, «Urban diffuse pollution: key data information approaches for the Water Framework Directive., » *Water and Environment Journal*, vol. 20, nº 1, pp. 19-26, 2006.
- [21] L. Brown, T. Cuffney, J. Coles, F. Fitzpatrick, G. McMahon, J. Steuer, A. Bell y J. May, «Urban streams across the USA: lessons learned from studies in 9 metropolitan areas., » *Journal of the North American Benthological Society*, vol. 28, nº 4, pp. 1051-1069, 2009.
- [22] T. Carter, C. Jackson, A. Rosemond, C. Pringle, D. Radcliffe, W. Tollner, J. Maerz, D. Leigh y A. Trice, «Beyond the urban gradient: barriers and opportunities for timely studies of urbanization effects on aquatic ecosystem., » *Journal of the North American Benthological Society*, vol. 28, nº 4, pp. 1038-1050, 2009.
- [23] C. Walsh, T. Fletcher y A. Ladson, «Retention capacity: a metric to link stream ecology and storm-water management., » *Journal of Hydrologic Engineering*, vol. 14, nº 4, pp. 399-406, 2009.
- [24] B. Moss, «Water pollution by agriculture., » *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, vol. 363, nº 1491, pp. 659-666, 2008.
- [25] S. Carpenter, N. Caraco, D. Correll, R. Howarth, A. Sharpley y V. Smith, «Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen., » *Ecological Applications*, vol. 8, nº 3, pp. 559-568, 1998.
- [26] L. Ritter, K. Solomon, P. Sibley, K. Hall, P. Keen, G. Mattu y B. Linton, «Sources, pathways, and relative risks of contaminants in surface water and groundwater: a perspective prepared for the Walkerton inquiry, » *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, vol. 65, nº 1, pp. 1-142, 2002.
-

-
- [27] K. Booij, E. Achterberg y B. Sundby, «Release rates of chlorinated hydrocarbons from contaminated sediments, » *Netherlands Journal of Sea Research*, vol. 29, nº 4, pp. 297-310, 1992.
- [28] A. Zenker, M. Cicero, F. Prestinaci, P. Bottoni y M. Carere, «Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment, » *Journal of Environmental Management*, vol. 133, pp. 378-387, 2014.
- [29] P. Staehr, J. Testa, W. Kemp, J. Cole, K. Sand-Jensen y S. Smith, «The metabolism of aquatic ecosystems: history, applications, and future challenges., » *Aquatic Sciences*, vol. 74, nº 1, pp. 15-29, 2012.
- [30] R. Van der Oost, J. Beter y N. Vermeulen, « Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review., » *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 13, nº 2, pp. 57-149, 2003.
- [31] J. Meador, «Rationale and procedures for using the tissue-residue approach for toxicity assessment and determination of tissue, water, and sediment quality guidelines for aquatic organisms., » *Human and Ecological Risk Assessment*, vol. 12, nº 6, pp. 1018-1078, 2006.
- [32] Å. Wennmalm y B. Gunnarsson, «Pharmaceutical management through environmental product labeling in Sweden., » *Environment International*, vol. 35, nº 5, pp. 775-777, 2009.
- [33] A. Sweetman, M. Dalla Valle, K. Prevedouros y K. Jones, «The role of soil organic carbon in the global cycling of persistent organic pollutants (POPs): interpreting and modelling field data., » *Chemosphere*, vol. 60, nº 7, pp. 959-972, 2005.
- [34] M. Shenker, D. Harush, J. Ben-Ari y B. Chefetz, «Uptake of carbamazepine by cucumber plants—a case study related to irrigation with reclaimed wastewater., » *Chemosphere*, vol. 82, nº 6, pp. 905-910, 2011.
- [35] J. Pontolillo y R. Eganhouse, «The search for reliable aqueous solubility (Sw) and octanol-water partition coefficient (Kow) data for hydrophobic organic compounds: DDT and DDE as a case study., » Reston, Virginia, 2001.
- [36] J. Gray, «Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist., » *Marine Pollution Bulletin*, vol. 45, nº 1, pp. 46-52, 2002.
- [37] W. Bruggeman, A. Opperhuizen, A. Wijbenga y O. Hutzinger, «Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish, » *Toxicological & Environmental Chemistry*, vol. 7, nº 3, pp. 173-189, 1984.
- [38] R. Thomann, «Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains., » *Environmental Science & Technology*, vol. 23, nº 6, pp. 699-707, 1989.
- [39] B. Blair, J. Crago, C. Hedman y R. Klaper, «Pharmaceuticals and personal care products found in the Great Lakes above concentrations of environmental concern., » *Chemosphere*, vol. 93, nº 9, pp. 2116-2123, 2013.
-

-
- [40] T. Bucheli y K. Fent, «Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems., » *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, vol. 23, nº 3, pp. 201-268, 1995.
- [41] J. Beyer, M. Sandvik, K. Hylland, E. Fjeld, E. Egaas, E. Aas, J. Skåre y A. Goksøyr, «Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) exposed by caging to polluted sediments in Sør fjorden, Norway., » *Aquatic Toxicology*, vol. 36, nº 1, pp. 75-98, 1996.
- [42] E. Alonso, N. Tapie, H. Budzinski, K. Leménach, L. Peluhet y J. Tarazona, «A model for estimating the potential biomagnification of chemicals in a generic food web: preliminary development., » *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 15, nº 1, pp. 31-40, 2008.
- [43] Persistence Market Research, «Personal Care Chemicals and Ingredients Market: Global Industry Analysis and Forecast to 2020, » New York, USA, 2017.
- [44] J. Tolls, H. Berger, A. Klenk, M. Meyberg, A. Beiersdorf, R. Müller, K. Rettinger y J. Steber, «Environmental safety aspects of personal care products—a European perspective, » *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 28, nº 12, pp. 2485-2489, 2009.
- [45] R. Rodil, J. Quintanta, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo y D. Prada-Rodríguez, «Multiclass determination of sunscreen chemicals in water samples, » *Analytical Chemistry*, vol. 80, nº 4, pp. 1307-1315, 2008.
- [46] A. Nieto, F. Borrull, R. Marcé y E. Pocurull, «Determination of personal care products in sewage sludge by pressurized liquid extraction and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, » *Journal of Chromatography A*, vol. 1216, nº 30, pp. 5619-5625, 2009.
- [47] K. Bester, «Analysis of musk fragrances in environmental samples, » *Journal of Chromatography A*, vol. 1216, nº 3, pp. 470-480, 2009.
- [48] S. Yazdankhah, A. Scheie, E. Hiøby, B. Lunestad, E. Heir y T. Fotland, «Triclosan and antimicrobial resistance in bacteria: an overview, » *Microbial Drug Resistance*, vol. 12, nº 2, pp. 83-90, 2006.
- [49] A. Asimakopoulos, L. Wang, N. Thomaidis y K. Kannan, «Benzotriazoles and benzothiazoles in human urine from several countries: a perspective on occurrence, biotransformation, and human exposure., » *Environment International*, vol. 59, pp. 274-281, 2013.
- [50] S. Weiss y T. Reemtsma, «Determination of benzotriazole corrosion inhibitors from aqueous environmental samples by liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry, » *Analytical Chemistry*, vol. 77, pp. 7415-7420, 2005.
- [51] D. Molins-Delgado, M. S. Díaz-Cruz y D. Barceló, «Removal of polar UV stabilizers in biological wastewater treatments and ecotoxicological implications, » *Chemosphere*, vol. 119, pp. S51-S57, 2015.
-

-
- [52] G. Dhillion, S. Kaur, R. Pulicharla, S. Brar, M. Cledón, M. Verma y R. Surampalli, «Triclosan: Current Status, Occurrence, Environmental Risks and Bioaccumulation Potential, » *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 12, nº 5, pp. 5657-5684, 2015.
- [53] The TCC consortium, «High production volume (HPV) chemical challenge program data availability and screening level assessment for triclocarban, » The CCC consortium, 2002. [En línea]. Available: http://www.aciscience.org/docs/Triclocarban_HP_V_Test_Plan.pdf. [Último acceso: March 2017].
- [54] N. Andrade, N. Lozano, L. McConnell, A. Torrents, C. Rice y M. Ramirez, «Long-term trends of PBDEs, triclosan, and triclocarban in biosolids from a wastewater treatment plant in the Mid-Atlantic region of the US, » *Journal of Hazardous Materials*, vol. 282, pp. 68-74, 2015.
- [55] A. Venkatesan, B. Pycke, L. Barber, K. Lee y R. Halden, «Occurrence of triclosan, triclocarban, and its lesser chlorinated congeners in Minnesota freshwater sediments collected near wastewater treatment plants, » *Journal of Hazardous Materials*, vol. 229, pp. 29-35, 2012.
- [56] N. Jonkers, A. Sousa, S. Galante-Oliveira, C. Barroso, H.-P. Kohler y W. Giger, «Occurrence and sources of selected phenolic endocrine disruptors in Ria De Aveiro, Portugal, » *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 17, nº 4, pp. 834-843, 2010.
- [57] H.-B. Lee, T. Peart y M. Svobada, «Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, » *Journal of Chromatography A*, vol. 1094, nº 1, pp. 122-129, 2005.
- [58] G. Lorraine y M. Pettigrove, «Seasonal variations in concentrations of pharmaceuticals and personal care products in drinking water and reclaimed wastewater in Southern California, » *Environmental Science and Technology*, vol. 40, nº 3, pp. 687-695, 2006.
- [59] D. Molins-Delgado, M. S. Díaz-Cruz y D. Barceló, «Ecological risk assessment associated to the removal of endocrine-disrupting parabens and benzophenone-4 in wastewater treatment, » *Journal of Hazardous Materials*, vol. 310, pp. 143-151, 2016.
- [60] C. Liao, S. Lee, H.-B. Moon, N. Yamashita y K. Kannan, «Parabens in sediments and sewage sludge from the United States, Japan, and Korea: spatial distribution and temporal trends, » *Environmental Science and Technology*, vol. 47, nº 19, pp. 10895-10902, 2013.
- [61] B. Ramaswamy, J.-W. Kim, T. Isobe, K.-H. Chang, A. Amano, T. Miller, F. Siringan y S. Tanabe, «Determination of preservative and antimicrobial compounds in fish from Manila Bay, Philipines using Ultra High Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry and assessment of human dietary exposure, » *Journal of Hazardous Materials*, vol. 192, nº 3, pp. 1739-1745, 2011.
- [62] J. Regueiro, N. Llompert, E. Psillakis, J. García-Monteagudo y C. García-Jares, «Ultrasound-assisted emulsification-microextraction of phenolic preservatives in water., » *Talanta*, vol. 79, nº 5, pp. 1387-1397, 2009.
-

-
- [63] D. Chased, A. Karnjanapiboonwong, Y. Fang, G. Cobb, A. Morsen y T. Anderson, «Occurrence of synthetic musk fragrances in effluent and non-effluent impacted environments, » *Science of the Total Environment*, vol. 416, pp. 253-260, 2012.
- [64] K. Kannan, J. Reiner, S. Yun, E. Perrotta, L. Tao, B. Johnson-Restrepo y B. Rodan, «Polycyclic musk compounds in higher trophic level aquatic organisms and human from the United States, » *Chemosphere*, vol. 61, nº 5, pp. 693-700, 2005.
- [65] R. Gatermann, S. Biselli, H. Hühnerfus, G. Rimkus, M. Hecker y L. Karbe, «Synthetic musks in the environment. Part I: species-dependent bioaccumulation of polycyclic and nitromusks fragrances in freshwater fish and mussels, » *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 42, nº 4, pp. 437-446, 2002.
- [66] S. Glassmeyer, E. Furlong, D. Kolpin, J. Cahill, S. Zaugg, S. Werner, M. Meyer y D. Kryak, «Transport of chemical and microbial compounds from known wastewater discharges: potential for use as indicators of human fecal contamination, » *Environmental Science and Technology*, vol. 39, nº 14, pp. 5157-5169, 2005.
- [67] M. Clara, O. Gans, G. Windhofer, U. Krenn, W. Hartl, K. Braun, S. Scharf y C. Scheffknecht, «Occurrence of polycyclic musks in wastewater and receiving water bodies and fate during wastewater treatment, » *Chemosphere*, vol. 82, nº 8, pp. 1116-1123, 2011.
- [68] S. Villa, L. Assi, A. Ippolito, P. Bonfanti y A. Finizio, «First evidence of the occurrence of polycyclic synthetic musk fragrances in surface water systems in Italy: spatial and temporal trends in the Molgara River (Lombardia Region, Northern Italy), » *Science of the Total Environment*, vol. 416, pp. 137-141, 2012.
- [69] R. Guo, I.-S. Lee, U.-J. Kim y J.-E. Oh, «Occurrence of synthetic musks in Korean sewage sludge, » *Science of the Total Environment*, vol. 408, nº 7, pp. 1634-1639, 2010.
- [70] L. Vallecillos, E. Pocurull y F. Borull, «A simple and automated method to determine macrocyclic musk fragrances in sewage sludge samples by head-space solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, » *Journal of Chromatography A*, vol. 1314, pp. 38-43, 2013.
- [71] N. Liu, Y. Shi, W. Li, L. Xu y Y. Cai, «Concentration and distribution of synthetic musks and siloxanes in sewage sludge of wastewater treatment plants in China, » *Science of the Total Environment*, vol. 476, pp. 65-72, 2014.
- [72] R. Rodil y M. Moeder, «Stir bar sorptive extraction coupled to thermodesorption-gas chromatography-mass spectrometry for the determination of insect repelling substances in water samples, » *Journal of Chromatography A*, vol. 1178, nº 1, pp. 9-16, 2008.
- [73] F. Antwi, L. Shama y R. Peterson, «Risk assessment for the insect repellents DEET and picaridin, » *Regulatory Toxicology Pharmacology*, vol. 51, nº 1, pp. 31-36, 2008.
- [74] S. Terzic, I. Senta, M. Ahel, M. Gros, M. Petrovic, D. Barceló, J. Muller, T. Knepper, I. Martí, F. Ventura, P. Jovancic y D. Jabucar, «Occurrence and fate of emerging wastewater
-

contaminants in the western Balkan region, » *Science of the Total Environment*, vol. 399, nº 1-3, pp. 66-77, 2008.

[75] R. Rodil, J. Quintana, E. Concha-Grana, P. López-Mahia, S. Muniategui-Lorenzo y D. Prada-Rodríguez, «Emerging pollutants in sewage, surface and drinking water in Galicia (NW Spain), » *Chemosphere*, vol. 86, nº 10, pp. 1040-1049, 2012.

[76] K. Quednow y W. Püttman, «Temporal concentration changes of DEET, TCEP; tertbutryn, and nolyphenols in freshwater streams of Hesse, Germany: possible influence of mandatory regulations and voluntary environmental agreements, » *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 16, nº 6, pp. 630-640, 2009.

[77] S. Costanzo, A. Watkinson, E. Murby, D. Kolpin y M. Sandstrom, «Is there a risk associated with the insect repellent DEET (N, N- diethyl-m-toluamide) commonly found in aquatic environments?, » *Science of the Total Environment*, vol. 384, nº 1, pp. 214-220, 2007.

[78] V. Arlington, «Re-registration of the insect repellent DEET, » Washington, DC, 1998.

[79] S. Whitmore y W. Morinson, «Prevention of UVB-induced immunospression in humans by a high sun protection factor sunscreen, » *Archives of Dermatology*, vol. 131, nº 10, p. 1128, 1995.

[80] S. Seite, A. Colige, P. Piquemalâ-Vlvenot, C. Montastier, A. Fourtanier, C. Lapiere y B. Nusgens, «A full-UV spectrum absorbing daily use cream protects human skin against biological changes occurring in photoaging, » *Photodermatology, Photodermatology, Photoimmunology Photomedicine*, vol. 16, nº 4, pp. 147-155, 2000.

[81] S. Liardet, C. Scaletta, R. Panizzon, P. Hohlfeld y L. Laurent-Applegate, «Protection against pyrimidine dimers, P53, and 8-hydroxy-2-deoxyguanosine expression in ultraviolet-irradiated human skin by sunscreens: differences between UVB & Plus; UVA and UVB alone sunscreens, » *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 117, nº 6, pp. 1437-1441, 2001.

[82] D. Molins-Delgado, P. Gago-Ferrero, M. S. Díaz-Cruz y P. Barceló, «Single and joint ecotoxicity data estimation of organic UV filters and nanomaterials towards selected aquatic organisms. Urban groundwater risk assessment., » *Environmental Research*, vol. 145, pp. 126-134, 2016.

[83] P. Kunz y K. Fent, «Multiple hormonal activities of UV filters and comparison of in vivo and in vitro estrogenic activity of ethyl-4-aminobenzoate in fish, » *Aquatic Toxicology*, vol. 79, nº 4, pp. 305-324, 2006.

[84] A. Klann, G. Levy, I. Lutz, C. Müller, W. Kloas y J.-P. Hildebrandt, «Estrogen-like effects of ultraviolet screen 3-(4-methylbenzylidene)-camphor (eusolex 6300) on cell proliferation and gene induction in mammalian and amphibian cells, » *Environmental Research*, vol. 97, nº 3, pp. 305-324, 2005.

[85] Y. Ogawa, Y. Kawamura, C. Wakui, M. Mutsuga, T. Nishimura y K. Tanamoto, «Estrogenic activity of chemicals related to food contact plastics and rubbers tested by the yeast teo-hybrid assay, » *Food Additives and Contaminants*, vol. 23, nº 4, p. 422+430, 2006.

-
- [86] M. Balmer, H. Buser, M. Muller y T. Poiger, «Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss lakes, » *Environmental Science and Technology*, vol. 39, pp. 953-962, 2005.
- [87] M. Serra-Roig, A. Jurado, M. S. Díaz-Cruz, E. Vázquez-Suñé, E. Pujades y D. Barceló, «Occurrence, fate and risk assessment of personal care products in river-groundwater interface, » *Science of the Total Environment*, vol. 568, pp. 829-837, 2016.
- [88] M. S. Díaz-Cruz, P. Gago-Ferrero, M. Llorca y D. Barceló, «Analysis of UV filters in tap water and other clean waters in Spain, » *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 402, nº 7, pp. 2325-2333, 2012.
- [89] P. Gago-Ferrero, M. S. Díaz-Cruz y D. Barceló, «Occurrence of multiclass UV filters in treated sewage sludge from wastewater treatment plants, » *Chemosphere*, vol. 84, nº 8, pp. 1158-1165, 2011.
- [90] E. Barón, P. Gago-Ferreiro, M. Gorga, I. Rudolph, G. Mendoza, A. Zapata, M. S. Díaz-Cruz, R. Barra, W. Ocampo-Duque y M. Páez, «Occurrence of hydrophobic organic pollutants (BRFs and UV-filters) in sediments from South America, » *Chemosphere*, vol. 92, nº 3, pp. 309-316, 2013.
- [91] P. Gago-Ferrero, M. S. Díaz-Cruz y D. Barceló, «Fast pressurized liquid extraction with in-cell purifications and analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of UV filters and their degradation products in sediments, » *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 400, nº 7, pp. 2195-2204, 2011.
- [92] H.-R. Buser, M. Balmer, P. Schmid y M. Kohler, «Occurrence of UV filters 4-methylbenzylidene camphor and octocrylene in fish from various Swiss rivers with inputs from wastewater treatment plants, » *Environmental Science and Technology*, vol. 40, nº 5, pp. 1427-1431, 2006.
- [93] K. Fent, A. Zenker y M. Rapp, «Widespread occurrence of estrogenic UV-Filters in aquatic ecosystems in Switzerland, » *Environmental Pollution*, vol. 158, nº 5, pp. 1817-1824, 2010.
- [94] P. Gago-Ferrero, M. S. Díaz-Cruz y D. Barceló, «UV filters bioaccumulation in fish from Iberian river basins, » *Science of the Total Environment*, vol. 518, pp. 518-525, 2015.
- [95] A. Keller, W. Vosti, H. Wang y A. Lazareva, «Release of engineered nanomaterials from personal care products through their life cycle, » *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 16, p. 2489, 2014.
- [96] C. Lorenz, N. von Goetz, M. Scheringer, M. Wormuth y K. Hungerbühler, «Potential exposure of German consumers to engineered nanoparticles in cosmetics and personal care products, » *Nanotoxicology*, vol. 5, nº 1, pp. 12-29, 2011.
- [97] Z. Lewica, A. Benedetto, D. Benoit, W. Yu, J. Fortner y V. Colvin, «The structure, composition, and dimensions of TiO₂ and ZnO nanomaterials in commercial sunscreens, » *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 13, p. 3607, 2011.
-

-
- [98] T. Benn, B. Cavanagh, K. Hristovski, J. Posner y P. Westerhoff, «The release of nanosilver from consumer products used in the home, » *Journal of Environmental Quality*, vol. 39, nº 6, pp. 1875-1882, 2010.
- [99] J. Sanchís, C. Bosch-Orea, M. Farré y D. Barceló, «Nanoparticle tracking analysis characterisation and parts-per-quadrillion determination of fullerenes in river samples from Barcelona catchment area, » *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 407, nº 15, pp. 4261-4275, 2015.
- [100] A. Gondikas, F. Kammer, R. Reed, S. Wagner, J. Ranville y T. Hofmann, «Release of TiO₂ nanoparticles from sunscreens into surface waters: a one-year survey at the old Danube recreational Lake, » *Environmental Science and Technology*, vol. 48, nº 10, pp. 5415-5422, 2014.
- [101] J. Sanchís, D. Božović, N. Al-Harbi, L. Silva, M. Farré y D. Barceló, «Quantitative trace analysis of fullerenes in river sediment from Spain and soils from Saudi Arabia, » *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 405, nº 18, pp. 5915-5923, 2013.
- [102] S. Brar, M. Verma, R. Tyagi y R. Surampalli, «Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge—Evidence and impacts, » *Waste Management*, vol. 30, nº 3, pp. 504-520, 2010.
- [103] F. Filon, M. Mauro, G. Adami, M. Bovenzi y M. Crosera, «Nanoparticles skin absorption: new aspects for a safety profile evaluation, » *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, vol. 72, nº 2, pp. 310-322, 2015.
- [104] L. Costa, «Contaminants in fish: risk-benefits considerations, » *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, vol. 58, nº 3, pp. 367-374, 2007.
- [105] N. Blüthgen, S. Zucchi y K. Fent, «Effects of the UV filter benzophenone-3 (oxybenzone) at low concentrations in Zebrafish (*Danio rerio*), » *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 263, nº 2, pp. 184-194, 2012.
- [106] S. Zucchi, D. Oggier y K. Fent, «Global gene expression profile induced by the UV-filter 2-ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate (EHMC) in Zebrafish (*Danio rerio*), » *Environmental Pollution*, vol. 159, nº 10, pp. 3053-3096, 2011.
- [107] N. Blüthgen, N. Meili, G. Chew, A. Odermatt y K. Fent, «Accumulation and effects of the UV-filter octocrylene in adult and embryonic Zebrafish (*Danio rerio*), » *Science of the Total Environment*, vol. 476, pp. 207-217, 2014.
- [108] S. Zucchi, N. Blüthgen, A. Ieronimo y K. Fent, «The UV-absorber Benzophenone-4 alters transcripts of genes involved in hormonal pathways in Zebrafish (*Danio rerio*) eleutheroembryos and adult males, » *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 250, nº 2, pp. 137-146, 2014.
- [109] R. Danovaro, L. Bongiorno, C. Corinaldesi, D. Giovannelli, E. Damiani, P. Astolfi, L. Greci y A. Pusceddu, «Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections, » *Environmental Health Perspectives*, vol. 116, nº 4, p. 441, 2008.
-

-
- [110] C. Downs, E. Kramarsky-Winter, R. Segal, J. Fauth, S. Knutson, O. Bronstein, F. Ciner, R. Jeger, Y. Lichtenfeld, C. Woodley y P. Pennington, «Toxicopathological effects of the sunscreen UV filter, Oxybenzone (Benzophenone-3), on coral planulae and cultured primary cells and its environmental contamination in Hawaii and the US Virgin Islands, » *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 70, nº 2, pp. 265-288, 2016.
- [111] European Commission, «Scientific committee on consumer products, opinion on triclocarban for other uses than as a preservative, » 2005.
- [112] European Food Safety Authority, «Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the commission related to parahydroxybenzoates (E214-219), » 2004.
- [113] R. Verschoyle, A. Brown, C. Nolan, D. Ray y T. Lister, «A comparison of the acute toxicity, neuropathology, and electrophysiology of N, N- diethyl-m-toluamide and N, N-dimethyl-2, 2-diphenylacetamide in rats, » *Fundament and Applied Toxicology*, vol. 18, nº 1, pp. 79-88, 1992.
- [114] T. Battin, F. Kammer, A. Weilhartner, S. Ottofuelling y T. Hofmann, «Nanostructured TiO₂: transport behavior and effects on aquatic microbial communities under environmental conditions, » *Environmental Science and Technology*, vol. 43, nº 21, pp. 8098-8104, 2009.
- [115] N. Panyala, E. Peña-Méndez y J. Havel, «Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health, » *Journal of Applied Biomedicine*, vol. 6, pp. 117-129, 2008.
- [116] M. Schlumpf, K. Kypke, M. Wittassek, J. Angerer, H. Mascher, D. Mascher, C. Vökt, M. Birchler y W. Lichtensteiger, «Exposure patterns of UV of UV filters, fragrances, parabens, phthalates, organochlor pesticides, PBDES and PCBS in human milk: correlation of UV filters with use of cosmetics, » *Chemosphere*, vol. 81, nº 10, pp. 1171-1183, 2010.
- [117] J. Yin, H. Wang, J. Zhang, N. Zhou, F. Gao, Y. Wu, J. Xiang y B. Shao, «The occurrence of synthetic musks in human breast milk in Sichuan, China, » *Chemosphere*, vol. 87, nº 9, pp. 1018-1023, 2012.
- [118] S. Lee, S. Kim, J. Park, H. Kim, J. Lee, G. Choi, S. Choi, S. Kim, S. Kim, K. Choi y S. Kim, «Synthetic musk compounds and benzotriazole ultraviolet stabilizers in breast milk: Occurrence, time-course variation and infant health risk, » *Environmental Research*, vol. 140, pp. 466-473, 2015.
- [119] A. Asimakopoulos, N. Thomaidis y K. Kannan, «Widespread occurrence of bisphenol a diglycidyl ethers, p-hydroxybenzoic acid esters (parabens), benzophenone thpe-UV filters, triclosan, and triclocarban in human urine from Athens, Greece, » *Science of the Total Environment*, vol. 470, pp. 1243-1249, 2014.
- [120] H. Frederiksen, L. Aksglaede, K. Sorensen, O. Nielsen, K. Main, N. Skakkebaek, A. Juul y A.-M. Andersso, «Bisphenol A and other phenols in urine from Danish children and adolescents analyzed by isotope diluted turboglow-LC-MS/MS, » *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, vol. 216, nº 6, pp. 710-720, 2013.
-

-
- [121] T. Geens, H. Neels y A. Covaci, «Distribution of bisphenol-A, triclosan and N-nonylphenol in human adipose tissue, liver and brain, » *Chemosphere*, vol. 87, nº 7, pp. 796-802, 2012.
- [122] A. Aiello, E. Larson y S. Levy, «Consumer antibacterial soaps: effective or just risky?, » *Clinical Infectious Diseases*, vol. 45, nº S2, pp. S137-S147, 2007.
- [123] M. Ricar, H. Guasch, M. Alberch, D. Barceló, C. Bonnineau, A. Geiszinger, M. Farré, J. Ferrer, F. Ricciardi, A. Romani, S. Morín, L. Proia, L. Sala, D. Sureda y S. Sabater, «Triclosan persistence through wastewater treatment plants and its potential toxic effects on river biofilms, » *Aquatic Toxicology*, vol. 100, nº 4, pp. 346-353, 2010.
- [124] R. Bertelsen, M. Longnecker, M. Lovick, A. Calafat, K. Carlsen, S. London y K. Carlsen, «Triclosan exposure and allergic sensitization in Norwegian children, » *Allergy*, vol. 68, nº 1, pp. 84-91, 2013.
- [125] R. Johnson, R. Navone y E. Larson, «An unusual epidemic of methemoglobinemia, » *Pediatrics*, vol. 31, nº 2, pp. 222-225, 1963.
- [126] J. Elberling, A. Linneberg, A. Dirksen, J. Johansen, L. Frolund, F. Madsen, N. Nielsen y H. Mosbech, «Mucosal symptoms elicited by fragrance products on a population-based sample in relation to atopy and bronchial hyper-reactivity, » *Clinical and Experimental Allergy*, vol. 35, nº 1, pp. 75-81, 2005.
- [127] B. Bridges, «Fragrance: emerging health and environmental concerns, » *Flavour Fragrance Journal*, vol. 17, nº 5, pp. 361-371, 2002.
- [128] P. Darbre, A. Aljarrah, W. Miller, N. Coldham, M. Sauer y G. Pope, «Concentrations of parabens in human breast tumours, » *Journal of Applied Toxicology*, vol. 24, nº 1, pp. 5-13, 2004.
- [129] F. Vela-Soria, O. Ballesteros, F.J. Camino- Sánchez, A. Zafra-Gómez, L. Ballesteros y A. Navalón, «Matrix solid phase dispersion for the extraction of selected endocrine disrupting chemicals from human placental tissue prior to UHPLC-MS/MS analysis, » *Microchemical Journal*, vol. 118, pp. 32-39, 2015.
- [130] Z. Leon, A. Chisvert, I. Tarazona y A. Salvador, «Solid-phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry analytical method for the determination of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone and its metabolites in both human urine and semen, » *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 398, nº 2, pp. 831-843, 2010.
- [131] M. Abou-Donia, «Neurotoxicity resulting from coexposure to pyridostigmine bromide, DEET, and permethrin: implications of Gulf war chemical exposures, » *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, vol. 48, nº 1, pp. 35-56, 1996.
- [132] D. Barr, J. Barr, V. Maggio, R. Whitehead, M. Sadowski, R. Whyatt y L. Needham, «A multi-analyte method for the quantification of contemporary pesticides in human serum and plasma using high-resolution mass spectrometry, » *Journal of Chromatography B*, vol. 778, pp. 99-111, 2002.
-

-
- [133] R. Dodson, M. Mishioka, L. Stanley, L. Perovich, Brody, JG y R. Rudel, «Endocrine disruptors and asthma-associated chemicals in consumer products, » *Environental Health Perspectives*, vol. 120, nº 7, p. 935, 2012.
- [134] C. Casals- Casas y B. Desvergne, «Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption, » *Annual Review of Physiology*, vol. 73, pp. 135-162, 2011.
- [135] H. Tangian, L. Bo, L. Wenhua, P. Shin y R. Wu, «Estrogenic potential of benzotriazole on marine Medaka (*Oryzias melastigma*), » *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 80, pp. 327-332, 2012.
- [136] N. Veldhoen, R. Skirrow, H. Osachoff, H. Wigmore, D. Clapson, m. Gunderson, G. van Aggelen y C. Helbing, «The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development, » *Aquatic Toxicology*, vol. 80, nº 3, pp. 217-227, 2006.
- [137] L. Zorrilla, E. Gibson, S. Jeffrey, K. Crofton, W. Setzer, R. Cooper y T. Stoker, «The effects of triclosan on puberty and thyroid hormones in male Wistar rats, » *Toxicological Science*, vol. 107, nº 1, pp. 56-64, 2009.
- [138] S. Raut y R. Angus, «Triclosan has endocrine-disrupting effects in male Western mosquitofish, *Gambusia affinis*, » *Environment Toxicology and Chemistry*, vol. 29, nº 6, pp. 1287-1291, 2010.
- [139] N. Bitsch, C. Dudas, W. Körner, K. Failing, S. Biselli, G. Rimkus y H. Brünn, «Estrogenic activity of musk fragrances detected by the E-screen assay using human MCF-7 cells, » *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 43, nº 3, pp. 257-264, 2002.
- [140] W. Seinen, J. Lemmen, R. Pieters, E. Verbruggen y B. van Der Burg, «AHTN and HHCB show weak estrogenic-but no uterotrophic activity, » *Toxicology Letters*, vol. 111, nº 1, pp. 161-168, 1999.
- [141] E. Gomez, A. Pillon, H. Fenet, D. Rosain, M. Duchesne, J. Nicolas, P. Balaguer y C. Casellas, «Estrogenic activity of cosmetic components in reporter cell lines: parabens, UV screens, and musks, » *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, vol. 68, nº 4, pp. 239-251, 2005.
- [142] J. Chen, K. Ahn, N. Gee, S. Gee, B. Hammock y B. Lesley, «Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products, » *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 221, nº 3, pp. 278-284, 2007.
- [143] D. Pugazhendhi, G. Pope y P. Darbre, «Oestrogenic activity of p-hydroxybenzoic acid (common metabolite of paraben esters) and methyl paraben in human breast cancer cell lines, » *Journal of Applied Toxicology*, vol. 25, nº 4, pp. 301-309, 2005.
- [144] C. Lemini, R. Jaimez, M. Ávila, Y. Franco, F. Larrea y A. Lemús, «In vivo and in vitro estrogen bioactivities of alkyl parabens, » *Toxicology and Industrial Health*, vol. 19, nº 2-6, pp. 69-79, 2003.
-

-
- [145] H. Fang, W. Tong, L. Shi, R. Blair, R. Perkins, W. Branham, B. Hass, Q. Xie, S. Dial y C. Moland, «Estructure-activity for a large diverse set of natural, synthetic, and environmental estrogens, » *Chemical Research in Toxicology*, vol. 14, nº 3, pp. 280-294, 2001.
- [146] C. Weisbrod, P. Kunz, A. Zenker y K. Fent, «Effects of the UV filter benzophenone-2 on reproduction in fish, » *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 225, nº 3, pp. 255-266, 2007.
- [147] K. Moroshi, H. Yamamoto, R. Kamata, F. Shiraishi, T. Koda y M. Morita, «Estrogenic activity of 37 components of commercial sunscreen lotions evaluated by in vitro assays, » *Toxicology in Vitro*, vol. 19, nº 4, pp. 457-459, 2005.
- [148] J. Brausch y G. Rand, «A review of personal care products in the aquatic environment: environmental concentrations and toxicity, » *Chemosphere*, vol. 82, nº 11, pp. 1518-1532, 2011.
- [149] European Medicine Agency, «Guideline on the environmental Risk Assessment of medicinal products for human, » 2006.
- [150] K. Fent, P. Kunz, A. Zenker y M. Rapp, «A tentative environmental assessment of the UV-filters 3-(4-methylbenzylidene-camphor), 2-ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate, benzophenone-3, benzophenone-4 and 3-benzylidene camphor, » *Marine Environmental Research*, vol. 69, nº S1, pp. S4-S6, 2010.
- [151] D. Orvos, F. Versteeg, J. Inauen, M. Capdevielle, A. Rothenstein y V. Cunningham, «Aquatic toxicity of triclosan, » *Environmental Toxicology Chemistry*, vol. 21, pp. 1338-1349, 2002.
- [152] D. Dietrich y B. Hitzfeld, «Bioaccumulation and Ecotoxicity of Synthetic Musks in the Aquatic Environment, » *Synthetic Musk Fragrances in the Environment*, G. Rimkus, Ed., Springer Berlin Heidelberg, 2004, pp. 233-244.
- [153] R. Yamauchi, H. Ishibashi, M. Hirano, T. Mori, J.-W. Kim y K. Arizono, «Effects of synthetic polycyclic musks on estrogen receptor, vitellogenin, pregnate x receptor, and cytochrome P450 3A gene expression in the livers of male medaka (*Oryzias latipes*), » *Aquatic Toxicology*, vol. 90, pp. 636-643, 2008.
- [154] I. Bazin, A. Gadal, E. Touraud y B. Roig, «Hydroxybenzoate preservatives (parabens) in the environment: data for environmental toxicity assessments, » de *Xenobiotics in the Urban Water Cycle: Mass flow, Environmental Processes, Mitigation and Treatment Strategies*, D. Fatta-Kassinos, K. Bester y K. Kummerer, Edits., Netherlands, Springer, 2010, pp. 245-257.
- [155] A. Kumar, «Acute immobilisation of N, N-diethyl-3-toluamide in *Daphnia magna*, » Navi Mumbai, India, 2004.
- [156] J. Seo, Y.-G. Lee, S.-D. Kim, C.-J. Cha, J.-H. Ahn y H.-G. Hur, «Biodegradation of the insecticide N, N-diethyl-m-toluamide by fungi: identification and toxicity of metabolites, » *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 48, pp. 323-328, 2005.
- [157] A. Harada, K. Komori, N. Nakada, K. Kitamura y Y. Suzuki, «Biological effects of PPCPs on aquatic lives and evaluation of river water affected by different wastewater treatment levels, » *Water Science and technology*, vol. 58, p. 1541, 2008.
-

[158] L. Brooke, D. Geiger, S. Poirier y D. Call, «Acute toxicities of organic chemicals to fathead minnows (*Pimephales promelas*): volume I, » Center for Lake Superior Environmental Studies: University of Wisconsin-Superior, AQUA, Superior (WI), 1984.

[159] The European Parliament and the Council of the European Union, «Directive of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for community action in the field of water policy (2000/60/EC), » 2000.

[160] The European Parliament and the Council of the European Union, «Regulation of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products (1227/2009/EC), » 2009.

[161] The Council of the European Community, «Council directive of 27 June 1967 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances (67/548/ECC), » 1967.

[162] The European Parliament and the Council of the European Union, «Regulation of the European parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products (1223/2009/EC), » 2009.

[163] The European Parliament and the Council of the European Union, «Regulation of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency (1907/2006/EC), » 2006.

[164] The Congress of the United States of America, «Federal Water Pollution Control Act (33 U.S.C. 1251 et seq.), » 1972.

[165] The Congress of the United States of America, «Title XIV of the public health service act safety of public water systems (Safe Drinking Water Act), » 1972.

[166] Food and Drug Administration, «Prohibited and Restricted Ingredients, ». Disponible: <https://www.fda.gov/cosmetics/guidanceregulation/lawsregulations/ucm127406.htm>. [Último acceso: Abril 2017].

[167] Government of Japan, «The Basic Environment Law (Law No. 91 of 1993) and successive amendments, » 1993.

[168] Government of Japan, «Water Pollution Control Law (Law No. 138 of 1970) and successive amendments, » 1970.

[169] Government of Japan, «Pharmaceutical Affairs Law (Law No. 145 of 1960) and successive amendments, » 1960.

[170] Ministry of the Environment, Government of Japan, «PRTR information plaza, » Disponible: <https://www.env.go.jp/en/chemi/prtr/prtr.html>. [Último acceso: Abril 2017].

[171] The People's Republic of China Government, «The National Standards of the People's Republic of China: Environmental Quality Standards for Surface Water (GB 3838-2002), » 2002.

-
- [172] Chemical Inspection and Regulation Service, «Cosmetics and Cosmetic Ingredient Law, » Disponible: http://www.cirs-reach.com/China_Chemical_Regulation/China_Cosmetics_Cosmetic_Ingredient_Law.html. [Último acceso: Abril 2017].
- [173] P. Gago-Ferrero, N. Mastroianni, M. S. Díaz-Cruz y D. Barceló, «Fully automated determination of nine ultraviolet filters and transformation products in natural waters and wastewaters by on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry, » *Journal of Chromatography A*, vol. 1294, pp. 106-116, 2013.
- [174] L. Mandaric, E. Diamantini, E. Stella, K. Cano-Paoli, J. Valle-Sistac, D. Molins-Delgado, A. Bellin, G. Chiogna, B. Majone, M. Diaz-Cruz, S. Sabater, D. Barceló, M, Petrovic «Contamination sources and distribution patterns of pharmaceuticals and personal care products in Alpine rivers strongly affected by tourism, » *Science of the Total Environment*, vol. 590-591, pp. 484-494, 2017.
- [175] T. Knepper, «Analysis and fate of insect repellents, » *Water Science and Technology*, vol. 50, pp. 301-308, 2004.
- [176] M. Nakajima, T. Kawakami y T. Niino, «Aquatic fate of sunscreen agents octyl-4-methoxycinnamate and octyl-4-dimethylaminobenzoate in model swimming pools and the mutagenic assays of their, » *Journal of Health Science*, vol. 55, pp. 363-372, 2009.
- [177] V. Sakkas, D. Giokas, D. Lambropoulou y T. Albanis, «Aqueous photolysis of the sunscreen agent actyl-dimethyl-p-aminobenzoic acid: formation of disinfection byproducts in chlorinated swimming pool water, » *Journal of Chromatography A*, vol. 1016, pp. 211-222, 2003.
- [178] E. Galián, «Rubí: un polo industrial oculto bajo la máscara de ciudad dormitorio, » *Expansión*, 31 08 2015.
- [179] S. Lee, C. Liao, G.-J. Song, K. Ra, K. Kannan y H.-B. Moon, «Emission of bisphenol analogues including bisphenol A and bisphenol F from wastewater treatment plants in Korea, » *Chemosphere*, vol. 119, pp. 1000-1006, 2015.
- [180] B. Subedi, S. Lee, H.-B. Moon y K. Kannan, «Emission of artificial sweeteners, select pharmaceuticals, and personal care products through sewage sludge from wastewater treatment plants in Korea, » *Environment International*, vol. 68, pp. 33-40, 2014.
- [181] P. Gago-Ferrero, «Presencia, destino y eliminación de filtros solares orgánicos en el ecosistema acuático, » Tesis Doctoral, Universidad de Barcelona, 2013. Disponible: <http://hdl.handle.net/2445/46706>.
- [182] P. Gago-Ferrero, M. Badia-Fabregat, A. Olivares, B. Piña, P. Blánquez, T. Vicent, G. Caminal, M. S. Díaz-Cruz y D. Barceló, «Evaluation of fungal-and photo-degradation as potential treatments for the removal of sunscreens BP3 and BP1, » *Science of the Total Environment*, vol. 427, pp. 355-363, 2012.
- [183] L. Nguyen, F. Hai, S. Yang, J. Kang, F. Leusch, F. Roddick, W. Price y L. Nghiem, «Removal of pharmaceuticals, steroid hormones, phytoestrogens UV-filters, industrial
-

chemicals and pesticides by *Trametes versicolor*: Role of biosorption and biodegradation, » *International Biodeterioration and Biodegradation*, vol. 88, pp. 169-175, 2014.

[184] C. Martin, M. Moeder, X. Daniel, G. Krauss y D. Schlosser, «Biotransformation of the polycyclic Musks HHCB and AHTN and metabolite formation by fungi occurring in freshwater environments, » *Environmental Science and Technology*, vol. 41, nº 15, pp. 5395-5402, 2007.

[185] A. Rodarte-Morales, G. Feijoo, M. Moreira y J. Lema, «Degradation of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) by white-rot fungi, » *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 27, nº 8, pp. 1839-1846, 2011.

[186] H. Cabana, A. Ahamed y R. Leduc, «Conjugation of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor* to chitosan and its utilization for the elimination of triclosan, » *Bioresource Technology*, vol. 102, nº 2, pp. 1656-1662, 2011.

[187] H. Mizuno, H. Hirai, S. Kawai y T. Nishida, «Removal of estrogenic activity of isobutylparaben and n-butylparaben by laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole, » *Biodegradation*, vol. 20, nº 4, pp. 533-539, 2009.

[188] M. Badia-Fabregat, C. Rodríguez-Rodríguez, P. Gago-Ferrero, A. Olivares, B. Piña, M. S. Díaz-Cruz, T. Vicent, D. Barceló y G. Caminal, «Degradation of UV filters in sewage sludge and 4-MBC in liquid medium by the ligninolytic fungus *Trametes versicolor*., » *Journal of Environmental Management*, vol. 104, pp. 114-120, 2012.

[189] C. Rodríguez-Rodríguez, E. Barón, P. Gago-Ferrero, A. Jelić, M. Llorca, M. Farré, M. S. Díaz-Cruz, E. Eljarrat, M. Petrović, G. Caminal y D. Barceló, «Removal of pharmaceuticals, polybrominated flame retardants and UV-filters from sludge by the fungus *Trametes versicolor* in bioslurry reactor, » *Journal of Hazardous Materials*, vol. 233, pp. 235-243, 2012.

[190] Euractiv, «Chemicals review: German industry asks for new REACH, » September 2003. Disponible: <http://www.euractiv.com/section/sustainable-dev/news/chemicals-review-german-industry-asks-for-new-reach/>. [Último acceso: Abril 2017].

[191] J. Sanchís, «Occurrence and toxicity of nanomaterials and nanostructures in the environment, » Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona, 2015. Disponible: <http://hdl.handle.net/2445/66740>

[192] M. Farré, D. Asperger, L. Kantiani, S. González, M. Petrovic y D. Barceló, «Assessment of the acute toxicity of triclosan and methyl triclosan in wastewater based on the bioluminescence inhibition of *Vibrio fischeri*, » *Analytical and Bioanalytical Chemistry* vol. 390, nº 8, p. 390, 2008.

[193] J. Fabrega, S. Fawcett, J. Renshaw y J. Lead, «Silver nanoparticle impact on bacterial growth: effect of pH, concentration, and organic matter, » *Environmental Science and Technology*, vol. 43, nº 19, pp. 7285-7290, 2009.

[194] M. Amin, A. Alazba y U. Manzoor, «A review of removal of pollutants from water/wastewater using different types of nanomaterials, » *Advances in Materials Science and Engineering*, vol. 2014, 2014.

-
- [195] P. Gago-Ferrero, M. S. Díaz-Cruz y D. Barceló, «Multi-residue method for trace level determination of UV filters in fish based on pressurized liquid extraction and liquid chromatography–quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry, » *Journal of Chromatography A*, vol. 1286, pp. 93-101, 2013.
- [196] P. Gago-Ferrero, M. Alonso, C. Bertozzi, J. Marigo, L. Barbosa, M. Cremer, E. Secchi, A. Avezedo, J. Lailson-Brito, J. Torres, O. Malm, E. Eljarrat, M. S. Díaz-Cruz y D. Barceló, «First determination of UV filters in marine mammals. Octocrylene levels in franciscana dolphins, » *Environmental Science and Technology*, vol. 47, pp. 5619-5625, 2013.
- [197] Ministério da Pesca e Aquicultura, «Boletín Estadístico da Pesca e Aquicultura, » Brasil, 2009.
- [198] E. Barón, M. Máñez, A. Andreu, F. Sergio, F. Hiraldo, E. Eljarrat y D. Barceló, «Bioaccumulation and biomagnification of emerging and classical flame retardands in birds of 14 species from Doñana Natural Space and surrounding areas (South-western Spain), » *Environment International*, vol. 68, pp. 118-126, 2014.
- [199] C. Corcellas, A. Andreu, M. Máñez, F. Sergio, F. Hiraldo, E. Eljarrat y D. Barceló, «Pyrethroid insecticides in wild bird eggs from a World Heritage Listed Park: A case study in Doñana National Park (Spain), » *Environmental Pollution*, vol. 228, pp. 321-330, 2017.
- [200] R. Letcher, E. Klasson-Wehler y A. Bergman, «Methyl Sulfone and Hydroxylated Metabolites of Polychlorinated Biphenyls, in: Anthropogenic Compounds Part K, » *Handbook of Environmental Chemistry*, pp. 315-359, 2000.
- [201] U. Schauer, W. Völkel, A. Heusener, T. Colnot, T. Broschard, F. von Landenberg y W. Dekant, «Kinetics of 3-(4-methylbenzylidene) camphor in rats and humans after dermal application, » *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 216, pp. 339-346, 2006.
- [202] M. Monteiro, C. Nerín y F. Reyes, «Migration of Tinuvin P, a UV stabilizer, from PET bottles into fatty-food simulants, » *Packaging Technology and Science*, vol. 12, nº 5, pp. 241-248, 1999.
- [203] D. Nakajima, S. Asafa, S. Kageyama, T. Yamamoto, H. Kuramochi, N. Tanaka, K. Takeda y S. Goto, «Activity related to the carcinogenicity of plastic additives in the benzophenone group, » *Journal of UOEH*, vol. 28, nº 2, pp. 143-156, 2006.
