



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Análisis, biodisponibilidad y vigilancia de contaminantes orgánicos hidrofóbicos en el medio acuático

Agustina de la Cal Rodríguez

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

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

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

Análisis, biodisponibilidad y vigilancia de contaminantes orgánicos hidrofóbicos en el medio acuático

Agustina de la Cal Rodríguez





Universitat
de Barcelona

Departament de Química Analítica. Facultat de Química

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

TESI DOCTORAL

**Análisis, biodisponibilidad y vigilancia
de contaminantes orgánicos hidrofóbicos
en el medio acuático**

presentada per

Agustina de la Cal Rodríguez

per optar al títol de Doctor per la Universitat de Barcelona

Directors:

Tutor:

Dra. Ethel Eljarrat Esebag
Científica Titular
Dep.de Química Ambiental
IDAEA. CSIC

Dr. Damià Barceló i Cullerés
Professor de Investigació
Dep.de Química Ambiental
IDAEA. CSIC

Dr. F. Javier Santos Vicente
Professor Titular
Dep.de Química Analítica
Facultat de Química. UB

Barcelona, Octubre de 2015

La Dra. Ethel Eljarrat Esebag, Científico Titular, y el Dr. Damià Barceló i Cullerés, Profesor de Investigación, del Departamento de Química Ambiental del Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IDAEA-CSIC),

CERTIFICAN:

Que los estudios que se describen en la presente memoria, titulada "Análisis, biodisponibilidad y vigilancia de contaminantes orgánicos hidrofóbicos en el medio acuático", que Agustina de la Cal Rodríguez presenta para optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona, han sido realizados bajo nuestra dirección en el Departamento de Química Ambiental del IDAEA-CSIC.

Dra. Ethel Eljarrat Esebag

Dr. Damià Barceló i Cullerés

Barcelona, Octubre de 2015

Este trabajo ha contado con el apoyo del Departament d'Universitat, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya mediante una beca para la formación de personal investigador (2003FI 00092) y una beca de estancias en el extranjero (2005BE 00540), el Gobierno de España (proyectos TRACOAL, PPQ2001-1805-C03-01, CEMAGUA, CGL2007-64551/HID, CTM2005-25168-E, CTM2004-20246-E y BQU2002-10946-E), la Confederación Hidrográfica del Ebro ("Asistencia Técnica para la Actualización de la situación piscícola en el Río Cinca") y la Unión Europea (proyectos STAMPS, EVK1-CT2002-00119 y AQUATERRA, 505428).

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer al Dr. Barceló y la Dra. Eljarrat el haber confiado en mí para la realización de esta tesis, así como su orientación y soporte a lo largo del mismo. También al Dr. Grotenhuis, por su acogida dentro de su grupo en la Universidad de Wageningen, y al Dr. Santos, por sus oportunas correcciones.

Gracias a todos los compañeros del CSIC que en uno u otro momento han contribuido a que este trabajo saliese adelante.

A Julia de la Cal por todo el trabajo en la parte gráfica de esta memoria y a Ignacio Gómez, por su ayuda con las referencias y la asesoría lingüística.

A los del lado de aquí / Als d'aquest costat:

Hace ya doce años que llegué a Barcelona para hacer unas prácticas de seis meses, que se convirtieron en un máster de un año, al que siguió una tesis y luego un trabajo. Es obvio que la acogida tuvo que ser muy buena si llegó a retenerme de volver con los míos después de los primeros seis meses y también después del año. Todos los compañeros y visitantes de aquel camarote de los hermanos Marx lo saben bien, pero también los que llegaron luego a mi vida y quien hoy sigue reteniéndome aquí.

A los del lado de allá / Aos da beira de alá:

Gracias por seguir ahí, por ser siempre el punto de partida
y de regreso.

A mis padres, por no permitir nunca que me invada el sentimiento
de haberles abandonado.

A mi hermana, por haberme acompañado de este lado tanto tiempo
y haber hecho de él mi nueva casa.

:_)

ÍNDICE

Resumen.....	1
Objetivos y estructura de la tesis	5
Acrónimos y abreviaturas	9
1. Introducción general.....	15
1.1. Problemática de la contaminación ambiental	17
1.2. Distribución, exposición y biodisponibilidad.....	18
1.2.1. Distribución de los contaminantes en el medio acuático	18
1.2.1.1. Interacciones entre el contaminante y los sólidos del medio	20
1.2.1.2. Transporte hacia el receptor	22
1.2.1.3. Asimilación a través de la membrana celular.....	23
1.2.1.4. Acumulación y Efectos.....	23
1.2.1.5. Transformación	26
1.2.2. Exposición y biodisponibilidad.....	26
1.3. Priorización de los contaminantes ambientales	27
1.3.1. Contaminantes organohalogenados.....	35
1.3.2. El DDT	35
1.3.2.1. Estructura y propiedades físico-químicas	37
1.3.2.2. Transformación en el medioambiente.....	38
1.3.2.3. Distribución en el medio acuático.....	39
1.3.2.4. Toxicidad.....	43
1.3.3. Los difeniléteres polibromados o PBDE.....	44
1.3.3.1. Estructura y propiedades físico-químicas	44
1.3.3.2. Transformación en el medioambiente.....	47
1.3.3.3. Distribución en el medio acuático	48
1.3.3.4. Toxicidad.....	52
1.4. Determinación de los niveles de contaminación en el medio acuático	53
1.4.1. Fracción a determinar	54
1.4.1.1. Matriz y periodicidad.....	55
1.4.1.2. La fracción biodisponible	57
1.4.2. Técnicas de determinación.....	59
1.4.3. Toma de muestra y conservación.....	62
1.4.4. Preparación de muestra.....	63
1.4.4.1. Extracción de muestras acuosas.....	63
1.4.4.2. Extracción de muestras sólidas.....	67
1.4.5. Técnicas biomiméticas	70
1.4.5.1. Extracciones parciales.....	71
1.4.5.2. Muestreadores pasivos.....	75
1.4.6. Análisis Instrumental.....	83
1.4.6.1. Inyección y separación.....	84
1.4.6.2. Detección.....	86

2. Analisis químico convencional mediante SPLE y niveles ambientales en sedimentos y biota	91
2.1. Introducción	93
2.2. Trabajo experimental.....	95
2.3. Artículo científico #1. <i>Determination of 39 polybrominated diphenyl ether congeners in sediment samples using fast selective pressurized liquid extraction and purification</i>	97
2.4. Artículo científico #2. <i>Determination of decabromodiphenyl ether in sediments using selective pressurized liquid extraction followed by GC-NCI-MS</i>	109
2.5. Artículo científico #3. <i>Occurrence and bioavailability of polybrominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecane in sediment and fish from the Cinca River, a tributary of the Ebro River (Spain)</i>	117
2.6. Artículo científico #4. <i>Spatial variation of DDT and its metabolites in fish and sediment from Cinca River, a tributary of Ebro River (Spain)</i>	125
2.7. Discusión de resultados	135
2.7.1. Bondad de la metodología	135
2.7.2. Evolución de la SPLE	136
2.7.3. Evolución del análisis de PBDE y HBCD	141
2.7.4. Niveles y distribución entre biota y sedimento	142
3. Estudios de biodisponibilidad en sedimento mediante extracciones suaves con Tenax	149
3.1. Introducción	151
3.2. Trabajo experimental.....	154
3.3. Artículo científico #5. <i>Tenax extraction as a tool to evaluate the availability of polybrominated diphenyl ethers, DDT, and DDT metabolites in sediments</i>	157
3.4. Discusión de resultados	167
3.4.1. Desorción de PBDE, DDX y HBCD	167
3.4.2. Estandarización de la extracción con Tenax.....	170
3.4.3. Evolución de la técnica	171
4. Evaluación del Chemcatcher como sistema de muestreo pasivo en agua	175
4.1. Introducción.....	177
4.2. Trabajo experimental	179
4.3. Artículo científico #6. <i>Evaluation of the aquatic passive sampler Chemcatcher for the monitoring of highly hydrophobic compounds in water</i>	181
4.4. Discusión de resultados	189
4.4.1. Aplicabilidad del Chemcatcher al muestreo de PBDE y DDX	189
4.4.2. Valoración de la técnica	191
4.4.3. Evolución de la técnica.....	192
5. Conclusiones generales	197
REFERENCIAS	203
ANEXO. Publicaciones adicionales	241

Resumen

Cuando un contaminante alcanza un cuerpo de agua se establece una partición entre la fase acuosa y la fase particulada que forma el sedimento que viene determinada tanto por sus propiedades físico-químicas como por las características del medio. La facilidad con que un contaminante puede ser asimilado por los seres vivos disminuye con la asociación del mismo a las partículas. Por ello, en un periodo de tiempo determinado, solamente una fracción de la cantidad total de una sustancia química presente en la columna de agua o en el sedimento está en forma bioaccesible o biodisponible. A su vez, aun cuando la fracción disuelta de un contaminante hidrofóbico puede ser muy baja y a veces indetectable, una exposición muy larga puede dar lugar a su acumulación por parte de los organismos, sobre todo en niveles tróficos superiores. La exposición real de los organismos vivos depende, por tanto, de su accesibilidad espacial y temporal a las moléculas de contaminante. De ahí que una determinación precisa del riesgo asociado a la presencia de estos contaminantes en el medio acuático deba incluir medidas que sean representativas de su disponibilidad para ser asimilada en esas condiciones específicas. Si bien la forma directa de abordar este problema es el análisis de organismos vivos, esta práctica conlleva múltiples desventajas que en los últimos años han dado lugar a la búsqueda de alternativas como los muestreadores pasivos o las extracciones suaves o selectivas del sedimento. El concepto de biodisponibilidad es especialmente relevante en el medio acuático en el caso de los contaminantes hidrofóbicos, como, por ejemplo, las sustancias haloaromáticas. Estas sustancias tienden a unirse a las partículas presentes en el medio y a ser acumuladas por los seres vivos, mientras que presentan concentraciones muy bajas en la fase disuelta de la columna de agua, a veces muy difíciles de medir. Son, además, persistentes en el medioambiente, lo que ha hecho de ellas uno de los principales objetivos de las legislaciones ambientales.

La presente tesis se centra en dos grupos de contaminantes orgánicos haloaromáticos: un contaminante prioritario como es el histórico pesticida diclorodifeniltricloroetano (DDT) y sus productos de transformación (DDX, en conjunto) y los retardantes de llama difeniléteres polibromados (PBDE), de interés emergente en el momento en que se realizó el trabajo experimental de la tesis e incluidos más recientemente en la legislación. La parte experimental del trabajo consistió fundamentalmente en la puesta a punto de metodologías para el muestreo y análisis de ambas familias de contaminantes en los distintos compartimentos del medio acuático.

En la primera parte de la tesis, se empleó una técnica moderna para la extracción cuantitativa en sedimento y en biota, adecuada a los requisitos normativos actuales de exhaustividad para la vigilancia de contaminantes. Se optimizó un método analítico para el análisis de la concentración total de 40 congéneres de mono- a decaBDE en muestras de sedimentos mediante extracción selectiva con líquidos presurizados (SPL). Posteriormente, dicha metodología fue validada satisfactoriamente para la determinación de estos mismos analitos en peces y para el análisis de los isómeros *o,p'*- y *p,p'*- de los DDX. La determinación instrumental fue llevada a cabo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), con ionización química negativa (NCI) en el caso de los PBDE e impacto electrónico (EI) para el análisis de los DDX. Con el fin de evitar la degradación del BDE-209, además, se requirió el uso de un programa cromatográfico más corto. Los métodos desarrollados permitieron realizar una extracción y purificación simultánea de las muestras y generar extractos limpios listos para el análisis instrumental

mediante GC-MS, con una reducción importante del tiempo de análisis, la manipulación de la muestra y el uso de disolventes frente a métodos tradicionales de extracción de muestras sólidas. Se obtuvieron recuperaciones de entre 53 y 102 % con una desviación relativa máxima del 19%, hasta límites de detección de 6-75 pg/g en peso seco (dw) en sedimento y de 2 a 204 pg/g en peso fresco (ww) en peces.

Los métodos optimizados fueron aplicados para el análisis de PBDE en muestras de sedimentos procedentes de distintos puntos de la costa peninsular. En general, los niveles encontrados, dominados por el BDE-209, reflejaban el grado de industrialización de las áreas de estudio, con niveles de hasta 73 ng/g dw. Por otra parte, se llevó a cabo un muestreo tanto de sedimento como de biota a lo largo del río Cinca, en la cuenca del río Ebro, en torno al polígono industrial de Monzón. El análisis de PBDE y DDX en las muestras resultó en niveles mucho más altos por debajo de dicha localización. En peces, se observó un incremento de las concentraciones con la edad que indicaba la existencia de bioacumulación. Además, la comparación de las concentraciones en biota y sedimento reflejó diferencias en la acumulación y/o biodisponibilidad de los distintos analitos. Mientras que los sedimentos mostraron un patrón de PBDE dominado por el BDE-209, en los peces este congénere no pudo ser detectado. Por el contrario, los BDE-47, BDE-153, BDE-154 y BDE-183, con BSAF de 12-201, fueron mucho mayores relativamente en los peces. El p,p'-DDE, mayoritario en sedimentos, es mucho mayor proporcionalmente en los peces, aunque el grado de bioacumulación es mucho menor que los PBDE encontrados.

Además, la metodología desarrollada mediante la SPLE y la monitorización del ión bromuro mediante GC-NCI-MS permitió la detección en sedimentos y peces de hexabromociclododecano (HBCD), un retardante de llama que comenzaba a utilizarse como sustituto de los PBDE y cuya presencia en el medioambiente apenas había sido descrita en ese momento. No obstante, en el cromatograma de GC-MS el HBCD aparece como un pico poco resuelto, mientras que la utilización de LC-MS-MS en estudios posteriores permitió la separación y cuantificación de los isómeros α -, β - y γ -HBCD.

Posteriormente, se evaluaron dos tipos de técnicas biomiméticas que utilizan una fase sustituta para cuantificar la fracción de contaminante bioaccesible y bioacumulable en el medio. En primer lugar, la extracción exhaustiva de los contaminantes presentes en los sedimentos del río Cinca, realizada mediante el método de SPLE desarrollado al comienzo del periodo de tesis, fue comparada con la extracción acuosa con Tenax® de los mismos sedimentos, lo que permitió cuantificar la fracción susceptible de pasar a la fase disuelta en periodos concretos de tiempo. Se realizaron extracciones consecutivas durante 18 días y las cantidades obtenidas fueron ajustadas a un modelo cinético de tres compartimentos para calcular la fracción de desorción rápida o bioaccesible (fácilmente disponible para los organismos vivos). De los resultados se desprende que una extracción de 24 h es un tiempo suficiente para abarcar la fracción de desorción rápida para casi todos los analitos en consideración. Por otra parte, la presencia de una fracción residual de contaminante demostró la existencia de fracciones importantes de estos contaminantes que se asocian de manera casi irreversible a la fase particulada, con la consecuente pérdida de biodisponibilidad, lo que debe ser tenido en cuenta cuando se evalúa el riesgo que estos contaminantes suponen en el medioambiente. Además, esta secuestro por parte del sedimento es mayor para los PBDE más bromados que para los menos sustituidos, el DDT frente al DDE, los isómeros p,p'- frente

a los *o,p'*-DDX y para el isómero γ -HBCD frente al α -HBCD. Estas diferencias son coherentes con los perfiles de compuestos encontrados en biota para cada familia, lo que parece demostrar que las diferencias en la fuerza de la asociación de cada uno de ellos con la fase particulada es una de las causas que contribuyen a la formación de estos patrones. Por último, dentro de la línea de trabajo de técnicas biomiméticas, se evaluó la aplicabilidad de un dispositivo de muestreo pasivo en fase experimental, el Chemcatcher®, para el seguimiento de la contaminación en agua por PBDE y DDX. Se evaluaron varias configuraciones de fase aceptora y membrana limitante y se vió que la capacidad de acumulación para estos compuestos era óptima cuando se usa un disco de C18 impregnado en octanol como fase aceptora y LDPE como membrana limitante de difusión. Asimismo, se llevaron a cabo varios experimentos de exposición en condiciones controladas en laboratorio en un sistema de flujo continuo durante periodos de dos semanas. Los límites de detección obtenidos (entre 1.5 y 59 pg/L para los PBDE y de 0,5-8,4 ng/L para los DDX) y la variabilidad de los resultados indican que este sistema podría ser apto para el monitoreo semi-cuantitativo de estos contaminantes en cuerpos de agua muy contaminados como efluentes de depuradoras. En el río Cinca, donde se realizó una campaña de muestreo durante dos semanas, no se pudo cuantificar ninguno de estos contaminantes, aun cuando sí pudieron detectarse en sedimentos y biota.

Objetivos y estructura de la tesis

La creciente presencia de contaminantes en el ambiente y, en particular, en las masas de agua, hace necesarias políticas de sostenibilidad basadas en el análisis de los riesgos que dicha presencia comporta para la salud medioambiental y humana. La exposición real de los organismos vivos depende de su accesibilidad a las moléculas de contaminante, tanto espacial como temporal. Esta cuestión no queda del todo resuelta con las medidas que se utilizan tradicionalmente para la vigilancia de los contaminantes orgánicos en sistemas acuáticos, ya sean concentraciones puntuales en agua o concentraciones totales en sedimento e incluso los análisis de biota. De ahí nace la necesidad de disponer de herramientas de vigilancia química que, más allá de la exactitud y de la capacidad de detección de concentraciones muy pequeñas, sean capaces de proporcionar medidas representativas de la exposición de los seres vivos que puedan servir de base para discriminar y priorizar las situaciones realmente peligrosas. En el caso de los contaminantes hidrofóbicos, como los PBDE y los DDX, es especialmente importante disponer de información sobre las concentraciones en los distintos compartimentos y de las dinámicas de unión y desorción de las fases sólidas para comprender mejor su capacidad de afectar a los sistemas acuáticos.

El trabajo presentado en esta memoria de tesis se enmarca en este contexto y tenía como objetivo general el desarrollo y aplicación de métodos analíticos que permitiesen medir las concentraciones de contaminantes haloaromáticos en distintas fases del medio acuático relevantes para determinar la exposición de los organismos vivos.

De manera particular, se planteó la aplicación de tres técnicas distintas para la cuantificación de PBDE y DDX en sistemas acuáticos, una adecuada a los requisitos normativos actuales de exhaustividad para la vigilancia de contaminantes y dos técnicas de carácter biomimético. Los objetivos específicos se pueden enumerar de la siguiente manera:

1. Desarrollar y validar una metodología analítica de extracción exhaustiva de PBDE y DDX en matrices de sedimento, basada en el uso de la técnica de SPLE y GC-MS.
2. Validar la técnica para el análisis de biota.
3. Validar y aplicar una metodología analítica de extracción de la fracción bioaccesible de PBDE y DDX en sedimento, basada en extracciones acuosas con Tenax®.
4. Evaluar y optimizar la implementación de un dispositivo de muestreo pasivo en fase experimental, el Chemcatcher®, para medir la fracción disuelta de PBDE y DDX promediada en el tiempo.

La memoria de tesis se ha escrito como compendio de artículos científicos publicados y se ha estructurado en cinco grandes apartados o capítulos.

En el primer capítulo se describe el contexto que justifica el estudio de investigación de la tesis. En él se trata la problemática general en cuanto a la presencia de contaminantes hidrofóbicos en los sistemas acuáticos y en concreto de los analitos de estudio del trabajo, DDT y PBDE. Tras ello, se aborda la necesidad de disponer de herramientas analíticas que permitan la estimación de la exposición de los organismos vivos a los mismos, y se hace una revisión de las técnicas disponibles actualmente para este fin.

En los capítulos 2, 3 y 4 se describe el trabajo experimental y los resultados obtenidos a partir de la puesta a punto y la aplicación de tres metodologías diferentes para la cuantificación de DDT y PBDE en el medio acuático. Cada capítulo comienza con una introducción sobre la técnica

empleada. A continuación se presenta el trabajo experimental llevado a cabo y se adjuntan los artículos científicos publicados. En la discusión de resultados de cada uno, se analiza la evolución que la técnica empleada ha tenido desde el momento en que se realizaron los experimentos descritos en los artículos.

En el capítulo 2 se trata el análisis de la carga total de DDX y PBDE en sedimento y en biota mediante SPLE-GC-MS, que constituye los dos primeros objetivos enumerados más arriba. En él se incluyen las siguientes publicaciones:

- Artículo científico #1. *Determination of 39 polybrominated diphenyl ether congeners in sediment samples using fast selective pressurized liquid extraction and purification.*

De la Cal A, Eljarrat E, Barceló D. 2003. J Chromatogr A 1021(1-2):165-173.

- Artículo científico #2. *Determination of decabromodiphenyl ether in sediments using selective pressurized liquid extraction followed by GC-NCI-MS.*

Eljarrat E, de la Cal A, Barceló D. 2004. Anal Bioanal Chem 378(3):610-614.

- Artículo científico #3. *Occurrence and bioavailability of polybrominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecane in sediment and fish from the Cinca River, a tributary of the Ebro River (Spain).*

Eljarrat E, de la Cal A, Raldúa D, Durán C, Barceló D. 2004. Environ Sci Technol 38(9): 2603-2608.

- Artículo científico #4. *Spatial variation of DDT and its metabolites in fish and sediment from Cinca River, a tributary of Ebro River (Spain).*

De la Cal A, Eljarrat E, Raldúa D, Durán C, Barceló D. 2008. Chemosphere 70(7): 1182-1189.

En el capítulo 3 se describe el trabajo dedicado a las extracciones con Tenax®, basándose en el siguiente artículo publicado:

- Artículo científico #5. *Tenax extraction as a tool to evaluate the availability of polybrominated diphenyl ethers, DDT, and DDT metabolites in sediments.*

De la Cal A, Eljarrat E, Grotenhuis T, Barceló D. 2008. Environ Toxicol Chem 27(6): 1250-1256.

En el capítulo 4 se explica la evaluación del Chemcatcher®, cuyos principales resultados se describen en la siguiente publicación:

- Artículo científico #6. *Evaluation of the aquatic passive sampler Chemcatcher for the monitoring of highly hydrophobic compounds in water.*

De la Cal A, Kuster M, López de Alda M, Eljarrat E, Barceló D. 2008. Talanta 76(2): 327-332.

Por último, en el capítulo 5 se recogen las conclusiones generales extraídas en cuanto a la valoración de cada una de las técnicas mencionadas y a los valores obtenidos mediante su aplicación a los contaminantes estudiados.

Al final del documento se detalla la bibliografía que ha sido mencionada a lo largo del texto. Asimismo, se adjunta separadamente como anexo una lista de publicaciones no incluidas en la memoria que se enmarcan dentro de la línea de trabajo de la tesis y algunos de cuyos resultados son mencionados en las discusiones de resultados.

Acrónimos y abreviaturas

AOM	materia orgánica amorfa (del inglés <i>Amorphous Organic Matter</i>)
ASE	extracción acelerada con disolventes (de <i>Accelerated Solvent Extraction</i>)
BAF	factor de bioacumulación (de <i>Bioaccumulation Factor</i>)
BCF	factor de bioconcentración (de <i>Bioconcentration Factor</i>)
BDE	difeniléter bromado (de <i>Brominated Diphenyl Ether</i>)
BFR	retardantes de llama bromados (de <i>Brominated Flame Retardants</i>)
BMF	factor de biomagnificación (de <i>Biomagnification Factor</i>)
BSAF	factor de acumulación biota-sedimento (de <i>Biota-Sediment Accumulation Factor</i>)
C18	octadecil sílice
CAS	Servicio de Resúmenes Químicos (de <i>Chemical Abstract Service</i>)
CG	geosorbentes carbonosos (de <i>Carbonaceous Geosorbents</i>)
DDD	diclorodifenildicloroetano o tetraclorodifeniletano
DDE	diclorodifenildicloroetileno
DDT	dicloro difenil tricloroetano o p,p'-diclorodifeniltricloroetano o 1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano
DDX	suma del DDT y los metabolitos estudiados (DDT, DDE y DDD)
DOM	materia orgánica disuelta (de <i>Dissolved Organic Matter</i>)
dw	peso seco (de <i>Dry Weight</i>)
ECD	detector de captura de electrones (de <i>Electron Capture Detector</i>)
EI	impacto o ionización electrónica (de <i>Electron Ionization</i>)
EQS	normas de calidad ambiental (de <i>Environmental Quality Standards</i>)
EQSD	Directiva de Normas de Calidad Ambiental 2008/105/EC (de <i>Environmental Quality Standards Directive</i>)
FR	retardantes de llama (de <i>Flame Retardants</i>)
F _{24h}	fracción de contaminante desorbida en 24 horas
F _{6h}	fracción de contaminante desorbida en 6 horas
F _{rap}	fracción de contaminante de desorción rápida
F _{slow}	fracción de contaminante de desorción lenta
F _{vs}	fracción de contaminante de desorción muy lenta
GC	cromatografía de gases (de <i>Gas Chromatography</i>)
GCxGC	cromatografía de gases bidimensional
GPC	cromatografía de permeación en gel (de <i>Gel Permeation Chromatography</i>)

HOC	contaminantes orgánicos hidrofóbicos (de <i>Hydrophobic Organic Contaminants</i>)
HBCD	hexabromociclododecano
HPCD	hidroxipropil-b-ciclodextrina
HRMS	espectrometría de masas de alta resolución (de <i>High-Resolution Mass Spectrometry</i>)
HS	técnicas de espacio de cabeza (de <i>Head Space</i>)
ID	dilución isotópica (de <i>Isotope Dilution</i>)
K_{oc} o K_{om}	coeficiente de partición con el carbono orgánico o con la materia orgánica
K_{ow}	coeficiente de partición octanol-agua
K_{sw}	coeficiente de partición muestreador-agua
ISO	Organización Internacional de Normalización (de <i>International Organization for Standardization</i>)
LC	cromatografía líquida (de <i>Liquid Chromatography</i>)
LDPE	polietileno de baja densidad (de <i>Low-Density Polyethylene</i>)
LOD	límite de detección (<i>Limit of Detection</i>)
LPME	microextracción en fase líquida (de <i>Liquid-Phase Micro Extraction</i>)
LRMS	analizadores de masas de baja resolución (de <i>Low-Resolution Mass Spectrometry</i>)
lw	peso lipídico (de <i>Lipid Weight</i>)
LLE	extracción líquido-líquido (de <i>Liquid-Liquid Extraction</i>)
MAE	extracción asistida por microondas (de <i>Microwave Assisted Extraction</i>)
MeO-PBDE	PBDE metoxilados
MESCO	recubrimiento absorbente sellado dentro de membrana (de <i>Membrane-Enclosed Sorptive Coating</i>)
MS	espectrometría de masas (de <i>Mass Spectrometry</i>)
MS/MS	espectrometría de masas en tándem
MSPD	dispersión de matriz en fase sólida (de <i>Matrix Solid Phase Dispersion</i>)
NCI	ionización química negativa (de <i>Negative Chemical Ionization</i>)
NP	nonilfenol
OC	carbono orgánico (de <i>Organic Carbon</i>)
OCP	pesticidas organoclorados (de <i>Organochlorinated Pesticides</i>)
OH-PBDE	PBDE hidroxilados
OM	materia orgánica (de <i>Organic Matter</i>)

PAH	hidrocarburos aromáticos policíclicos (de <i>Polyaromatic Hydrocarbons</i>)
PBB	bifenilos polibromados (de <i>Polybrominated Biphenyls</i>)
PBDD	dioxinas bromadas (de <i>Polybrominated Dibenzo-p-Dioxins</i>)
PBDE	difeniléteres polibromados (de <i>Polybrominated Diphenyl Ethers</i>)
PBDF	dibenzofuranos bromados (de <i>Polybrominated Dibenzofurans</i>)
PBT	sustancias persistentes, bioacumulables y tóxicas (de <i>Persistent, Bioaccumulative and Toxic</i>)
PCB	bifenilos policlorados (de <i>Polychlorinated Biphenyls</i>)
PCDD	dibezodioxinas policloradas o dioxinas (de <i>Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins</i>)
PCDF	dibenzofuranos policlorados o dibenzofuranos (de <i>Polychlorinated Dibenzofurans</i>)
PCPP	productos de cuidado personal (de <i>Pharmaceuticals and Personal-Care Products</i>)
PDMS	polidimetilsiloxano
PLE	extracción con líquidos presurizados (de <i>Pressurized Liquid Extraction</i>)
POM	materia orgánica particulada (de <i>particulate organic matter</i>)
POP	contaminantes orgánicos persistentes (de <i>Persistent Organic Pollutants</i>)
PRC	compuestos de referencia de rendimiento (de <i>Performance Reference Compounds</i>)
PSD	dispositivo de muestreo pasivo (de <i>Passive Sampling Device</i>)
PTFE	politetrafluoroetileno o teflón
Q	cuadrupolo (de <i>Quadrupole</i>)
QIT-MS/MS	espectrometría de masa en tándem con cuadrupolo y trampa de iones (de <i>Quadrupol – Ion Trap</i>)
REACH	Reglamento de Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Sustancias Químicas (de <i>Registration Evaluation Authorization of Chemicals</i>)
R _s	tasa de muestreo (de <i>Sampling Rate</i>)
SBSE	extracción por sorción en barra agitadora (de <i>Stir Bar Sorptive Extraction</i>)
SD	desviación estándar (<i>Standard Deviation</i>)
SFE	extracción con fluidos supercríticos (de <i>Supercritical Fluid Extraction</i>)
SIM	monitorización selectiva de iones (de <i>Selected Ion Monitoring</i>)
SOM	materia orgánica sedimentaria (de <i>Sedimentary Organic Matter</i>)
SPE	extracción en fase sólida (de <i>Solid Phase Extraction</i>)

SPLE	extracción con líquidos presurizados selectiva (de <i>Selective Pressurized Liquid Extraction</i>)
SPM	materia particulada en suspensión (de <i>Suspended Particulated Matter</i>)
SPMD	dispositivos de membrana semipermeable (de <i>Semipermeable Membrane Devices</i>)
SPME	microextracción en fase sólida (de <i>Solid Phase Microextraction</i>)
SR	silicona (de <i>Silicone Rubber</i>)
TOC	carbono orgánico total (de <i>Total Organic Carbon</i>)
TWA	promedio de la concentración respecto al tiempo (de <i>Time-Weighted Average</i>)
UAE	extracción asistida con ultrasonidos (de <i>Ultrasound Assisted Extraction</i>)
UNEP	Programa Medioambiental de las Naciones Unidas (de <i>United Nations Environment Programme</i>)
USEPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (de <i>United States Environmental Protection Agency</i>)
WFD	Directiva Marco del Agua (de <i>Water Framework Directive</i>)
WHO	Organización Mundial de la Salud (de <i>World Health Organization</i>)
ww	peso fresco (de <i>Wet Weight</i>)



Introducción general

■ 1.1. Problemática de la contaminación ambiental

Hace ya más de cincuenta años que Rachel Carson auguraba la llegada de una “Primavera silenciosa” (Carson, 1962) como consecuencia del daño que el dicloro difenil tricloroetano (DDT), hasta entonces considerado pesticida milagro, estaba provocando sobre las poblaciones de aves. Se encendía así la alarma pública sobre los efectos colaterales que el uso extensivo de determinadas sustancias antropogénicas podía tener sobre la salud humana y medioambiental. Seis años después, el uso de este pesticida comenzaba a prohibirse en muchos países (Cieleszky & Soós, 1975). Hoy, cuando todavía tenemos que lidiar con el DDT que en aquel momento se diseminó por todo el mundo, nuevas voces de alarma anuncian una primavera sin flores causada por pesticidas de nueva generación como los neonicotinoides (Henry *et al.*, 2012). La polémica generada en torno al libro de Carson y la posterior prohibición del DDT es sólo un ejemplo —aunque, seguramente, el más representativo— de la controversia entre beneficios y costes que había de acompañar al crecimiento industrial y del estado de bienestar de las últimas décadas. Muchas de las sustancias químicas que hemos desarrollado para defendernos de enfermedades, incrementar la producción agrícola y ganadera y mejorar nuestra calidad de vida son en sí mismas una amenaza para la salud medioambiental y, finalmente, para la salud humana. Si bien nuestra capacidad para comprender los efectos dañinos de los contaminantes y detectar su presencia ha aumentado mucho desde que la contaminación ambiental comenzó a ser un tema de investigación en los años sesenta y setenta, nuestra capacidad para sintetizar sustancias nuevas no le ha ido a la zaga. No sólo la cantidad y la diversidad de sustancias introducidas en el ambiente se ha incrementado significativamente, sino también la dispersión de las fuentes de contaminación —tal es el caso de la entrada de sustancias derivadas de actividades de consumo doméstico (Daughton, 2004)—. Podría decirse, pues, que el riesgo químico derivado de la actividad humana no se ha eliminado, sino que simplemente ha cambiado.

Por otra parte, teniendo en cuenta que el 70% de la superficie del planeta es agua y que gran parte de la vida humana está ligada a su uso, no es de extrañar que buena parte de esos xenobióticos termine en los sistemas acuáticos, ya sea a través de rutas directas cuando el hombre convierte las aguas usadas en vehículo de eliminación (p. ej. las descargas o vertidos en ríos y mares) o vía rutas indirectas (p. ej., la percolación de vertidos a través del suelo o la deposición atmosférica de los contaminantes transportados por el aire). La contaminación creciente de las masas de agua es uno de los problemas ambientales clave a que se enfrenta la humanidad. Son obvias las limitaciones que esta contaminación supone para la obtención de agua potable y que se suman a la escasez provocada por el cambio climático y la creciente desertización del planeta. Pero además, a ellas hay que añadir los riesgos para la salud a que dan lugar otras rutas de exposición a los contaminantes acuáticos, especialmente la contaminación de fuentes de comida como el pescado o los productos agrícolas.

Así las cosas, uno de los mayores retos de la química del siglo XXI, si no el principal, es encontrar la sostenibilidad entre los beneficios y los riesgos sobre la salud humana y medioambiental del uso de sustancias químicas. Dentro de este marco, gestionar el ciclo del agua de una manera sustentable es esencial. Ahora bien, establecer los límites de esos riesgos requiere conocerlos. Discernir cuándo la presencia de contaminantes implica un peligro inaceptable y qué debería recibir la mayor prioridad se ha convertido en una tarea clave a fin de alcanzar ese reto.

Para ello, se requieren herramientas de vigilancia de los contaminantes en el medio ambiente que proporcionen medidas fácilmente interpretables en términos de riesgo. Esta necesidad ha sido el punto de partida para el trabajo presentado en esta tesis.

■ 1.2. Distribución, exposición y biodisponibilidad

La definición de contaminantes prioritarios o de situaciones que deben someterse a vigilancia se basan en cálculos que tratan de cuantificar el riesgo que la presencia de un producto químico en el medio ambiente puede suponer para el ecosistema y, en última instancia, para la salud humana (Guillén *et al.*, 2012). Este efecto dañino potencial que un determinado contaminante tiene en una situación dada surge de la combinación de dos factores: sus propiedades tóxicas y la exposición ambiental al mismo. El riesgo se calcula, por tanto, a partir de la comparación entre ambos componentes (Arnot & Mackay, 2008) e implica una serie de procedimientos mediante los cuales se les pueda asignar un valor, ya sea con mediciones experimentales o bien mediante modelos predictivos cuando lo primero no es posible. En el caso del riesgo ecotoxicológico de sustancias químicas, la determinación de la exposición supone conocer las concentraciones esperadas en todos los compartimentos ambientales relevantes (agua, suelo, sedimento, aire) y la determinación de los efectos consiste en determinar las dosis y las concentraciones ambientales que parecen no producir daños sobre el ecosistema en consideración (Figura 1).

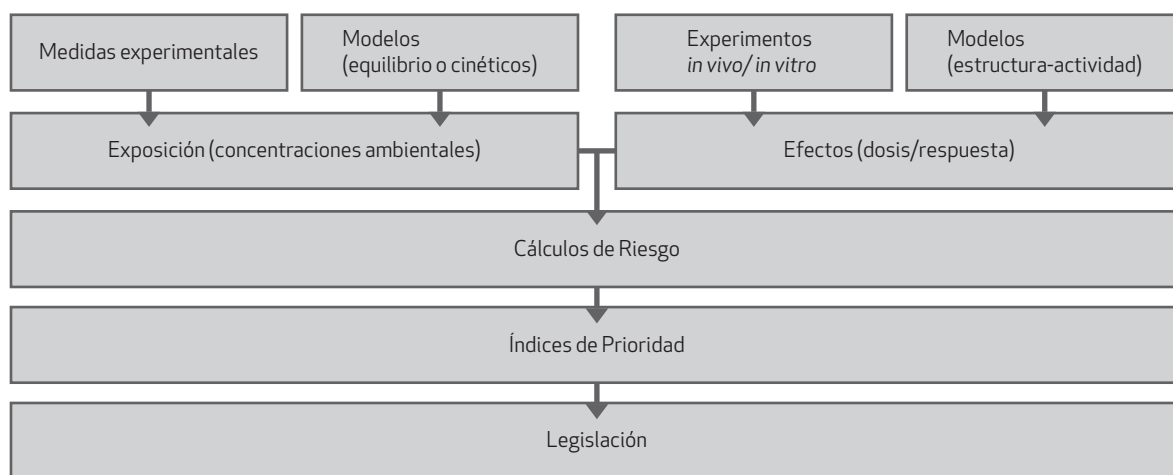


Figura 1. Etapas en el proceso de evaluación del riesgo ambiental que lleva a la priorización de productos químicos

1.2.1. Distribución de los contaminantes en el medio acuático

Para que una sustancia con propiedades tóxicas pueda causar un daño es necesario que pueda llegar a algún sitio donde sea capaz de provocar una respuesta biológica. Por tanto, ha de poder ser asimilada por un organismo vivo. La exposición, que suele expresarse en términos de concentración, no depende solo de la cantidad de contaminante liberada al medio, sino de cómo este se distribuye espacial y temporalmente entre los distintos compartimentos que lo conforman y que, en definitiva, van a determinar qué cantidad de ese compuesto es accesible a los organismos vivos.

Una vez que alcanzan el medio acuático, los contaminantes pueden verse sometidos a distintos procesos que vienen determinados tanto por las propiedades físico-químicas y reactividad de la propia molécula, como por la naturaleza y características del ambiente abiótico en el que se encuentra y las de los seres vivos que puedan entrar en contacto con él (Katsoyiannis & Samara, 2007; Valsaraj & Thibodeaux, 2010). A su vez, todos estos procesos van a dar lugar a un determinado perfil de distribución entre los distintos compartimentos ambientales. Por ello, la posibilidad de que se den unos u otros fenómenos debe ser considerada para la determinación de las rutas de exposición que pueden llevar a una determinada sustancia a alcanzar un lugar de respuesta biológica y ejercer algún tipo de efecto o acumularse. La Figura 2 muestra de manera esquemática los principales procesos que pueden llevar a un contaminante hasta donde pueda ejercer un efecto en un ser vivo: el intercambio de un producto químico entre las partículas y la fase disuelta del medio (A), el transporte de la sustancia hasta que entra en contacto con un ser vivo (B), su asimilación a través de una membrana celular (C), la circulación una vez dentro del organismo hasta un lugar donde pueda ejercer un efecto tóxico (D) y la ingesta por parte de organismos de nivel trófico superior (E).

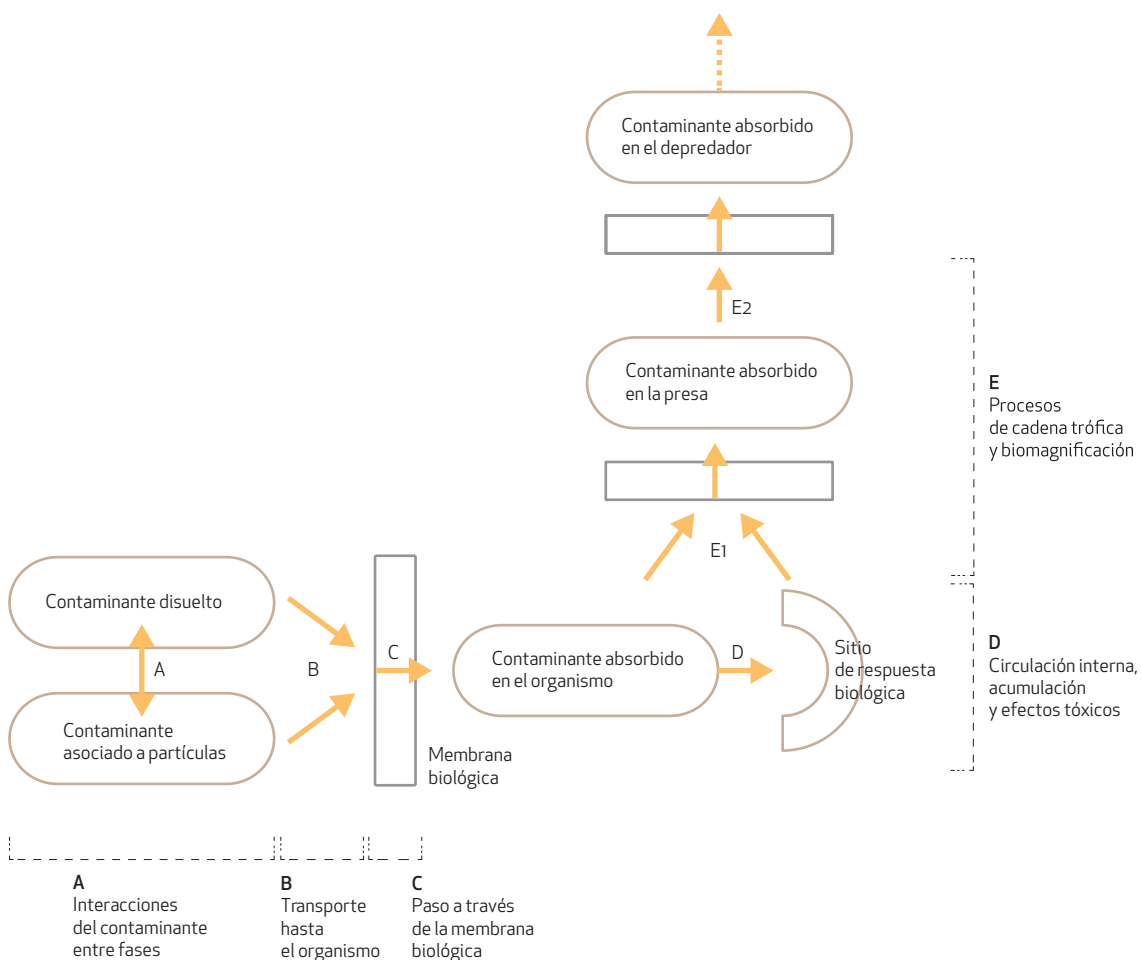


Figura 2. Procesos que pueden llevar a una determinada sustancia presente en el ambiente a alcanzar el sitio de respuesta biológica (modificada de NRC, 2003).

1.2.1.1. Interacciones entre el contaminante y los sólidos del medio

En el medio acuático existe una variedad de sólidos provenientes tanto de la erosión de material geológico como de procesos biológicos que, dependiendo de su masa y del hidrodinamismo imperante, se mantienen como materia particulada en suspensión (SPM, de *suspended particulated matter*) o ceden a la gravedad, de manera que terminan depositándose y forman el lecho de sedimento. El lecho está completamente saturado con agua intersticial o agua de poro, que forma cerca del 50% de su volumen (Ingersoll, 1995). Así, tanto en la columna de agua como en el sedimento se puede hablar de una fase disuelta y una fase particulada, incluyendo en esta última a la fase coloidal (partículas menores de 1 μm , que no llegan a depositarse por gravedad) (Burgess, 2012). El agua en movimiento transporta la materia particulada, llevando más lejos las partículas más finas y ligeras y dando lugar a patrones de sedimentación característicos de la naturaleza de la masa de agua (Mudroch & MacKnight, 1994). Generalmente, la capa superior del sedimento, hasta unos diez centímetros, es biológicamente activa y actúa como un hábitat para microbios y organismos más complejos que viven y se alimentan del fondo (Rand, 1995).

En este escenario, los contaminantes se distribuyen entre la fase disuelta y la fase particulada en función de las interacciones físicas y químicas que tengan lugar (etapa A en la Figura 2). En el caso de los contaminantes orgánicos, es generalmente reconocido que esta partición está controlada en gran medida por la interacción del compuesto con la materia orgánica (OM, de *organic matter*). Los compuestos no iónicos hidrofóbicos tienden a unirse a las partes aromáticas y los microporos hidrofóbicos de la materia orgánica que haya en el ambiente, ya sea disuelta (DOM, de *dissolved organic matter*), particulada o sedimentaria (POM o SOM, de *particulate organic matter* y *sedimentary organic matter*, respectivamente). Por ello, su distribución entre las fases acuosa y particulada está directamente relacionada con el contenido de carbono orgánico en cada una de ellas (Gobas, 1994; NRC, 2003; Ehlers & Loibner, 2006).

Aunque la materia orgánica está presente en todos los sistemas acuáticos naturales, su concentración varía enormemente de un lugar a otro dependiendo de la geoquímica, la época del año, el tipo de agua, etc. (Akkanen & Kukkonen, 2001). Se forma principalmente a partir de material detrítico de plantas y animales o de sus productos de degradación, incluyendo biopolímeros parcialmente degradados o reconstituidos, lipoproteínas, aminoácidos, lípidos y sustancias húmicas. Los contaminantes se asocian con esta fase amorfa por un proceso de absorción lineal o “partición en solvente” (Chiou *et al.*, 1983). La extensión de este comportamiento se ha descrito como un equilibrio producto de dos parámetros: el contenido de carbono orgánico del sedimento y un coeficiente de partición con el carbono orgánico o con la materia orgánica (K_{oc} o K_{om} , respectivamente), esencialmente constante para muchos sedimentos y suelos (Schwarzenbach, 1993) y específico del compuesto (ver Figura 6). Así, para unos compuestos poco polares, el K_{oc} puede ser correlacionado con las propiedades fisicoquímicas de la molécula, como con el coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow}) o con la inversa de la solubilidad en agua (p. ej., Karickhoff & Morris, (1985)).

Sin embargo, además de esa fase amorfa, suele existir también una fase compuesta por materia orgánica que ha sufrido alteración geológica y térmica dando lugar a formas más condensadas. Estos materiales, que generalmente se refieren como “geosorbentes carbonosos” (CG, de *carbonaceous geosorbents*), incluyen formas tales como carbón, querógeno, hollín, carbón vegetal y

carbono negro (BC, de *black carbon*). En general, son formas más estructuradas, con una mayor relación H/O y una mayor aromaticidad y presentan un comportamiento de sorción no lineal, con coeficientes K_{oc} de 50 a 250 veces mayores que los correspondientes observados típicamente para la partición con materia orgánica amorfa (Karickhoff *et al.*, 1979; Grathwohl, 1990; Xing & Pignatello, 1997; Bucheli & Gustafsson, 2000; Jonker & Koelmans, 2002; Pehkonen *et al.*, 2010). Así, aunque las sustancias húmicas suelen ser la forma dominante de material carbonoso en suelos y sedimentos modernos, tienen mucha menor capacidad de sorción de los contaminantes orgánicos que las formas de carbono condensadas, que parecen dominar la retención de los estos compuestos en algunos sistemas (Chiou *et al.*, 2000; Karapanagioti *et al.*, 2000).

Para explicar estas dos funcionalidades empíricas que contribuyen a la retención total de los compuestos por parte de la materia orgánica se han propuesto modelos de dos dominios, que dividen conceptualmente el material carbonoso en una fase de sorción de equilibrio y una fase de no-equilibrio, aunque los mecanismos subyacentes y los modelos específicos continúan siendo objeto de debate (Allen-King *et al.*, 2002) (Figura 3).

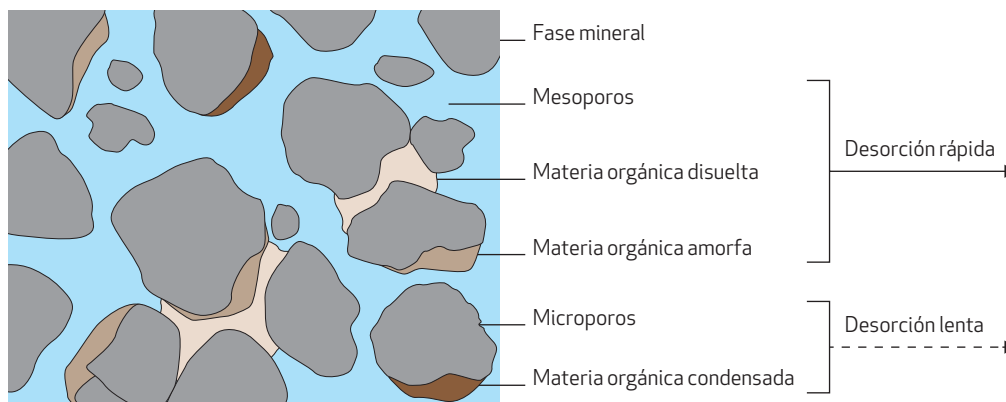


Figura 3. Modelo conceptual de los dominios de geosorbentes en el medio acuático.

Dependiendo de las propiedades del compuesto y de las condiciones ambientales como la temperatura, la humedad, el pH y la dureza del agua, y en función de los cambios que se produzcan en ellas, puede haber un intercambio significativo entre las fases disueltas y particulada (Akkanen & Kukkonen, 2001). De esta manera, en función de la fuerza de las uniones que se establezcan, se pueden distinguir tres fracciones entre las que una sustancia química se distribuye en el medio acuático: una fracción libremente disuelta, una fracción unida reversiblemente a DOM o POM, que, con mayor o menor facilidad, puede desorberse bajo ciertas condiciones ambientales y una fracción resistente unida irreversiblemente a POM (probablemente asociada a CG). Los estudios de desorción han permitido comprobar que la magnitud de cada una de estas fracciones es muy variable entre sedimentos y para cada contaminante. Además, se ha podido observar que la importancia de las fracciones de asociación irreversible o casi irreversible se hace mayor con el tiempo, efecto al que se suele llamar envejecimiento o *ageing* (Figura 4). Este aumento no es lineal sino que puede ocurrir que ya en los primeros días se forme una fracción de desorción lenta importante y que durante el tiempo posterior de contacto entre contaminante y sedimento no aumente mucho (Kan *et al.*, 1994; Semple *et al.*, 2004; Reichenberg & Mayer, 2006).

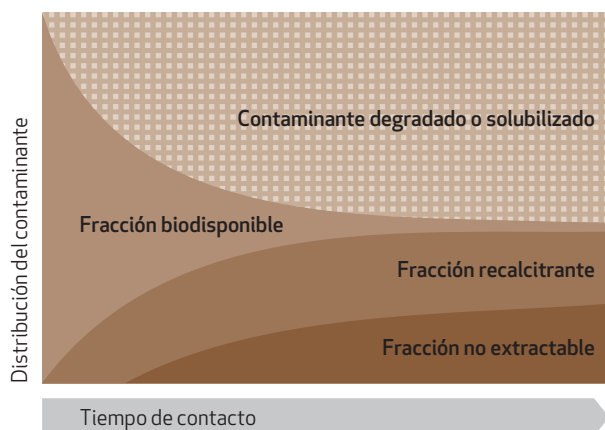


Figura 4. Cambios en la distribución de los compuestos orgánicos con el tiempo de contacto entre compuesto y sedimento (modificada de Semple *et al.*, 2003).

En cualquier caso, la distribución de los contaminantes entre esas fracciones depende también de sus propiedades físico-químicas, como la polaridad y la lipofilia, lo que es expresado, p. ej., por los valores del K_{oc} o el coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow}). En general, se asume que una mayor lipofilia favorece la sorción de los compuestos a la materia orgánica (Chin *et al.*, 1990). No obstante, cuando se comparan productos de diferentes clases químicas, hay otras propiedades que entran en juego. Así, p. ej., parece que la interacción con la DOM de los compuestos halogenados, tales como los bifenilos policlorados (PCB, de *Polychlorinated Biphenyls*), es menor y más débil que la de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH, de *Polyaromatic Hydrocarbons*) de menor lipofilia, al tiempo que la posición de los átomos de cloro en los PCB también juega un papel importante en la retención y la biodisponibilidad (Uhle *et al.*, 1999).

1.2.1.2. Transporte hacia el receptor

Ya sea disueltos o asociados a partículas, generalmente, en el medio acuático los contaminantes se ven sometidos a distintos procesos de transporte antes de entrar en contacto con un receptor biológico (etapa B en la Figura 2). Ambos tipos de transporte pueden llevar contaminantes a la proximidad de receptores potenciales o bien alejarlos por lo que ambos constituyen un componente importante de la biodisponibilidad del que depende en gran medida la exposición de los organismos.

No obstante, la fuerte tendencia de los contaminantes hidrófobos a acumularse en materiales particulados hace que el destino de esos contaminantes esté estrechamente relacionado con el transporte de sedimento (Schwarzbauer, 2006). El compuesto unido a partículas o el incorporado a la materia biológica en la columna de agua, con el tiempo y en función del régimen hidrológico, tiende a asentarse con ella en el fondo, llegando a ser incorporado en el sedimento, ya sea unido a material orgánico o inorgánico o disuelto en el agua intersticial. Este proceso supone una transferencia neta de contaminantes al fondo, donde pueden ser enterrados bajo capas de sedimento fresco y persistir durante décadas alejados de la biota (Doody, 2001). En un momento dado, los sedimentos pueden convertirse en fuentes secundarias de contaminación si

se produce una resuspensión de los contaminantes a la columna de agua, ya sea de forma natural, por perturbaciones abióticas o por la acción de organismos bentónicos (“bioturbación”) o por la actividad humana, tal como frecuentemente ocurre en la actividad de dragado (Sprovieri *et al.*, 2007; Josefsson *et al.*, 2010).

1.2.1.3. Asimilación a través de la membrana celular

Tanto los procesos de transporte de contaminantes que se acaban de comentar como el propio movimiento de un organismo pueden llevar al contacto entre ambos, ya sea externamente a través del entorno (en el caso de los animales vía contacto dérmico), o en el lumen del intestino después de la ingesta de comida, incluida la de contaminantes unidos a partículas (Knezovich *et al.*, 1987). Salvo algunos casos en que el contaminante es capaz de ejercer un efecto tóxico sobre la propia membrana biológica que separa el citoplasma del ambiente exterior y dañar un organismo simplemente entrando en contacto con él (p. ej. los agentes cáusticos o los antibióticos β -lactámicos), en general, la mayor parte de las sustancias químicas ejercen sus efectos biológicos desde dentro de las células y los organismos, por lo que necesitan atravesar esta membrana para llegar a producir algún efecto nocivo (etapa C en la Figura 2).

Los mecanismos de entrada, así como los factores que pueden facilitarla o impedirla, varían dependiendo del tipo de organismo receptor. Como norma general, el contaminante ha de estar disuelto para que se produzca la absorción a través de la membrana. Desde hace años se sabe que la capacidad de los seres vivos para asimilar un compuesto químico es mucho mayor cuando éste está libremente disuelto y, por tanto, la unión de los contaminantes a la materia orgánica disuelta o particulada presente en las aguas ambientales usualmente los hace menos biodegradables y también menos tóxicos para la biota (Ogram *et al.*, 1985). No obstante, por lo general, al menos una parte de la sustancia química unida a la materia orgánica sólida o disuelta también puede ser asimilada. Muchas veces los propios organismos pueden intervenir favoreciendo la desorción, como en el caso de la ingestión de partículas de sedimento, sobre las que actúan los fluidos del tracto digestivo (Voparil & Mayer, 2000).

1.2.1.4. Acumulación y Efectos

Una vez que se hallan dentro de un organismo, los compuestos pueden interaccionar con uno o más constituyentes celulares y alterar la funcionalidad biológica causando un efecto tóxico (etapa D en la Figura 2). La magnitud y la naturaleza de este efecto es determinada en parte por la forma y concentración en que el contaminante alcanza el receptor sensible al mismo. Si la concentración del compuesto en el sitio activo es demasiado baja, o si el compuesto ha sido transformado en una forma que ya no puede interaccionar con el objetivo, no se observará ningún impacto. Por otra parte, la exposición puede llevar a alcanzar concentraciones suficientemente altas como para ser letales. Uno de los mecanismos mediante los cuales los contaminantes orgánicos pueden llegar a causar efectos adversos que han acaparado más atención en la última década es la disrupción endocrina, por el riesgo que supone incluso a bajas concentraciones (Petrovic *et al.*, 2004; Petrovic *et al.*, 2013; Sosa-Ferrera *et al.*, 2013). La exposición a sustancias

químicas con capacidad de alterar el funcionamiento normal del sistema hormonal en animales se ha ligado al incremento de determinados tipos de neoplasias, malformaciones y disfunciones del aparato reproductor, algunas formas de neurotoxicidad y a fallos de la respuesta inmune (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

No obstante, el destino de una sustancia química en el organismo puede ser complejo. Los propios organismos pueden transformar el compuesto químico en metabolitos que pueden ser más o menos dañinos que la molécula original, almacenarlo en tejidos o simplemente excretarlo. De manera predominante, los contaminantes orgánicos hidrofóbicos son acumulados en las reservas lipídicas de los organismos llegando a alcanzar concentraciones mucho mayores que las concentraciones en el ambiente, tanto cuando el compuesto es absorbido directamente desde el agua circundante a través de la piel y la pared del cuerpo (“bioconcentración”) como cuando se toma a partir de los alimentos o el agua ingerida a través de la paredes del tracto digestivo (se habla entonces de “bioacumulación”). Además, a medida que se asciende en la cadena alimentaria, la concentración interna de contaminante se multiplica en cada nivel trófico sucesivo (“biomagnificación”) (etapa E en la Figura 2). La acumulación de los contaminantes hidrofóbicos en la cadena trófica acuática contribuye, por tanto, a los efectos adversos tanto en los organismos acuáticos como en sus depredadores. La Figura 5 muestra un ejemplo de biomagnificación del DDT en la cadena trófica del lago Kariba, Zimbabwe, donde este pesticida es utilizado para el control de la mosca tsetse. De las concentraciones mostradas para cada compartimento se desprende una importante bioconcentración desde el agua y, en menor grado, desde el sedimento, así como la existencia de biomagnificación de herbívoros a carnívoros superiores (Berg *et al.*, 1992).

Estos procesos se han modelado utilizando coeficientes que describen la capacidad de acumulación de un determinado contaminante por parte de un ser vivo. Así, el factor de bioconcentración (BCF, de *bioconcentration factor*) equivale a la relación en estado estacionario entre las concentraciones del compuesto en un organismo y en el medio circundante y el factor de bioacumulación (BAF, de *bioaccumulation factor*) relaciona la concentración del compuesto en el organismo y en su comida. No obstante, cuando se utilizan medidas de concentraciones para calcular estos coeficientes, no es posible diferenciar entre rutas de exposición y, por tanto, cubren tanto la bioconcentración como la bioacumulación, en el caso de que ambas ocurran. Para los compuestos orgánicos lipofílicos, con tendencia a acumularse tanto en biota como en sedimentos, se suele hablar también del factor de acumulación biota-sedimento (BSAF, de *biota-sediment accumulation factor*), que generalmente se normaliza al contenido lipídico del organismo y el contenido de carbono orgánico del sedimento, más comparable entre diferentes sedimentos, especies y condiciones. Por último, el factor de biomagnificación o BMF (de *biomagnification factor*) describe la relación entre la concentración del organismo y la de su antecesor en la cadena trófica del que se alimenta.

Los modelos de equilibrio como la teoría de partición en el equilibrio (Di Toro *et al.*, 1991) utilizan estos factores para modelar la distribución de contaminantes en el medio y permiten predecir la acumulación biológica a partir de la concentración en el sedimento o el agua (Figura 6). Sin embargo, a medida que se ha ido viendo la importancia de los procesos de no equilibrio han comenzado a tomar relevancia los modelados cinéticos. Como se comentó en el apartado 1.2.1.1, la presencia de distintas fracciones dentro de la materia orgánica presente en el ambiente y el carácter dual de la desorción de los contaminantes unidos a ella hace que los procedimientos

de normalización simples al contenido en carbono orgánico no sean suficientes para describir la retención de los contaminantes por parte de las fases sólidas como el sedimento (Pignatello & Xing, 1996; La Guardia *et al.*, 2012). Factores tales como el contenido o el tipo de carbono orgánico, la temperatura, la concentración del contaminante, su polaridad o el tiempo de envejecimiento del contaminante en el sedimento influyen en su distribución entre las distintas fracciones de la materia particulada y, por tanto, la bioacumulación y la toxicidad.

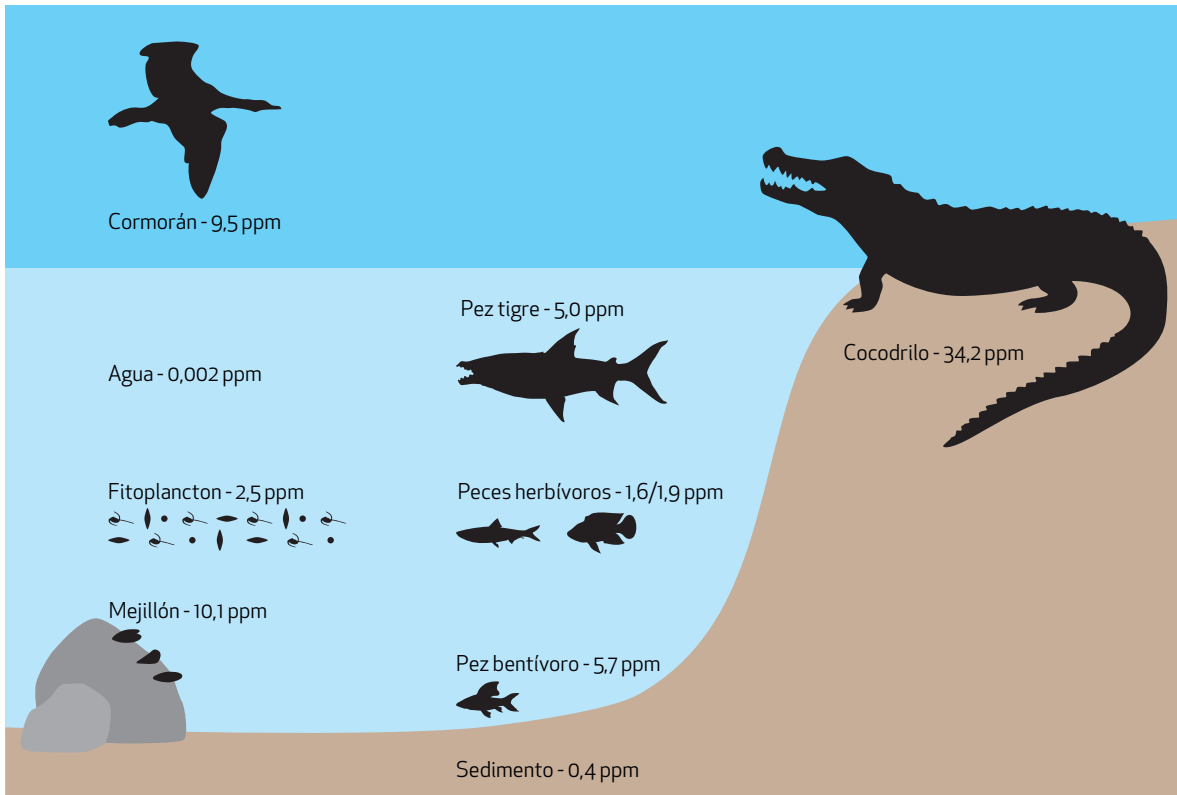


Figura 5. Biomagnificación del DDT en la cadena trófica del lago Kariba, Zimbabwe (datos obtenidos de Berg *et al.*, 1992).

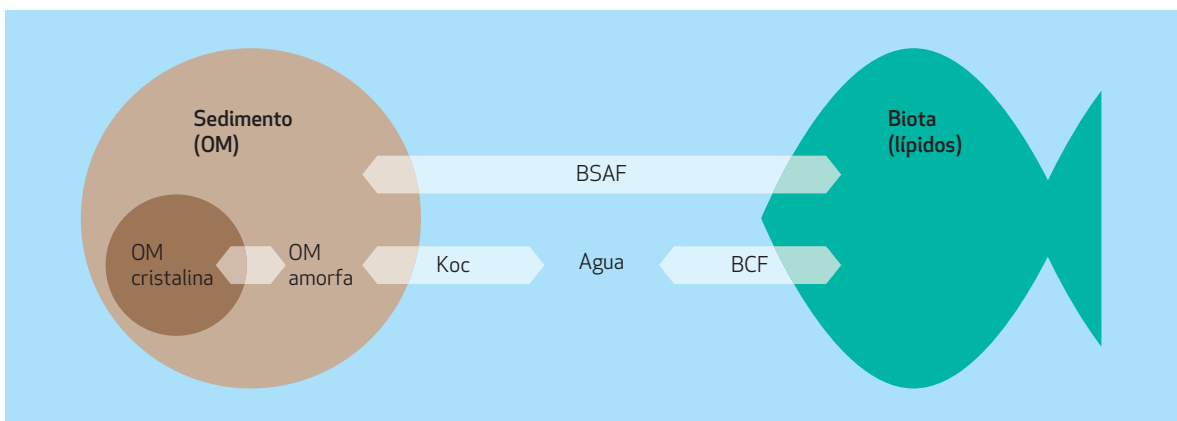


Figura 6. Equilibrio entre el sedimento, el agua y los organismos con la consideración de distintos compartimentos de desorción dentro del sedimento, partición entre el sedimento y el agua (Koc) y bioconcentración (BCF)

1.2.1.5. Transformación

Además de los procesos esquematizados en la Figura 2, hay que tener en cuenta que a lo largo de todo el camino desde su llegada al medio hasta alcanzar un sitio de respuesta biológica en un animal o una planta determinado, los contaminantes pueden sufrir una transformación de su forma química por medio de varios fenómenos químicos y bioquímicos que pueden afectar a su biodisponibilidad y su toxicidad. Estos incluyen tanto las reacciones provocadas por la interacción con el medio abiótico (oxidación-reducción, hidrólisis, reacciones ácido-base, transformación fotoquímica), como las provocadas por los seres vivos, sea biotransformación por parte de microorganismos o la transformación metabólica en organismos superiores. La posibilidad de que se den estos procesos difiere según el contaminante esté en forma disuelta o asociado a partículas.

1.2.2. Exposición y biodisponibilidad

La forma y concentración con que el compuesto llega finalmente al lugar donde es activo y por tanto, la magnitud de sus efectos, depende, por una parte, de todos los procesos que hemos comentado anteriormente y que determinan la exposición –interacción con sólidos, transporte, transformación, entrada— y, por otra, de los procesos a que pueda verse sometida la molécula de contaminante dentro del organismo una vez que ha conseguido entrar.

El término “biodisponibilidad”, utilizado anteriormente en otros ámbitos científicos como farmacología, toxicología, agronomía o nutrición e introducido en el campo de la química ambiental en las últimas dos décadas, está íntimamente relacionado con la exposición y suele referirse a la facilidad con que un contaminante puede llegar a ser asimilado por un ser vivo. Por tanto, este concepto, que en otras disciplinas hace referencia a las tasas de absorción o asimilación de una determinada sustancia dentro las células o el cuerpo de organismos vivos, implica aquí, además de la absorción, cuestiones contextuales tales como la solubilidad, la transferencia de masa, la movilidad y la reactividad, que determinan la exposición real a dicho contaminante. Esta idea queda recogida en un informe elaborado en 2003 por un comité de expertos en biodisponibilidad de contaminantes en suelos y sedimentos a petición del Consejo Nacional de Investigaciones de Estados Unidos (NRC, de *National Research Council*), que se ha convertido en un texto de referencia sobre la materia (NRC, 2003). En él se definen de manera general como “procesos de biodisponibilidad” todas las interacciones físicas, químicas y biológicas individuales que modifican y determinan la exposición de plantas y animales a los productos químicos asociados a suelos y sedimentos, que incluyen las etapas de A a C de la Figura 2.

La interacción con la materia orgánica y la distribución entre las fases disuelta y particulada es quizá el fenómeno más influyente sobre la exposición ambiental a los contaminantes en el medio acuático, ya que, como se ha visto en el apartado anterior (1.1.1), condiciona todos los demás procesos que el contaminante puede llegar a experimentar, como el transporte o la degradación y, por tanto, gobierna su destino final. Este paso suele ser uno de los factores limitantes en la cadena de procesos esquematizada en la Figura 2, por lo que la DOM y la POM tienen un papel clave en el control de la biodisponibilidad de los contaminantes y con frecuencia la solubilidad se asume como un predictor de la biodisponibilidad. En unas condiciones ambientales dadas, la fracción de un producto químico orgánico que está disuelta libremente en el agua, a

diferencia del que está unido a la materia disuelta o sólida, es la que está disponible de una manera más inmediata para la partición con la biota tanto a partir de agua ingerida como a través de las superficies exteriores de los organismos, por lo que, a menudo, se considera *biodisponible*. Por otro lado, la fracción de contaminante asociada a la materia orgánica de forma reversible puede llegar a ser disponible para la biota bajo ciertas condiciones ambientales (potencialmente biodisponible). La fuerza de la asociación determinará en qué grado estas interacciones pueden deshacerse, aumentando la biodisponibilidad del contaminante. En cambio, la fracción de un contaminante unida irreversiblemente no estará disponible para la biota bajo ninguna condición ambiental y, por tanto, tiene una importancia mucho menor a la hora de evaluar el riesgo. Una mayor proporción de estas dos últimas fracciones se ve reflejada, p. ej., en una menor biodegradación microbiana de los contaminantes y un mayor BSAF.

Por otra parte, los fenómenos que llevan a alcanzar el lugar de la respuesta una vez que el contaminante se ha absorbido (etapas D y E en la Figura 2) son independientes del medio abiótico que rodea al ser vivo y no determinan qué parte del contaminante en el medio está disponible, por lo que no son considerados procesos de biodisponibilidad *per se* (NRC, 2003) o se encuadran como biodisponibilidad toxicológica, distinguiéndolos de la disponibilidad o la biodisponibilidad ambiental (Lanno *et al.*, 2004; Harmsen, 2007; Standardization, 2008). No obstante, la bioacumulación contribuye a los efectos adversos tanto en los propios organismos como en sus depredadores. Por ello, ha de tenerse en cuenta a la hora de calcular la exposición de los organismos superiores en la cadena trófica y, por tanto, constituye de hecho un proceso de biodisponibilidad en estos niveles. Además, los efectos de la exposición a contaminantes, ya sea acumulación u otros, son indicadores de la biodisponibilidad del contaminante en el medio, puesto que dependen de ella y, en cualquier caso, la consideración de esos procesos “internos” es crítica para un entendimiento global de las consecuencias sobre la salud de la exposición a contaminantes ambientales.

Los distintos enfoques y terminologías asociadas al concepto de biodisponibilidad en el ámbito de la contaminación ambiental serán explicados en detalle al referirnos a los métodos para su estimación en el apartado 1.4.1.2.

■ 1.3. Priorización de los contaminantes ambientales

Como se comentó al comienzo de esta memoria, el aumento en la producción y uso de sustancias químicas que ha acompañado --muchas veces sin restricciones-- al desarrollo industrial y al estado de bienestar ha incrementado enormemente la cantidad de sustancias antropogénicas liberadas al ambiente hasta el punto de que su presencia es virtualmente ubicua hoy en día. El universo de sustancias químicas a que están expuestos los seres vivos es mayor y más diverso cada día y muchos de esos xenobióticos pueden dar lugar a efectos indeseados sobre los seres vivos.

Históricamente, la preocupación por el impacto ambiental de la contaminación química se ha centrado en ciertos metales y contaminantes orgánicos considerados “prioritarios”. Los compuestos más persistentes y tóxicos, en su mayoría pesticidas o productos químicos industriales de gran volumen, han sido regulados y su producción y uso han sido eliminados gradualmente. Sin embargo, precisamente debido a esa persistencia, esos contaminantes se encuentran aún

hoy en el ambiente en concentraciones importantes (Bodin *et al.*, 2014). Además, algunos de ellos, como los PCB, siguen entrando en el medio ambiente, aun después de su prohibición, procedentes del deshecho de productos en los que se utilizaban estos compuestos en el pasado. En contextos normativos como la Directiva Marco del Agua (WFD, del anglosajón *Water Framework Directive*) y la Directiva Marco sobre la Estrategia Marina (MSFD, *Marine Strategy Framework Directive*) (EEA, 2011; ESF, 2011) se habla de contaminantes históricos o “heredados” (*legacy contaminants*). Por otra parte, en países en vías de desarrollo, los pesticidas organoclorados (p. ej., el lindano, el DDT, el heptacloro o el clordano) siguen utilizándose en el control de artrópodos de importancia veterinaria o médica e incluso son empleados todavía en las prácticas agrícolas. Dentro de los contaminantes orgánicos más estudiados y de presencia más habitual, se pueden nombrar los pesticidas organoclorados (OCP, de *organochlorinated pesticides*, los bifenilos policlorados (PCB, de *polychlorinated biphenyls*) y polibromados (PBB, de *polybrominated biphenyls*), las dioxinas y dibenzofuranos (PCDD, de *polychlorinated dibenzo-p-dioxins* y PCDF, de *polychlorinated dibenzofurans*), los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH, de *polyaromatic hydrocarbons*), los insecticidas organofosforados (clorpirifos, metilparatión y diazinón, entre otros) y piretroides y los herbicidas aromáticos (como el paraquat o la atrazina).

En cualquier caso, esos compuestos constituyen tan solo una parte muy pequeña del universo de xenobióticos a que los organismos pueden verse expuestos. Continuamente se sintetizan nuevas sustancias y --aunque la preocupación por los efectos perjudiciales de los contaminantes y las prohibiciones que ya desde hace décadas existen a nivel local para algunos de ellos ha generado una tendencia hacia el uso de productos pretendidamente menos dañinos—muchas de ellas siguen teniendo efectos perjudiciales. Además, con el tiempo, el desarrollo de la instrumentación analítica y la disminución de los límites de detección (LOD, de *Limit of Detection*) por una parte, y el conocimiento creciente sobre sus efectos toxicológicos por otra, ha atraído la atención sobre compuestos cuya presencia o importancia no había sido reconocida hasta ahora, manteniéndolos al margen de programas de vigilancia y regulaciones. Algunos ejemplos de contaminantes reconocidos más recientemente, y a los que se suele hacer referencia como “compuestos de interés emergente” o “compuestos emergentes” (CEC, de *chemicals of emerging concern*), tienen un origen en multitud de productos de consumo. Entre ellos se incluyen fármacos, drogas recreativas o de abuso y sus metabolitos, productos de cuidado personal (PCPP, de *pharmaceuticals and personal-care products*), retardantes de llama (FR, de *flame retardants*) bromados y organofosforados, compuestos perfluorados (PFC, de *perfluorinated compounds*), así como muchos pesticidas polares junto con sus productos de transformación (Petrovic *et al.*, 2004; Farré *et al.*, 2008; Söderström *et al.*, 2009; Eggen *et al.*, 2010; Richardson & Ternes, 2014).

En conjunto, los contaminantes orgánicos “históricos” y “emergentes” abarcan un rango de propiedades físico-químicas y de persistencia en el ambiente muy amplio. Algunos son degradados o transformados en formas no tóxicas o menos tóxicas, de manera que sus posibles efectos adversos se ven atenuados de manera natural (Thornton *et al.*, 2001). Sin embargo, muchos persisten en el ecosistema por largos periodos de tiempo y se acumulan en los seres vivos. Los contaminantes orgánicos persistentes (POP, de *persistent organic pollutants*), tienen una particular combinación de propiedades físicas y químicas que los hacen poco degradables y hacen que, una vez que han sido liberados en el medio ambiente, permanezcan intactos durante periodos excepcionalmente largos —meses e incluso años—. Esto en ocasiones les permite ser transporta-

dos largas distancias por aire y agua y ser distribuidos por todo el globo, incluso en áreas remotas lejos de la fuente original de aplicación (Wania & Mackay, 1996). Además, estos compuestos entran en la cadena trófica por bioconcentración y bioacumulación y se biomagnifican en cada nivel trófico, lo que ejerce un efecto en cascada sobre la amplia diversidad biológica acuática y terrestre, incluyendo el ser humano. La toxicidad sutil y a largo plazo que presentan estos contaminantes y su acumulación en los tejidos grasos de los organismos vivos es motivo de especial preocupación, ya que incluso cuando las concentraciones ambientales son bajas pueden causar daños en el sistema nervioso, enfermedades del sistema inmunológico, desórdenes reproductivos o de desarrollo o cánceres (Fuerhacker, 2009; Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

De hecho, junto con la toxicidad, las características de persistencia y bioacumulación han sido las que tradicionalmente más han preocupado a la comunidad científica por su impacto potencial a gran escala, tanto geográfica como temporal. Tanto es así que constituyen los principales criterios de priorización de contaminantes incluso cuando no se tiene un conocimiento completo de sus propiedades tóxicas, aplicando el principio de precaución (Gouin, 2010). La historia nos ha enseñado que las sustancias con estas propiedades podrían dar lugar a efectos nocivos que son difíciles de detectar y que, una vez detectados, su presencia puede estar tan extendida en la sociedad y en el medio ambiente que es muy complicado, si no imposible, eliminarla.

La Convención de Estocolmo, adoptada en 2001 bajo el Programa Medioambiental de las Naciones Unidas (UNEP, de *United Nations Environment Programme*) y ratificada en 2004 por 146 países, entre los que se encuentra España, persigue eliminar o minimizar globalmente la producción —ya sea intencionada o inintencionada— y el uso de una lista inicial de doce contaminantes prioritarios conocida como “docena sucia” a la que se han ido añadiendo otros contaminantes en sucesivas enmiendas (Tabla 1) (UNEP, 1995; UNEP, 2001; UNEP, 2009; UNEP, 2013). Dicha convención contiene criterios de clasificación o valores orientativos para identificar potenciales POP que se centran en la persistencia, la bioacumulación y el potencial de ser transportados largas distancias. En ella, la toxicidad no es descrita por criterios de corte definidos, sino que más bien se trata como motivo de preocupación, o como “datos de toxicidad o ecotoxicidad que indiquen el potencial de daño para la salud humana o para el medio ambiente”. Otras legislaciones incluyen criterios de toxicidad claros para las sustancias persistentes, bioacumulables y tóxicas (PBT, de *Persistent, Bioaccumulative and Toxic*), como es el caso de la Ley de Control de Sustancias Tóxicas de Estados Unidos (TSCA, de *Toxic Substances Control Act*) en vigor desde 1976, la Convención para la Protección del Medio Ambiente Marino del Atlántico del Nordeste o Convención OSPAR (su origen está en la fusión de las Convenciones de Oslo y París) de 1998, la Ley Canadiense de Protección Ambiental (CEPA, de *Canadian Environmental Protection Act*) de 1999, la Directiva Marco del Agua (WFD) de 2000 o el reglamento de Registro, evaluación, autorización y restricción de sustancias químicas (REACH, de *Registration Evaluation Authorization of Chemicals*) de la Unión Europea (EU, de *European Union*). No obstante, el REACH, con el que desde 2007 se pretende evaluar y minimizar todos los riesgos derivados de productos químicos producidos y/o usados en la EU, también introduce una categoría de sustancias muy persistentes y bioacumulables (vPvB, de *very Persistent and very Bioaccumulative*), con criterios de persistencia y bioacumulación más estrictos, para las que no se tiene en cuenta criterio alguno de toxicidad (Rorije *et al.*, 2011). La Tabla 2 muestra los criterios recogidos en la Convención de Estocolmo y en el REACH para la priorización de contaminantes.

Tabla 1. POP incluidos en la Convención de Estocolmo (UNEP, 1995; UNEP, 2001; UNEP, 2009; UNEP, 2013; UNEP, 2015)
 [*Acciones a emprender: A= eliminación; B= restringido en producción y uso con excepciones específicas y limitadas que permiten su uso; C= producción inintencionada]

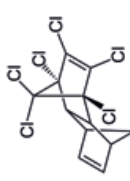
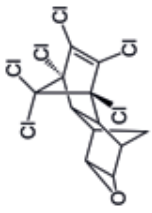
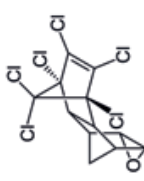

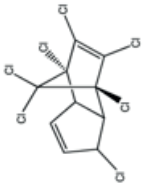
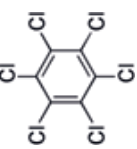
Año de inclusión	Producto	Estructura	Categorías*	Uso	Fines aceptables y/o excepciones específicas
2001	Aldrín		A	Pesticida	- Ectoparasiticida local - Insecticida
	Dieldrín		A	Pesticida	- Actividades agrícolas
	Endrín		A	Pesticida	Ninguna
	Beta-Clordano		A	Pesticida	- Ectoparasiticida local. - Insecticida - Termiticida - Aditivo para adhesivos de contrachapado
	Heptacloro		A	Pesticida	- Termiticida - Tratamiento de la madera - Cajas de cableado subterráneo
	Hexaclorobenceno (HCB)		A y C	Pesticida e industrial	- Intermediario- Solvente en plaguicidas

Tabla 1. (Continuación)

Año de inclusión	Producto	Estructura	Categorías *	Uso	Fines aceptables y/o excepciones específicas
2001	Mirex		A	Pesticida	- Termiticida
	Toxafeno		A	Pesticida	Ninguna
	DDT		B	Pesticida	- Uso en la lucha contra los vectores de enfermedades con arreglo a la parte II del anexo B. - Intermediario en la producción de dicalofo u otros compuestos.
	Bifenilos policlorados (PCB)		A y C	Industrial y subproducto	- Artículos en uso
	Dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDD) y dibenzofuranos policlorados (PCDF)		C	Subproducto	--
2009	Clordecona		A	Pesticida	Ninguna

Tabla 1. (Continuación)

Año de inclusión	Producto	Estructura	Categorías* Uso	Fines aceptables y/o excepciones específicas
2009	Lindano (γ -HCH)		A Pesticida	- Uso farmacéutico en humanos para el control de piojos y sarna como tratamiento de reserva
	alfa-Hexaclorociclohexano (α -HCH)		A Pesticida y subproducto	Ninguna
	beta-Hexaclorociclohexano (β -HCH)		A Pesticida y subproducto	Ninguna
	Hexabromobifenilo		A Industrial	Ninguna
	Tetrabromodifenil eter (tetraBDE) y Pentabromodifenil eter (pentaBDE) (mezcla comercial (Penta-BDE))		A Industrial	- Artículos en uso y su reciclado
	Hexabromodifenil eter (hexaBDE) y heptabromodifenil eter (heptaBDE) (mezcla comercial (OctaBDE))		A Industrial	- Artículos en uso y su reciclado
	Ácido sulfónico de perfluorooctano (PFOS, de Perfluorooctanesulfonic acid) y sus sales y Fluoruro de perfluorooctano sulfonilo (PFOSF, de Perfluorooctanesulfonyl fluoride)		B Industrial	- Creación de imágenes fotográficas - Revestimientos - Fluidos hidráulicos para la aviación - Espumas anti-incendios - Producción química de petróleo - Textiles, cuero, papel y envoltorios - Insecticidas para el control de algunas especies de hormigas y termitas - Otros

Tabla 1. (Continuación)

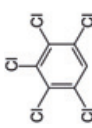
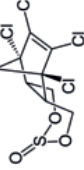

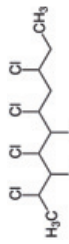
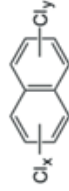
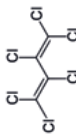
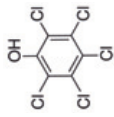
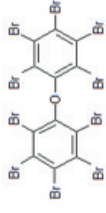
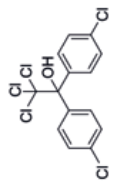
Año de inclusión	Producto	Estructura	Categorías *	Uso	Fines aceptables y/o excepciones específicas
2009	Pentaclorobenzeno		A, C	Pesticida, industrial y subproducto	Ninguna
2011	Endosulfan técnico e isómeros relacionados		A	Pesticida	- Para algunas combinaciones plaga-cultivo
2014	Hexabromociclododecano (HBCD)		A		- Poliestireno expandido y poliestireno extruido en edificios
Actualmente en consideración	Parafinas cloradas de cadena corta (SCCP)		—	—	—
	Naftalenos clorados (PCN)		—	—	—
	Hexaclorobutadieno (HCBd)		—	—	—
	Pentaclorofeno (PCP)		—	—	—
	Deca-BDE		—	—	—
	Dicofol		—	—	—

Tabla 2. Criterios de inclusión para la identificación de productos químicos como persistentes, bioacumulativos y tóxicos (PBT), muy persistentes y muy bioacumulativos (vPvB), o contaminantes orgánicos persistentes (POP) (UNEP, 2001; EU, 2006)

	PBT	vPvB	POP
Persistencia	<ul style="list-style-type: none"> - Aguas marinas: vida media > 60 d - Aguas fluviales o de estuario: vida media > 40 d - Sedimentos marinos: vida media > 180 d - Sedimentos fluviales o de estuario: vida media > 120 d - Suelo: vida media > 120 d 	<ul style="list-style-type: none"> - Aguas marinas, fluviales o de estuario: vida media > 60 d - Sedimentos marinos, fluviales o de estuario: vida media > 180 d - Suelo: vida media > 180 d (suelo) 	<ul style="list-style-type: none"> - Agua: vida media > 60 d - Sedimento: vida media > 180 d.
Bioacumulación	BCF > 2000	BCF > 5000	Alguno de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> - BCF o BAF (especies acuáticas) > 5000 - $\text{Log}K_{ow} > 5$, - Evidencia de que hay otros motivos de preocupación (bioacumulación alta en otras especies no-objetivo, toxicidad o ecotoxicidad altas).
Toxicidad	Alguno de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> - NOEC (organismos marinos y de agua dulce, a largo plazo) < 0.01 mg/L - Carcinogénico (categoría 1 ó 2) - Mutagénico (categoría 1 ó 2) - Tóxico para la reproducción (categoría 1, 2 ó 3) - Otra evidencia de toxicidad crónica. 	Ninguno	Ninguno
Potencial para el transporte a largas distancias	Ninguno	Ninguno	Alguno de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> - Niveles medidos del producto químico en sitios distantes de la fuente de liberación que puedan ser motivo de preocupación - Datos de vigilancia que muestren que el transporte a larga distancia del producto químico en el medio ambiente, con potencial para la transferencia a un medio receptor, puede haber ocurrido por medio del aire, agua o especies migratorias - Propiedades del destino en el medio ambiente y/o resultados de modelos que demuestren que el producto químico tiene un potencial de transporte a larga distancia en el medio ambiente por aire, agua o especies migratorias, con potencial de transferencia a un medio receptor en sitios distantes de las fuentes de su liberación.

K_{ow} : coeficiente de partición octanol-agua; BCF: factor de bioconcentración; BAF: factor de bioacumulación; NOEC: concentración sin efecto observado (de *no observed effect concentration*)

1.3.1. Contaminantes organohalogenados

En general, las sustancias identificadas como persistentes y bioacumulativas se caracterizan por la presencia de enlaces carbono-halógeno, cuya estabilidad dificulta la degradación de la molécula, y por una estructura lipofílica que les permite acumularse en los tejidos grasos de los organismos vivos y ascender en la cadena alimentaria (Neilson, 1985; Jandacek & Tso, 2001). Un grupo de xenobióticos de especial interés que cumple estas características son los contaminantes aromáticos halogenados. De hecho, buena parte de los contaminantes “heredados” que preocupan a la comunidad científica desde hace décadas son compuestos aromáticos clorados. Muchos de ellos fueron producidos a gran escala durante un largo periodo de tiempo para ser utilizados como pesticidas (p. ej. el DDT, o el lindano) o para usos industriales (p. ej. los PCB en equipamientos eléctricos o en fluidos hidráulicos). Otros, como las PCDD y los PCDF, son generados inintencionadamente durante síntesis industriales e incineraciones. En los últimos años han tomado más relevancia sustancias aromáticas sustituidas con otros halógenos, como es el caso de compuestos bromados usados como FR, y algunos productos yodados y fluorados que son empleados en productos farmacéuticos.

Los estudios realizados para el desarrollo de esta tesis se centraron en dos familias de contaminantes pertenecientes a este grupo de compuestos aromáticos halogenados: el histórico pesticida DDT y los difeniléteres polibromados (PBDE, de *Polybrominated Diphenyl Ethers*), serie de compuestos utilizados como FR. En la Figura 7 se puede advertir la diferencia entre las cronologías de ambas familias. El DDT, patentado en 1942, tuvo un uso generalizado en torno a las décadas de los 30-60 (verde en la figura) y comenzó a prohibirse a partir de 1968 (en rojo en la figura). La primera patente de PBDE como retardante de llama, en cambio, data de 1960 y no es hasta 2004 que comienzan las prohibiciones gubernamentales de su uso. La persistencia y la capacidad bioacumulativa de estos dos tipos de sustancias han propiciado su inclusión en la lista de contaminantes regulados a nivel global bajo la convención de Estocolmo. El DDT fue uno de los constituyentes de la “docena sucia” seleccionada por la UNEP en 1995 y que compuso la primera lista de contaminantes regulados en la Convención en 2001. Los PBDE, de uso creciente y considerados emergentes en el momento de realización del trabajo experimental de la tesis, fueron incluidos en la enmienda de 2009 (Tabla 1).

1.3.2. El DDT

El uso del DDT alcanzó su auge durante la II Guerra Mundial en la lucha contra enfermedades transmitidas por artrópodos como los mosquitos vectores de malaria o como los piojos, que actuaban como portadores del tifus (Wheeler, 1946) (Figura 7). La necesidad por parte de la creciente agricultura industrial de controlar las plagas producidas por insectos hizo que su uso intensivo se extendiese rápidamente. En los años setenta, cuando su persistencia, su capacidad de bioacumulación y sus efectos nocivos sobre la salud y el medioambiente se hicieron evidentes, fue prohibido en la mayoría de los países desarrollados (D'Amato *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2008; Ricking & Schwarzbauer, 2012). Para entonces, dos millones de toneladas de este compuesto ya habían sido liberadas al ambiente y habían contaminado el agua, el suelo y el aire a nivel global (USEPA, 2010). Su presencia ubicua, heredada de treinta y cinco años de uso incontrolado,

	DDT	PBDE
	1871	Primera síntesis de mono- y dibromoBDE [Hoffmeister, 1871]
Sintetizado por primera vez [Zeidler, 1874]	1874	
	1910	Síntesis del tetrabromoBDE [Cook, 1910]
Descubrimiento de sus propiedades como pesticida [Müller, 1949]	1939	
Primera patente (Suiza)	1940	
Utilizado durante la epidemia de tifus en Nápoles	1943/44	
Primeros estudios sobre su toxicidad y acumulación en animales [Ellis, 1944]	1944	
Inicio del uso no militar y la producción en gran escala	1945	
Detección en tejido adiposo humano [Howell, 1948]	1948	
Campaña mundial de la WHO contra la malaria. En América del Sur, África y Asia se rocía con DDT	1958	
	1960	Primera patente como retardantes de llama (pentaPBDE)
Publicación de Silent Spring [Carson-1962]. El debate se abre a la preocupación pública	1962	
	1965	Inicio de su uso en la fabricación de productos comerciales
Prohibición en Hungría	1968	
Prohibición en Suecia	1970	
Prohibición en USA y Alemania	1972	
Prohibición en España	1977	Primeros informes sobre su posible carcinogenicidad [IRDC, 1977]
	1979	Detección en muestras ambientales [DeCarlo, 1979; Andersson, 1981]
	1987	Se sugiere por primera vez su ubicuidad [Jansson, 1987]
	1989	Cese voluntario de la producción y el uso de DecaBDE en Alemania
	1990	Se detectan en tejido adiposo humano [Remers-1990]
	1990s	Estudios sobre causa de disrupción endocrina
Inclusión en la Dirty dozen de la Convención de Estocolmo	1995	La USEPA clasifica el decaBDE como posible carcinógeno humano
	1998	Se evidencia el aumento de los niveles de PBDE en leche materna de Suecia desde los años 70 [Norén, 1998]
Restricción global con la entrada en vigor de la Convención de Estocolmo	2004	La Unión Europea prohíbe las mezclas pentaBDE y octaBDE
La WHO aconseja que se retome su uso en África para rociar interiores	2006	Inclusión del decaBDE como sustancia tóxica en la Canadian Environmental Protection Act
	2007	Restricción del uso de DecaBDE en textiles, muebles y cables en Suecia
	2008	Prohibición del uso de DecaBDE en colchones y muebles en algunos estados de USA Prohibición del uso del DecaBDE en electrónica en Europa
	2009	Prohibición global de las mezclas Penta- y OctaBDE (Convención de Estocolmo)
	2013	Cese de producción de DecaBDE en USA

Figura 7. Cronología de la síntesis del DDT y los PBDE

■ Uso generalizado ■ Evidencias de riesgo ■ Prohibición

sigue siendo objeto de atención aun ahora, cuatro décadas después de estas restricciones (Fromberg *et al.*, 2011; Glynn *et al.*, 2011). Por otra parte, el potencial del DDT para combatir la transmisión de malaria, ha justificado que incluso la Convención de Estocolmo sobre POP, que prohibió el DDT casi mundialmente en 2004, reconozca una excepción para el uso del DDT en países en que esta enfermedad es endémica, donde la Organización Mundial de la Salud (WHO, de *World Health Organization*) recomienda la fumigación de las paredes interiores de las viviendas (WHO, 1995; WHO, 2006). La continuidad de este uso, que ha salvado millones de vidas, y la eficiencia de las alternativas posibles sigue siendo hoy en día objeto de un debate muy polarizado (Van Den Berg, 2009; Bouwman *et al.*, 2011). Además del uso del DDT como control de vectores infecciosos en Africa, China y Mexico (Karlsson *et al.*, 2000), otras fuentes actuales de entrada al ambiente de este contaminante son su uso en pinturas antiincrustantes en China (Lin *et al.*, 2009) y en la conservación del pescado seco en India (Siddique *et al.*, 2012). Además, el dicofol, un acaricida que se sintetiza mediante la hidroxilación del DDT, ha sido producido y utilizado hasta hace poco en Europa, Asia y Norteamérica, si bien en los últimos años ha comenzado también a ser regulado e incluso se ha propuesto su inclusión en la Convención de Estocolmo (Qiu *et al.*, 2005; MAGRAMA, 2008; UNEP, 2013). En España, después de su restricción inicial en 1971, la prohibición definitiva del DDT entró en vigor en 1977 (Ministerio de Agricultura, 1975). Sin embargo, durante la última década, la contaminación por OCP como el DDT ha sido motivo de preocupación en algunas zonas (Merino *et al.*, 2005; Muñoz-Arnanz & Jiménez, 2011; Nicola *et al.*, 2014). Algunos de estos estudios indican la existencia de fuentes más o menos recientes como fue, hasta el año 2008, la producción de dicofol en la localidad de Monzón en Huesca (IAGA, 2008), objeto de estudio en la presente tesis.

1.3.2.1. Estructura y propiedades físico-químicas

El término DDT se refiere generalmente al p,p'-diclorodifeniltricloroetano o 1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano, compuesto químico de propiedades insecticidas. El DDT usado comercialmente, sin embargo, es una mezcla constituida por un 65-80% del componente activo, el p,p'-DDT, con presencia de proporciones menores de otros análogos que incluyen hasta un 15-21% del casi inactivo o,p'-DDT y cantidades traza de o,o'-DDT. Su estructura está formada por dos anillos aromáticos con sendas sustituciones cloradas unidos por un carbono (Figura 8). Además de otras impurezas, estas mezclas técnicas suelen contener diclorodifenildicloroetileno (DDE) y diclorodifenildicloroetano o tetraclorodifeniletano (DDD o TDE), que son asimismo los principales productos de degradación del DDT, formados por la pérdida de cloros en el carbono no aromático. El DDD también fue comercializado como plaguicida (aunque en mucha menor extensión que el DDT) y en el tratamiento del cáncer de glándula adrenal (en su forma o,p'-DDD) (Hammer, 2011), mientras que el DDE no ha tenido uso comercial (ATSDR, 2002; Thomas *et al.*, 2008). Debido a que estos productos de degradación tienen también propiedades nocivas, cuando se habla de DDT en el ambiente, casi siempre se habla también de DDE y DDD y muchas veces se emplea el acrónimo DDTs en plural para referirse de manera general a este grupo de moléculas o, simplemente DDX, que será el empleado de aquí en adelante en la memoria.

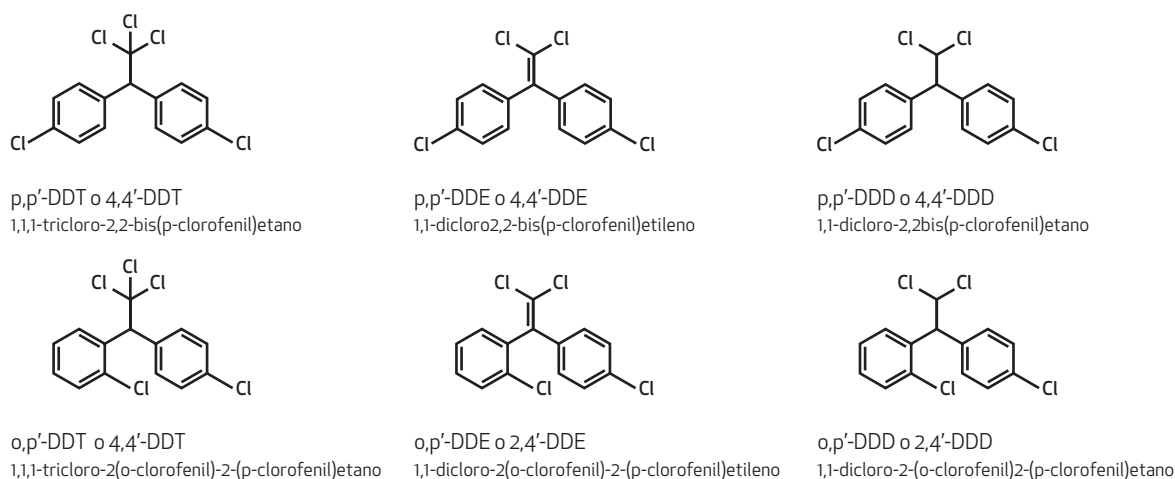


Figura 8. Estructura química de DDT, DDD y DDE.

Tanto el DDT como el DDE y el DDD son sólidos cristalinos, de color blanco, sin sabor y prácticamente inodoros. Sus propiedades físico-químicas se resumen en la Tabla 3. Todos ellos son compuestos de baja solubilidad en agua y semivolátiles, aunque tanto la solubilidad como la presión de vapor aumentan en el orden DDT < DDD < DDE.

Tabla 3. Propiedades físico-químicas de los DDT, DDD y DDE (ATSDR, 2002)

	Número de registro CAS	Masa molecular (g/mol)	Solubilidad en agua (a 25°C) (ug/L)	Log K_{ow}	Log K_{oc}	Presión de vapor (mm Hg)	Constante de la ley de Henry (atm·m ³ /mol)
p,p'-DDT	50-29-3	354.49	25	6.91	5.18	1.6x10 ⁻⁷ (a 20 °C)	8.3x10 ⁻⁶
o,p'-DDT	789-02-6	354.49	85	6.79	5.35	1.1x10 ⁻⁷ (a 20 °C)	5.9x10 ⁻⁷
p,p'-DDD	72-54-8	320.05	90	6.02	5.18	1.4x10 ⁻⁶ (a 25 °C)	4.0x10 ⁻⁶
o,p'-DDD	53-19-0	320.05	100	5.87	5.19	1.9x10 ⁻⁶ (a 30 °C)	8.2x10 ⁻⁶
o,p'-DDE	3424-82-6	318.03	140	6.00	5.19	6.2x10 ⁻⁶ (a 25 °C)	1.8x10 ⁻⁵
p,p'-DDE	72-55-9	318.03	120	6.51	4.70	6.0x10 ⁻⁶ (a 25 °C)	2.1x10 ⁻⁵

CAS: Chemical Abstracts Service; K_{ow} : coeficiente de partición octanol-agua; K_{oc} : coeficiente de partición carbón orgánico-agua

1.3.2.2. Transformación en el medioambiente

Aun siendo un contaminante persistente, el DDT puede perder moléculas de HCl y ser transformado por actividad microbiana y otros agentes como la luz o la presencia de ciertos metales, e incluso ser metabolizado por organismos superiores (Llompert *et al.*, 2003; Eganhouse & Pon-

tolillo, 2008; Chen *et al.*, 2009). El DDD, principal metabolito bajo condiciones anaeróbicas, y el DDE, predominante en condiciones aeróbicas, son los productos de transformación más estudiados, debido a su carácter lipofílico y persistente. El DDE, particularmente, es aún más resistente a la degradación que el DDT y puede ser detectado en suelos décadas después de la aplicación del pesticida (Zhu *et al.*, 2013).

Aunque las rutas de degradación no han sido elucidadas por completo todavía, se han encontrado muchos otros productos de transformación como: p,p'-2,2-bis(clorofenil)-1-cloroetileno (DDMU), p,p'-2,2-bis(clorofenil)-1-cloroetano (DDMS), 1,1-bis(p-clorofenil)-etileno (DDNU), 2,2-bis(p-clorofenil)-etanol (DDOH), p,p'-2,2-bis(4-clorofenil)-acetoneitrilo (DDCN) y ácido p,p'-2,2-bis(clorofenil) acético (DDA). La Figura 9 recoge de manera simplificada las rutas que han sido propuestas para la formación de estos productos en ambientes anaeróbicos. El DDA es el único de estos compuestos que no es liposoluble, sino que es eliminado por la orina, y ha sido utilizado para estimar la exposición humana al DDT (Chen *et al.*, 2009).

Si bien la información sobre las diferencias en la persistencia entre isómeros es escasa, se supone que los pares isoméricos o,p'- y p,p'- se degradan en el ambiente por rutas similares pero con diferentes velocidades. Los isómeros p,p'- son generalmente más activos biológicamente (Thomas *et al.*, 2008).

1.3.2.3. Distribución en el medio acuático

Los DDX (tanto DDT como DDE y DDD) siguen los patrones de comportamiento generales de los POP, que se han descrito en el apartado anterior. Debido a la hidrofobicidad y la estabilidad química de estas moléculas en el medio acuático, tienden a acumularse en la materia particulada y los sedimentos y persistir durante años, mientras que en el agua las concentraciones son bajas. Los niveles en biota especialmente en los tejidos grasos alcanzan valores mucho mayores que, además, aumentan con la posición de la especie en la cadena trófica.

La diferencia de hidrofobicidad del DDT respecto a DDE y DDD, aunque pequeña (Tabla 3) confiere a esta molécula un potencial de acumulación mayor, como se desprende de la Figura 10, donde se muestran los resultados del cálculo de los BAF para los tres compuestos a lo largo de una cadena trófica de la Bahía de Bohai, en China (Wang *et al.*, 2011). Sin embargo, los niveles y los patrones entre los distintos isómeros y formas metabólicas que se pueden observar en un determinado lugar dependen del origen y la historia de la contaminación. Así, en la mayoría de los países, donde el uso del DDT fue cesado hace años, los residuos que se encuentran actualmente están dominados por p,p'-DDE, por ser este el metabolito más persistente tanto en el ambiente como en biota. De hecho, la relación p,p'-DDE/p,p'-DDT ha sido utilizada muchas veces para distinguir entre fuentes antiguas o nuevas de DDT al ambiente (Iwate *et al.*, 1993; Zumbado *et al.*, 2005). En cambio, en zonas donde todavía existen fuentes de entrada, el predominio de un metabolito u otro está más estrechamente relacionado con el origen de la contaminación. En zonas contaminadas por el uso o la producción del pesticida dicofol, p. ej., se da una predominancia de p,p'-DDE derivado de la descomposición del p,p'-Cl-DDT, un intermediario en la síntesis de dicofol que se encuentra como una impureza importante en sus formulaciones comerciales. Por otra parte, la composición isomérica también puede ser utilizada para trazar la contaminación, ya

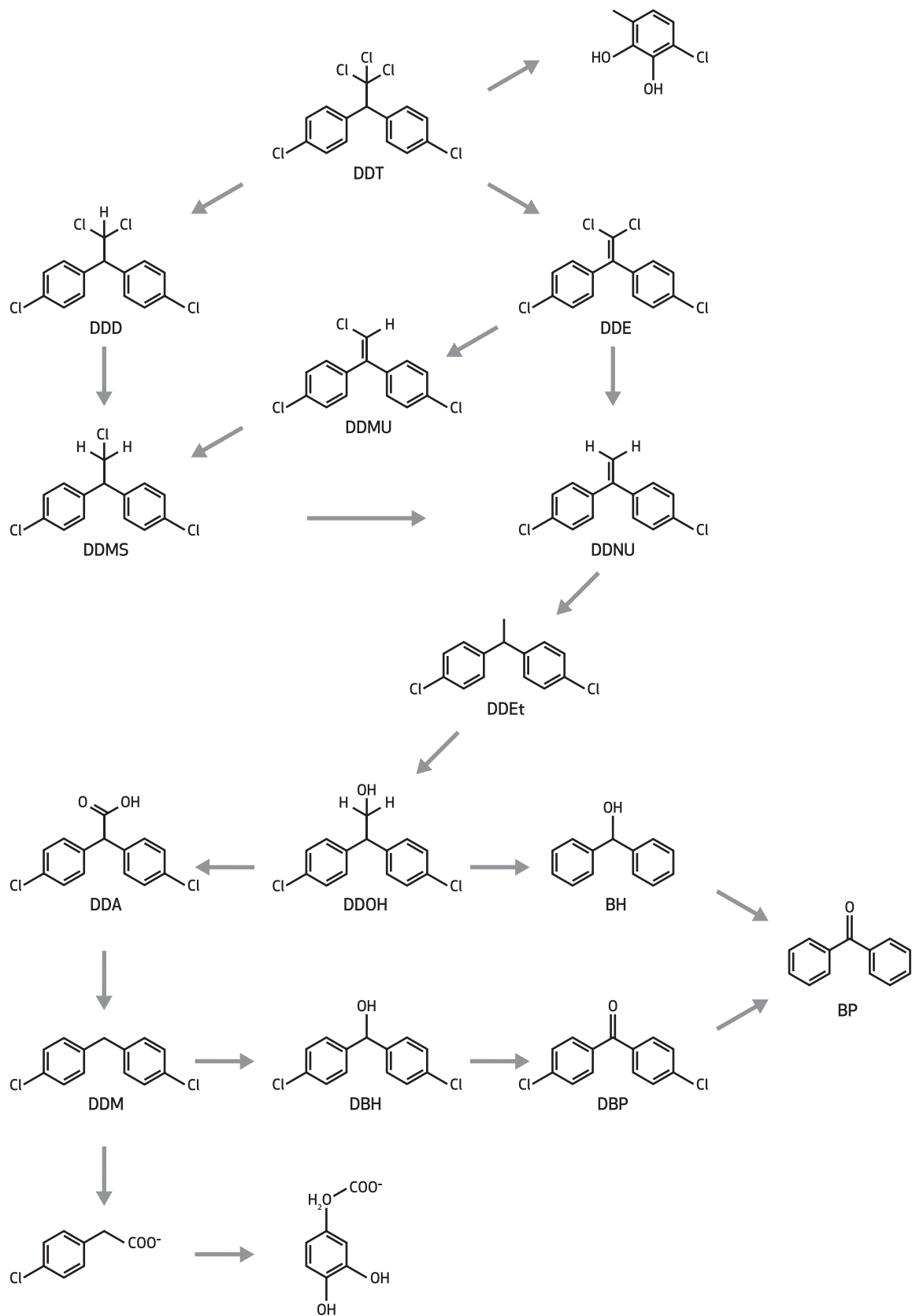


Figura 9. Degradación anaeróbica del p,p'-DDT en ambientes acuáticos (Eggen & Majcherczyk, 2006; Wettenrauer et al., 2012)

que la alteración de las proporciones entre isómeros depende de las condiciones y los procesos ambientales dominantes. Por ejemplo una forma que se ha propuesto para distinguir el DDE procedente del dicofol que se produce por degradación del DDT es la observación de la relación entre *o,p'*-DDT y *p,p'*-DDT, mucho mayor en el dicofol que en el DDT técnico (Qiu *et al.*, 2005; Qiu & Zhu, 2010). Sin embargo, aunque el largo periodo durante el que el DDT fue aplicado como pesticida ha hecho que haya sido estudiado extensamente, el conocimiento sobre los cambios de la distribución isomérica es limitado y solo algunos estudios recientes aportan datos cuantitativos de los isómeros *o,p'*-/*p,p'*- (Ricking & Schwarzbauer, 2012).

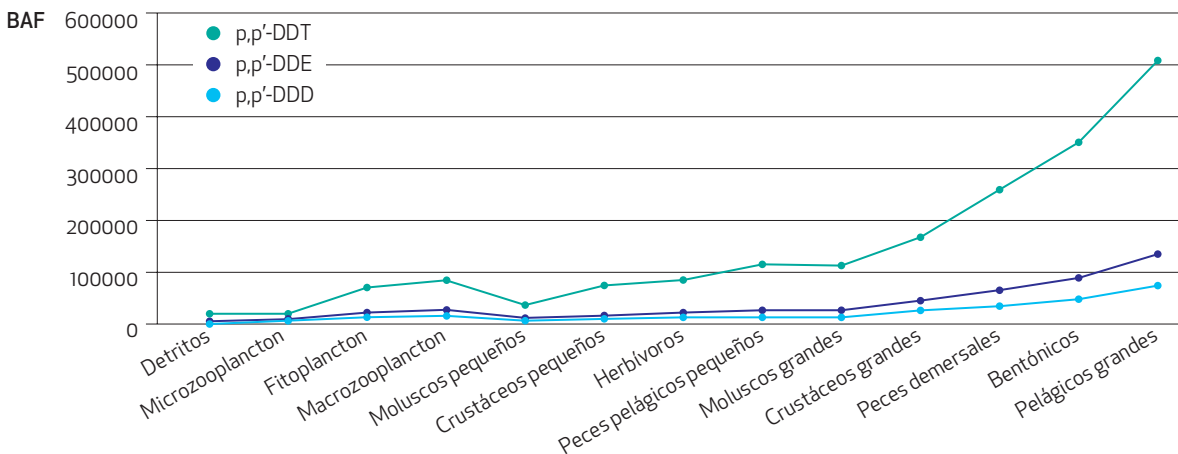


Figura 10. Factores de bioacumulación (BAF) de DDT, DDE y DDD en los sucesivos eslabones de una cadena trófica en la bahía de Bohai, en China (tomada de Wang *et al.* (2011) con permiso de Elsevier).

Debido a su persistencia, aún hoy en día se pueden encontrar DDX en los sedimentos y en la biota de lugares donde su uso fue prohibido en los años 70, como Europa o USA. En el río Columbia (USA), p. ej., se han reportado recientemente valores de 0.07-0,58 ng/L en agua (Alvarez *et al.*, 2014) y 157-434 ng/g en peso fresco (ww, del inglés *wet weight*) en hígado de peces (Nilsen *et al.*, 2014) y en anguilas de Escocia se ha medido hasta 227 ng/g ww (Macgregor *et al.*, 2010). En el lago Prespa, en Macedonia, donde se prohibió su uso en 1982, todavía recientemente se han encontrado valores de 40-60 ng/L en agua (filtrada a 0,45 μ m), 2,3-4,2 ng/g en peso seco (dw, del inglés *dry weight*) en sedimento y 12-14 ng/g ww en peces, todos ellos dominados por el *p,p'*-DDE (Veljanoska-Sarafiloska *et al.*, 2013). En ambientes remotos, donde nunca se ha utilizado, también continúa siendo detectado. Así, en el Himalaya, p. ej., se han medido concentraciones de DDT de 24 pg/L en muestras de nieve (Kang *et al.*, 2009). En una zona prístina de Islandia se han encontrado niveles de 0,12-0,32 ng/g ww en moluscos, 0,41 ng/g en peces y 12,5 ng/g en araos (Skarphedinsdottir *et al.*, 2010).

No obstante, las mayores concentraciones se han encontrado en la vecindad de antiguos lugares de producción de DDT. Ejemplo de ello es la costa de Palos Verdes (USA), que hasta el año 1971 recibía las descargas de una de las mayores fábricas productoras de DDT, y donde aun recientemente se han medido niveles del orden de μ g/g dw en sedimento (Eganhouse & Pontolillo, 2008) y de 36-2200 pg/L en agua (según la profundidad y proximidad al lecho de sedimento) (Fernandez *et al.*, 2012). Uno de los mayores valores encontrados en sedimento, sin

embargo, corresponde a un estudio de un lago cerca de un vivero forestal en Noruega, donde el DDT fue utilizado hasta 1989, en cuyos sedimentos se midieron en 2006 hasta 1,3 mg/g dw (Eggen & Majcherczyk, 2006). Otro ejemplo de niveles altos son las lubinas recogidas en las proximidades de una fábrica donde se produjo DDT hasta 1963 en Alabama: en 2009 se midieron valores de 419-49810 ng/g ww siendo el p,p'-DDE el 39-74% del total (Hinck *et al.*, 2009).

En los países donde la malaria es endémica y se permite la fumigación de interiores con DDT (IRS, de *Indoor Residual Spraying*) para matar mosquitos, la presencia en aire y polvo de este contaminante es importante (Whitworth *et al.*, 2014). Sin embargo, aunque es esperable que la escorrentía de estas aplicaciones sea una fuente importante de DDT en los sistemas acuáticos de estos lugares y que se den altas proporciones de DDT, por ser un aporte reciente, no existen muchos estudios que aporten datos sobre esto. En los sedimentos del lago Sibaya, en Sudáfrica, p. ej., se han encontrado valores de 0,8-123 ng/g para la suma de p,p'-DDT, p,p'-DDD y p,p'-DDE (Humphries, 2013), pero la proporción de DDT respecto a DDE y DDD es muy baja (~10%), lo que parece indicar que actualmente la aportación proveniente de la IRS es pequeña en este lago. En China, en cambio, de donde existen más datos, los ratios DDT/(DDE + DDD) altos son frecuentes, a pesar de que el dicofol también constituye una vía de entrada de DDE. En este país se permite su aplicación a pequeña escala por cuestiones de salud pública y todavía parece haber migración de pinturas antiincrustantes de barcos basadas en este pesticida (Xin *et al.*, 2011), además de usos ilegales en agricultura (Wang *et al.*, 2011).

El medio acuático constituye una fuente de exposición humana a los DDX. Los DDX presentes en pescados y mariscos aportan la parte más importante de DDT de la dieta, que es, a su vez, la principal ruta de exposición humana a este pesticida (Beard, 2006). Törnkvist *et al.* (2011), p. ej., midieron concentraciones de DDT de 1.9-5.2 ng/g ww en una cesta de la compra típica en Suiza. Esta exposición hace que todavía se puedan medir niveles significativos en muestras de suero, tejido adiposo o leche materna en poblaciones que no están expuestas ocupacionalmente (Gajski, 2012). En los lugares donde este pesticida todavía está en uso, la exposición dérmica o aérea adquiere mayor importancia, como es el caso hoy en día del controvertido uso en la fumigación de interiores en zonas donde hay malaria (Van Dyk *et al.*, 2010). En Sudáfrica se han llegado a medir concentraciones de hasta 5.2 mg/l ww y 140 mg/kg lw en 2012 en leche materna (Bouwman *et al.*, 1990; Bouwman *et al.*, 2012).

Como para otras sustancias que han ido siendo reguladas, el cese o la minimización en la producción y uso del DDT se refleja en la disminución de las concentraciones ambientales en algunos lugares. Esto se ha podido constatar, p. ej., en una tendencia significativamente decreciente de DDX (junto con los PCB y otros pesticidas organoclorados) en peces de los Grandes Lagos entre 1999 y 2009 (Chang *et al.*, 2012) o en anguilas de Escocia entre 1986 y 2008 (Macgregor *et al.*, 2010). No obstante, este no es siempre el caso. Así, p. ej., las concentraciones en biota y sedimentos en fiordos noruegos han aumentado incluso después de su prohibición en los años 70, lo que puede ser debido al cambio de las condiciones climáticas y el aumento del DOC en el agua (Ruus *et al.*, 2010). Además, el efecto de las diferencias territoriales en cuanto a la legislación de uso de estas sustancias se ha podido comprobar en los niveles de DDT en los tejidos humanos, que están disminuyendo en los países desarrollados, mientras que en la mayoría de los países en desarrollo, donde todavía son utilizados, se mantienen estables (Loganathan & Kannan, 1994; Jacob, 2013).

1.3.2.4. Toxicidad

A día de hoy, la información existente sobre los efectos negativos de los DDX sobre la salud ambiental y humana es muy extensa. Al igual que otros compuestos organoclorados, el DDT es un neurotóxico que actúa sobre la conducción del impulso nervioso, provocando desde alteraciones sensoriales hasta convulsiones (ATSDR, 2002). Sin embargo, lo que ha llevado a su prohibición son los efectos que pueden llegar a tener en concentraciones no tan altas, principalmente los efectos sobre la reproducción y el desarrollo, atribuidos a su capacidad de disrupción endocrina sobre las hormonas sexuales (Kelce *et al.*, 1995). Las consecuencias ecológicas de esta alteración endocrina han sido demostradas en aves (especialmente aves rapaces) e incluyen el adelgazamiento, la evanescencia y el daño de los huevos, lo que a largo plazo puede afectar directamente al crecimiento de la población (Porter & Wiemeyer, 1969; ATSDR, 2002). Algunos efectos de esta alteración endocrina se han llegado a comprobar también en humanos. Así, p. ej., se ha llegado a estimar que un 15 por ciento de la mortalidad infantil en USA durante el periodo de uso del DDT podría achacarse a la contaminación por este pesticida, cuya relación con partos prematuros en ese periodo es muy significativa (Longnecker *et al.*, 2001). También se ha visto, p. ej., una asociación entre concentraciones elevadas de DDE en suero y una disminución de los parámetros reproductivos masculinos en zonas donde se usó DDT para el control de la malaria (Aneck-Hahn *et al.*, 2007). De todos los compuestos relacionados con el DDT, el isómero o,p'-DDT es el que tiene mayores propiedades estrogénicas, aunque varios órdenes de magnitud por debajo de la hormona natural, 17 β -estradiol (Wetterauer *et al.*, 2012). El p,p'-DDE tiene propiedades antiandrogénicas y se ha comprobado su capacidad para alterar el desarrollo de los órganos reproductivos cuando es administrado durante el periodo perinatal en ratas (Kelce *et al.*, 1995).

Por otra parte, varios estudios parecen haber demostrado su capacidad genotóxica (Canales-Aguirre *et al.*, 2011). Además, también ha sido relacionado directamente con cáncer, tanto en animales como en humanos (McGlynn *et al.*, 2008), lo que ha llevado a la consideración como posible carcinógeno por parte de diversos organismos como la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, de *International Agency for Research on Cancer*) (IARC, 2011) o la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, de *Environmental Protection Agency*) (ATSDR, 2002).

1.3.3. Los difeniléteres polibromados o PBDE

Los PBDE pertenecen a un grupo de compuestos orgánicos bromados que son utilizados como aditivos inhibidores de la combustión o retardantes de llama bromados (BFR, del inglés *brominated flame retardants*) en resinas y polímeros utilizados para la fabricación de componentes electrónicos, electrodomésticos y textiles (Sjödín *et al.*, 2003). Su uso comenzó a mediados de la década de 1970, en respuesta a la prohibición de los FR utilizados anteriormente, como los PCB y los PBB (Daso *et al.*, 2010). El descubrimiento del incremento de los niveles de los PBDE en el ambiente y, en especial, los valores observados en humanos —a diferencia del descenso de otros contaminantes clorados de similares características como el DDT, los PCB o las dioxinas— hizo que emergiesen como contaminantes de interés en la década pasada, cuando se comenzó el presente trabajo de tesis. Las evidencias de su potencial tóxico —que, si bien no parece manifestarse

a los niveles actuales, sí podría hacerlo si sus concentraciones continuasen aumentando— han fundamentado esta preocupación y han llevado a la limitación progresiva de la producción y uso de las mezclas Penta- y Octa-BDE. Tales restricciones han ido desde el ámbito local y europeo —como, p. ej., la Directiva de Restricción del uso de Sustancias Peligrosas en equipamientos electrónicos y eléctricos o RoHS (de *Restriction on Hazardous Substances*) de 2002 y la Directiva 2003/11/EC, que prohíbe específicamente su comercialización y uso desde 2004— hasta su incorporación en el año 2009 en la lista de contaminantes restringidos por la Convención de Estocolmo. A la mezcla DecaBDE se le aplicó la restricción en equipos electrónicos de la EU en 2008 (European Court of Justice, 2008) y en USA se abandonó su producción, importación y venta en 2013 (USEPA, 2010). Actualmente se está considerando su inclusión en la Convención de Estocolmo (UNEP, 2009). La liberación de PBDE al ambiente se produce durante su manufactura o su utilización en procesos productivos, así como a lo largo del ciclo de vida de los productos que los contienen, tanto por liberación atmosférica durante el uso de estos productos, como en el momento de su desecho, ya sea por percolación en vertederos o por vía aérea cuando son incinerados. Por ello, el efecto de estas restricciones tardará en hacerse notar, ya que la carga actual de Penta-, Octa-, y DecaBDE, ampliamente diseminados como aditivos en edificios, coches, y multitud de productos de consumo que continúan en uso, asegura una liberación continuada al ambiente de esos compuestos durante años. Un motivo de preocupación creciente en los últimos tiempos son las entradas que se producen del reciclado y desecho de componentes electrónicos (*e-waste*) en Asia y África y los efectos potenciales sobre la salud de las poblaciones locales y, en particular, la formación y liberación de dioxinas y furanos bromados y bromados/clorados que se producen durante esas actividades (Leung *et al.*, 2007; Chi *et al.*, 2011).

1.3.3.1. Estructura y propiedades físico-químicas

Los PBDE constituyen una serie de compuestos aromáticos bromados cuya estructura básica está formada por la unión mediante un átomo de oxígeno de dos anillos bencénicos con un cierto número de sustituciones bromadas (Figura 11), que son las responsable de su capacidad para retardar la combustión. Dependiendo del patrón de bromación pueden existir hasta un total de 209 posibles congéneres, de manera similar a PCB y PBB, que se denominan en orden numérico ascendente con el sistema de la IUPAC que fue originalmente diseñado para los PCB (Ballschmiter & Zell, 1980). Así, el 2,2',4,4'-tetrabromodifenileter se conoce como BDE-47 y el 2,2',3,4,4',5',6-heptabromodifenileter como BDE-183. Las identidades de los congéneres de PBDE de mayor relevancia ambiental / que se han encontrado en la naturaleza se muestran en la Tabla 4.

Figura 11. Estructura general de los PBDE.

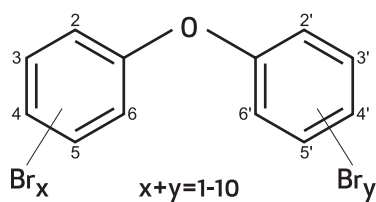


Tabla 4. Congéneres de PBDE estudiados en la presente tesis

Grado de bromación	Sustituciones bromadas	Abreviatura	CAS
MonoBDE	2-	BDE-1	7025-06-1
	3-	BDE-2	6876-00-2
	4-	BDE-3	101-55-3
DiBDE	2,4-	BDE-7	171977-44-9
	2,4'-	BDE-8	147217-71-8
	2,6-	BDE-10	51930-04-2
	3,3'-	BDE-11	6903-63-5
	3,4-	BDE-12	189084-59-1
	3,4'-	BDE-13	83694-71-7
	4,4'-	BDE-15	2050-47-7
TriBDE	2,2',4-	BDE-17	147217-75-2
	2,3',4-	BDE-25	147217-77-4
	2,4,4'-	BDE-28	41318-75-6
	2,4,6-	BDE-30	155999-95-4
	2,4',6-	BDE-32	189084-60-4
	2',3,4-	BDE-33	49690-94-0
	3,3',4-	BDE-35	147217-80-9
	3,4,4'-	BDE-37	147217-81-0
TetraBDE	2,2',4,4'-	BDE-47	5436-43-1
	2,2',4,5'	BDE-49	243982-82-3
	2,3',4,4'-	BDE-66	189084-61-5
	2,3',4',6-	BDE-71	189084-62-6
	2,4,4',6-	BDE-75	189084-63-7
	3,3',4,4'-	BDE-77	93703-48-1
PentaBDE	2,2',3,4,4'-	BDE-85	182346-21-0
	2,2',4,4',5-	BDE-99	60348-60-9
	2,2',4,4',6-	BDE-100	189084-64-8
	2,3,4,5,6-	BDE-116	189084-65-9
	2,3',4,4',5-	BDE-118	-
	2,3',4,4',6-	BDE-119	189084-66-0
	3,3',4,4',5-	BDE-126	366791-32-4

Tabla 4. (Continuación)

Grado de bromación	Sustituciones bromadas	Abreviatura	CAS
HexaBDE	2,2',3,4,4',5'-	BDE-138	67888-98-6
	2,2',4,4',5,5'-	BDE-153	68631-49-2
	2,2',4,4',5,6'-	BDE-154	207122-15-4
	2,2',4,4',6,6'-	BDE-155	35854-94-5
	2,3,4,4',5,6-	BDE-166	189084-58-0
HeptaBDE	2,2',3,4,4',5,6-	BDE-181	189084-67-1
	2,2',3,4,4',5',6-	BDE-183	207122-16-5
	2,3,3',4,4',5,6-	BDE-190	189084-68-2
DecaBDE	2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-	BDE-209	1163-19-5

Existen básicamente tres formulaciones técnicas de PBDE: la Penta-, la Octa- y la Deca-BDE, cuyas composiciones generales son las dadas en la Tabla 5. Mientras que la mezcla Deca-BDE está formada casi exclusivamente por un único congénere (el BDE-209), la Penta-BDE tiene como principales componentes el tetra-BDE-47 y los penta-BDE-99 y -100, y la Octa-BDE la constituyen mayoritariamente heptaBDE, principalmente el BDE-183. Los congéneres de menor bromación no suelen estar presentes en las mezclas técnicas. Sin embargo, sí pueden encontrarse en el ambiente, producto de transformación de otros de mayor bromación.

Tabla 5. Composiciones generales de los principales productos comerciales de PBDE (De Boer et al., 2000).

Producto técnico	Congéneres en función del grado de bromación (%)						
	tetra-	penta-	hexa-	hepta-	octa-	nona-	deca-
Penta-BDE	24-38	50-60	4-8				
Octa-BDE			10-12	44	31-35	10-11	<1
Deca-BDE						<3	97-98

La mezcla comercial Penta es un líquido viscoso, en tanto que la Octa y la Deca son sólidos de color blanco. Las propiedades físicas y químicas de los PBDE (Tabla 6) dependen del grado y posición de las sustituciones de bromo. Así, las presiones de vapor —menores que las de los PCB comparablemente clorados— son mayores cuanto menor es el grado de bromación y para los congéneres con sustitución de bromo en la posición orto al enlace éter. Todos ellos son compuestos muy lipofílicos y sólo ligeramente solubles en agua, característica que se intensifica con el número de átomos de bromo de la molécula. Así el coeficiente de partición octanol-agua ($\log K_{ow}$) estimado para el BDE-17 es de 5.74, mientras que para el BDE-209 se ha calculado

un valor de 10. Aunque se consideran compuestos semivolátiles de manera general, la presión de vapor varía también a lo largo de la serie, siendo los más volátiles los menos bromados. Además, son compuestos resistentes frente a ácidos, bases, calor, luz, reducción y oxidación.

Tabla 6. Propiedades físico-químicas de algunos congéneres individuales de PBDE (ATSDR, 2004)

Congéneres	Número de registro CAS	Masa molecular (g/mol)	Solubilidad en agua (µg/L)	Log K _{ow}	Log K _{oc}	Presión de vapor (mm Hg) (subenfriado)	Constante de la ley de Henry (atm m ³ /mol)
BDE-3	101-55-3	249.1	-	-	-	1.9x10 ⁻³	-
BDE-15	2050-47-7	328.0	130	-	-	1.3x10 ⁻⁴	2.1x10 ⁻⁴
BDE-17	147217-75-2	406.9	-	5.74	-	-	-
BDE-28	41318-75-6	406.9	70	5.94	-	1.6x10 ⁻⁵	5.0x10 ⁻⁵
BDE-47	5436-43-1	485.8	15	6.81	6.31	1.4x10 ⁻⁶	1.5x10 ⁻⁵
BDE-66	189084-61-5	485.8	18	-	-	9.2x10 ⁻⁷	4.9x10 ⁻⁶
BDE-77	93703-48-1	485.8	6	-	-	5.1x10 ⁻⁷	1.2x10 ⁻⁵
BDE-85	182346-21-0	564.7	6	-	6.49	7.4x10 ⁻⁸	1.1x10 ⁻⁶
BDE-99	60348-60-9	564.7	9	7.32	6.48	1.3x10 ⁻⁷	2.3x10 ⁻⁶
BDE-100	189084-64-8	564.7	40	7.24	6.45	2.2x10 ⁻⁷	6.8x10 ⁻⁷
BDE-138	67888-98-6	643.6	-	-	-	1.2x10 ⁻⁸	-
BDE-153	68631-49-2	643.6	1	7.90	6.66	1.6x10 ⁻⁸	6.6x10 ⁻⁷
BDE-154	207122-15-4	643.6	1	7.82	-	2.9x10 ⁻⁸	2.4x10 ⁻⁶
BDE-183	207122-16-5	722.5	2	8.27	6.78	3.5x10 ⁻⁹	7.3x10 ⁻⁸
BDE-190	189084-68-2	722.5	-	-	-	2.1x10 ⁻⁹	-
BDE-209	1163-19-5	959.2	0.1	12.11	8.02	4.67x10 ⁻¹² (25°C)	-

CAS: *Chemical Abstracts Service*; K_{ow}: coeficiente de partición octanol-agua; K_{oc}: coeficiente de partición carbón orgánico-agua

1.3.3.2. Transformación en el medioambiente

A pesar de que en la última década se han llevado a cabo muchos trabajos en torno a estos compuestos, la escasez de datos respecto al grado de transformación en el ambiente sigue siendo quizás la mayor fuente de incertidumbre con respecto al movimiento y destino de estos compuestos, si bien durante los últimos años se han dedicado muchos esfuerzos a estudiar estos procesos.

A menudo se sugiere que la degradación ambiental de estos compuestos es lenta o insignificante. Sin embargo, los cambios encontrados en la proporción de congéneres en muestras ambientales respecto a la composición inicial de las mezclas técnicas —que son relativamente

simples y consisten en unos 20-25 compuestos--, y la observación de congéneres no comerciales evidencia la existencia de procesos de transformación. Estos procesos incluyen la desbromación fotolítica (Söderström *et al.*, 2004; Stapleton & Dodder, 2008) y la desbromación reductiva tanto en bacterias aeróbicas (Vonderheide *et al.*, 2006) y anaeróbicas (Robrock *et al.*, 2008), como en organismos superiores como truchas y carpas (Kierkegaard *et al.*, 1999; Tomy *et al.*, 2004; Stapleton *et al.*, 2006). Estas pérdidas de átomos de bromo parecen ser más lentas para los congéneres menos pesados y ocurren a velocidades diferentes entre los grupos con el mismo número de átomos de bromo pero diferentes patrones de sustitución (Eriksson *et al.*, 2004; Rahm *et al.*, 2005). La degradación del BDE-209 y la posible formación de compuestos más dañinos ha sido objeto especial de preocupación para la comunidad científica durante la última década, ya que, a diferencia de las mezclas comerciales Penta- y Octa-BDE, la Deca-BDE ha tardado más en ser objeto de restricciones por ser considerada poco biodisponible.

Además de la desbromación de congéneres, distintos estudios han detectado presencia en el ambiente de otros compuestos posiblemente derivados de la transformación de los PBDE, como los PBDE hidroxilados (OH-PBDE), producto potencial de la oxidación microbiana de PBDE u otros procesos de degradación (Wiseman *et al.*, 2011). Muchos organismos también pueden producir PBDE metoxilados (MeO-PBDE) (Teuten *et al.*, 2005). Se ha visto también que durante procesos de combustión se generan emisiones de otros compuestos orgánicos bromados, como los polibromodibenzo furanos (PBDF) y las polibromodibenzo-*p*-dioxinas (PBDD) (Chang *et al.*, 2013).

1.3.3.3. Distribución en el medio acuático

En los últimos años se han publicado muchos estudios que aportan un volumen de datos importante de las concentraciones de PBDE en el ambiente y han facilitado la comprensión de su distribución con respecto al momento en que se comenzó el trabajo experimental de esta tesis.

En general, el perfil de congéneres varía entre los distintos compartimentos ambientales, reflejo de las diferencias de comportamiento derivadas del amplio rango de características físico-químicas que cubre la familia de PBDE. Como los DDX y otros POP, en el medio acuático los PBDE tienden a unirse a la materia orgánica y concentrarse en los sedimentos y la materia particulada, lo que hace que el destino final de los PBDE se vea muy influenciado por la presencia de partículas en suspensión. Esta inclinación, sin embargo, es más fuerte cuanto mayor es el grado de bromación, ya que los coeficientes de partición K_{ow} y K_{oc} de los congéneres individuales de PBDE aumentan con el número de sustituyentes de bromo (en tanto que la solubilidad en agua y la presión de vapor disminuyen) (ver Tabla 6). Por ello, los compuestos más bromados son relativamente menos móviles en el ambiente y tienden a acumularse cerca de sus fuentes de emisión. En cambio, los compuestos con menor bromación, incluyendo productos de descomposición ambiental de BFR, son transportados más fácilmente, por lo que su proporción relativa aumenta con la distancia a las fuentes puntuales o a las regiones de uso importante (de Wit *et al.*, 2006; Hale *et al.*, 2006; Gevao *et al.*, 2008; Ramu *et al.*, 2010).

Las concentraciones en biota son mayores, debido a la bioacumulación y a la biomagnificación, con la particularidad de que el perfil de congéneres suele diferir del de las mezclas comer-

ciales y del que se encuentra en sedimentos, incluyendo la presencia de congéneres que no han podido ser observados en ninguna formulación técnica. Estas variaciones pueden explicarse por diferencias en biodisponibilidad, por la deshalogenación metabólica por parte de los organismos, o por diferencias en las tasas de acumulación/excreción. Por ejemplo, con frecuencia se observa que la concentración en peces del BDE-99 (uno de los principales congéneres de la mezcla Penta-BDE) es menor que la concentración en el sedimento circundante, a diferencia de lo que ocurre con otros congéneres como el BDE-47 (Streets *et al.*, 2006; Koistinen *et al.*, 2008), lo que parece indicar que ciertos organismos poseen la capacidad de transformar este congener en particular (Stapleton *et al.*, 2004a; Tomy *et al.*, 2004).

En aguas, tanto superficiales como subterráneas, las concentraciones son extremadamente bajas (con frecuencia en el orden de los pg/L), por debajo incluso de las predicciones que se basan en la solubilidad de estos compuestos (ug/L) (Booij *et al.*, 2002; Oros *et al.*, 2005; Streets *et al.*, 2006) y, de hecho, no existen muchos datos sobre concentraciones en la fase disuelta. Así, p. ej., Polo *et al.* (2004) no pudieron detectar PBDE (con un LOD de pg/L) en el análisis del afluente y el efluente de una planta de tratamiento de aguas residuales, a pesar de que se sabe que esas plantas son una fuente significativa de PBDE. Una explicación parcial de esa discrepancia podría ser la degradación microbiana o fotolítica en aguas superficiales, pero también el secuestro por parte de las fases sólidas.

A su vez, las variaciones en los perfiles de congéneres dependiendo de la matriz que se acaban de comentar se yuxtaponen a las tendencias geográficas y temporales asociadas a cada una de las tres fórmulas comerciales. Los BDE-47, -99, -100, -153, -154 y -183, predominantes en la mezclas Penta- y Octa-BDE, fueron los primeros en acaparar la atención científica, al ser encontrados no solo en el medio abiótico sino también en biota mientras que el BDE-209, con un $\log K_{ow}$ mayor de 12 (Tabla 6), se consideraba no biodisponible y resistente a la degradación. En general, las concentraciones ambientales de estos PBDE son más bajas que las de contaminantes orgánicos heredados como el DDT, que fue utilizado sin control durante un periodo de tiempo mucho más largo (Stephansen *et al.*, 2012). Sin embargo, en los últimos años el BDE-209 ha adquirido relevancia frente a los congéneres menos bromados procedentes de las mezclas Penta- y Octa-BDE, ya que el uso extensivo de la formulación Deca-BDE, al haber sido restringido con posterioridad (ver Figura 7), ha generado un reservorio considerable de este compuesto en los sedimentos a nivel mundial. Un dato que ejemplifica este hecho es la carga de BDE-209 en el lago Taihu en China, que se estimó en 26,3 toneladas en el año 2012 (Zhou *et al.*, 2012). El BDE-209 suele predominar el perfil de PBDE en sedimentos, seguido de los congéneres -47, -99 y -100 (Labadie *et al.*, 2010b; Van Ael *et al.*, 2012), y también en lodos residuales y zonas próximas a salidas de depuradora (De Boer *et al.*, 2003; Hwang *et al.*, 2012). Además, en los últimos años se ha detectado su presencia en tejidos biológicos y humanos, incluso siendo el congener dominante (Shanmuganathan *et al.*, 2011; La Guardia *et al.*, 2012) y también se han detectado presumibles productos de degradación. Estas mediciones dan mayor peso a la preocupación por la desbromación potencial del BDE-209 en el futuro y los posibles efectos tóxicos que se puedan derivar de la formación de otros congéneres.

En general, las concentraciones más altas de PBDE se han encontrado en muestras ambientales de áreas cercanas a lugares de producción, lugares de reciclaje de productos o a zonas densamente pobladas, como, p. ej., los lodos de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) o

los sedimentos directamente afectados por los efluentes. Por ejemplo, la concentración promedio de PBDE encontrada por Mascolo *et al.* (2010) en lodos procedentes de EDAR municipales de Italia fue de 490 ng/g dw, que es del orden habitual en este tipo de muestras (Hale *et al.*, 2001; Hale *et al.*, 2006; Kupper *et al.*, 2008). En zonas muy contaminadas los niveles en sedimentos pueden llegar hasta los $\mu\text{g/g dw}$. En el delta del río de la Perla (China), altamente poblado e industrializado, se han medido hasta 2015 ng/g dw de BDE-209 (Mai *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2009). Aguas abajo de una fábrica textil en Carolina del Norte (USA) se han cuantificado hasta 3619 ng/g dw de BDE-209 en sedimento y de hasta 65 $\mu\text{g/g lw}$ en gasterópodos, siendo el principal congénere el BDE-209 (seguido de BDE-206 > -99, -207, -47 > -208 y -100) (La Guardia *et al.*, 2012). Esas concentraciones están entre las más altas que se han publicado mundialmente. No obstante, en general, los PBDE están presentes de manera ubicua en el medio y también han podido detectarse en ambientes remotos como en nieve de la Antártida, donde se han medido recientemente concentraciones de 130–340 pg/L (Vecchiato *et al.*, 2015), siendo el BDE-47 y el BDE-99 los principales congéneres.

La biomagnificación hace que en los organismos superiores en medios acuáticos las concentraciones de $\mu\text{g/g lw}$ sean habituales (Chen & Hale, 2010), como ocurre con los valores aportados por Henny *et al.* (2011) en aves piscívoras de distintos continentes (0,5-7 $\mu\text{g/g lw}$). En martines pescadores de una planta de reciclado electrónico en el sur de China los niveles son de 2 a 26 $\mu\text{g/g lw}$ para la suma de 17 PBDE (Mo *et al.*, 2012), que es varias veces mayor que los de otras especies de aves acuáticas del mismo lugar (37–2300 ng/g lw) (Zhang *et al.*, 2011a). En cetáceos las concentraciones también se encuentran en el orden de los $\mu\text{g/g l.w.}$ (Dorneles *et al.*, 2010) y se ha calculado que las concentraciones en ballenas de la costa oeste de Canada y USA se doblan cada 3-4 años (Mongillo *et al.*, 2012). A día de hoy, muchos estudios han demostrado la biomagnificación de congéneres como el BDE-47. Sin embargo, el BDE-209, aunque bioacumulable, no parece sufrir biomagnificación sino más bien una dilución trófica (Tomy *et al.*, 2008; Brandsma *et al.*, 2015) (Figura 12).

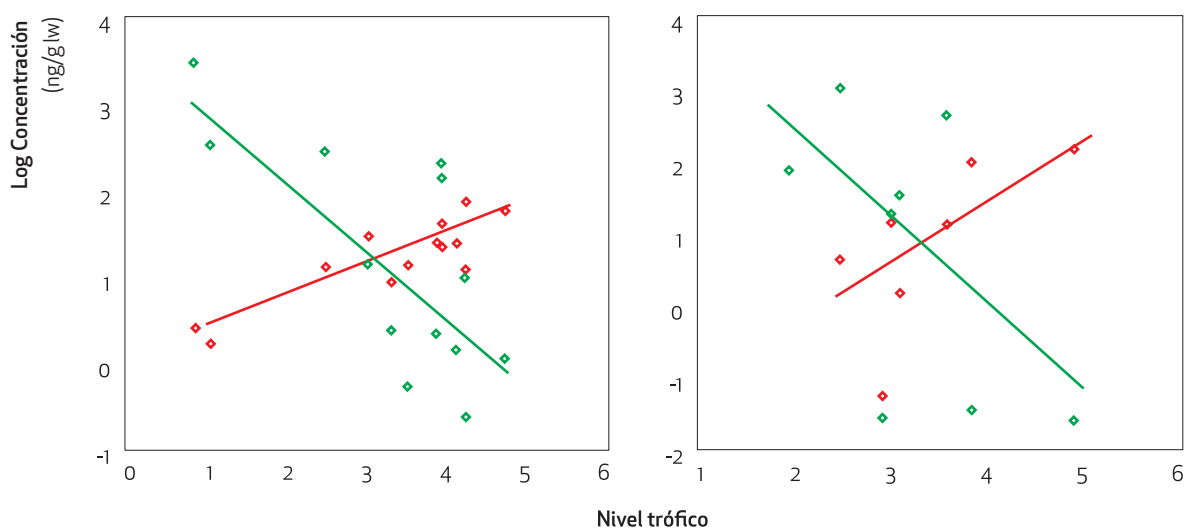


Figura 12. Relación entre la concentración de BDE-47 (rojo) y BDE-209 (verde) y el nivel trófico en cadenas alimenticias del Ártico oriental (izquierda) y el estuario Scheldt, en los Países Bajos (derecha) (a partir de datos de Tomy *et al.* (2008) y Brandsma *et al.* (2015).

Con respecto a la exposición humana a los PBDE a través del medio acuático, los pescados y los mariscos juegan un papel muy importante en la ingesta de PBDE, como se ha comprobado en distintos países y al igual que ocurre con los DDX y otros POP. Gómara *et al.* (2006), p. ej., cuantificaron concentraciones de entre 24 y 880 pg/g ww en pescado de distintos supermercados en España y Törnkvist *et al.* (2011) encontraron valores en el rango de 260-510 pg/g ww en el pescado de una cesta de la compra sueca típica. Valores más altos se han encontrado, p. ej., en USA, hasta 3,7 ng/g ww (Schechter *et al.*, 2008) y en los mercados de Adelaide, en Australia, hasta 45 ng/g ww (Shanmuganathan *et al.*, 2011). De hecho, la principal fuente de exposición humana a los PBDE parece provenir de la alimentación de origen animal (Domingo, 2012). No obstante, la inhalación y la ingestión de polvo en interiores también es una vía importante de aporte al total de la carga corporal en humanos, especialmente en entornos informáticos y lugares de reciclaje o eliminación de productos de consumo que los contienen (Johnson-Restrepo & Kannan, 2009; Kim *et al.*, 2011).

Así, aunque las mayores concentraciones en humanos se hayan medido en individuos expuestos ocupacionalmente (Zhao *et al.*, 2008; Eguchi *et al.*, 2012), estas vías de exposición “domésticas” hacen que los PBDE puedan ser detectados en la población general en leche materna, tejido adiposo, suero, cabello y placenta en niveles del orden de ng/g de grasa (Schechter *et al.*, 2010). Especial interés tiene su presencia en leche materna y en la placenta, por la posibilidad de que se transfieran por esta vía de madre a hijo (Frederiksen *et al.*, 2009). Los niveles encontrados suelen estar en el rango de los ng/g lw y, como en los demás compartimentos ambientales, las concentraciones de PBDE en los tejidos humanos son, en general, más bajas que las de otras sustancias que pertenecen al grupo de contaminantes orgánicos persistentes como los DDX (Schechter *et al.*, 2010; Glynn *et al.*, 2011; Siddique *et al.*, 2012; Sjödin *et al.*, 2014).

Hasta hace relativamente poco, las mediciones de concentraciones ambientales de PBDE que incluían secuencias temporales indicaban una tendencia al alza tanto en sedimentos como en biota y humanos, lo que les valió la consideración de contaminantes “emergentes”. En osos polares de la bahía de Hudson, p. ej., se han encontrado incrementos de un 13% anual hasta el año 2007 (McKinney *et al.*, 2010). No obstante, a día de hoy, las restricciones en las mezclas Penta y OctaBDE parecen comenzar a surtir efecto y en la última década ya se ha comenzado a notar un descenso o bien una estabilización de estos congéneres en varios compartimentos ambientales a nivel global (Muir & de Wit, 2010; Chen *et al.*, 2011). En humanos esta disminución se ha empezado a notar más tarde, quizás por el aporte de las otras fuentes de exposición además de la dieta. Estudios recientes todavía hablan de una tendencia al alza en tejidos como sangre, suero o leche materna que contrasta con la de los niveles de contaminantes orgánicos clorados (Asante *et al.*, 2011; Sjödin *et al.*, 2014) y solo en los años más recientes se ha comenzado a observar una estabilización y, en algunos casos, una caída (Alivernini *et al.*, 2011; Toms *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2013).

Muchas veces en los mismos estudios donde se observan esas disminuciones se ha comprobado también un aumento del BDE-209, cuyo uso ha sido permitido hasta hace poco. Esa tendencia se ha podido comprobar también en humanos (Olofsson *et al.*, 2012; Sutton *et al.*, 2015). Lo mismo ocurre con otros compuestos que han tomado el relevo como posibles sustitutos. Es el caso del hexabromociclododecano o HBCD, hoy también restringido, cuyas concentraciones parecen tener actualmente una tendencia contraria a la de los PBDE, como se ha visto, p. ej., en peces de río en Virginia (Chen *et al.*, 2011). Otros FR que se están utilizando más reciente-

mente como alternativas comerciales de las sustancias restringidas, el decabromodifenil etano (DBDPE) y el bis(tribromofenoxi)etano (BTBPE o TBE), también parecen incrementarse en el ambiente, sus niveles en los sedimentos de los Grandes Lagos, p. ej., se están incrementando exponencialmente (Yang *et al.*, 2012).

1.3.3.4. Toxicidad

Las similitudes estructurales de esta serie de compuestos con los PCB, cuyo portencial tóxico era conocido, en seguida despertaron el recelo de la comunidad científica cuando su uso comenzó a hacerse extensivo. La toxicidad aguda de los PBDE es baja (con dosis letales medianas superiores al gramo por kg de peso corporal) (Tittlemier & Tomy, 2001). La mayor preocupación se centra en torno a sus posibles efectos adversos a concentraciones bajas y a largo plazo, como la neurotoxicidad en las etapas de desarrollo (Birnbaum & Staskal, 2004; McDonald, 2005). Diversos trabajos llevados a cabo con animales indican que la exposición pre- y postnatal a distintos PBDE puede causar alteraciones del comportamiento a largo plazo, particularmente en los dominios de la actividad motora y el conocimiento cognitivo (Branchi *et al.*, 2003). Algunos estudios también han comprobado en humanos este tipo de efectos (Buttke *et al.*, 2013), y se sospecha una posible relación entre los PBDE y el autismo (Domingo, 2004). Otras observaciones asociadas a la exposición de estos compuestos reflejan la existencia de toxicidad reproductiva. Se ha visto, p. ej., que la exposición prenatal de ratas al BDE-99 reduce el número de espermatozoides en adultos (Kuriyama *et al.*, 2005), y altera la estructura de las células de los ovarios en las hembras (Talsness *et al.*, 2005). Recientemente, se ha relacionado la presencia de niveles considerables de PBDE en mujeres con una disminución de la fecundabilidad (Harley *et al.*, 2010).

Los mecanismos operativos que dan lugar a cada una de estas alteraciones no están demostrados, si bien se ha sugerido que podrían estar relacionados con la probada capacidad de los PBDE de alterar determinados balances hormonales. Muchos estudios han demostrado que estas sustancias tienen efecto disruptor sobre la homeostasis de las hormonas tiroideas, que son esenciales para la regulación de importantes procesos reproductivos y del desarrollo. La alteración de los niveles de estas hormonas se ha visto en roedores (van der Ven *et al.*, 2008), corderos (Abdelouahab *et al.*, 2009), peces y mamíferos marinos (Ross *et al.*, 2009). Al igual que ocurre con los PCB, la estructura molecular de los PBDE y sus metabolitos hidroxilados es similar a la de las hormonas tiroideas triiodotironina (T3) y tiroxina (T4) (Figura 13) y uno de los principales mecanismos postulados como responsables de estos efectos es la unión competitiva a los receptores de estas hormonas (Vonderheide *et al.*, 2008). También se ha visto que estos contaminantes interactúan con las hormonas sexuales, como antagonistas o agonistas en los receptores de andrógenos, progesterona y estrógenos (Hamers *et al.*, 2006).

Por otra parte, aunque los PBDE no parecen ser genotóxicos (Hardy, 2002), en roedores expuestos a BDE-209 se ha observado un incremento en la incidencia de carcinomas hepatocelulares y adenomas de tiroides (Darnerud *et al.*, 2001).

La posición y el número de átomos de bromo en relación al enlace éter dan lugar a diferencias tridimensionales entre unos congéneres y otros que pueden influenciar las interacciones molécula-receptor y las propiedades toxicológicas. Generalmente se considera que el BDE-209

es poco tóxico, menos potente que otros congéneres menos bromados. Sin embargo, este con-
 génera puede descomponerse en otros de menor grado de bromación como el BDE-47, que
 presentan mucha mayor toxicidad (Betts, 2008). Otro motivo de preocupación es la toxicidad de
 determinados productos de transformación o degradación de estos compuestos en el ambiente o
 durante procesos de combustión. Algunos de estos productos, como los PBDF y las PBDD, son
 (potencialmente) más tóxicos que los productos originales (Van der Berg *et al*, 2013).

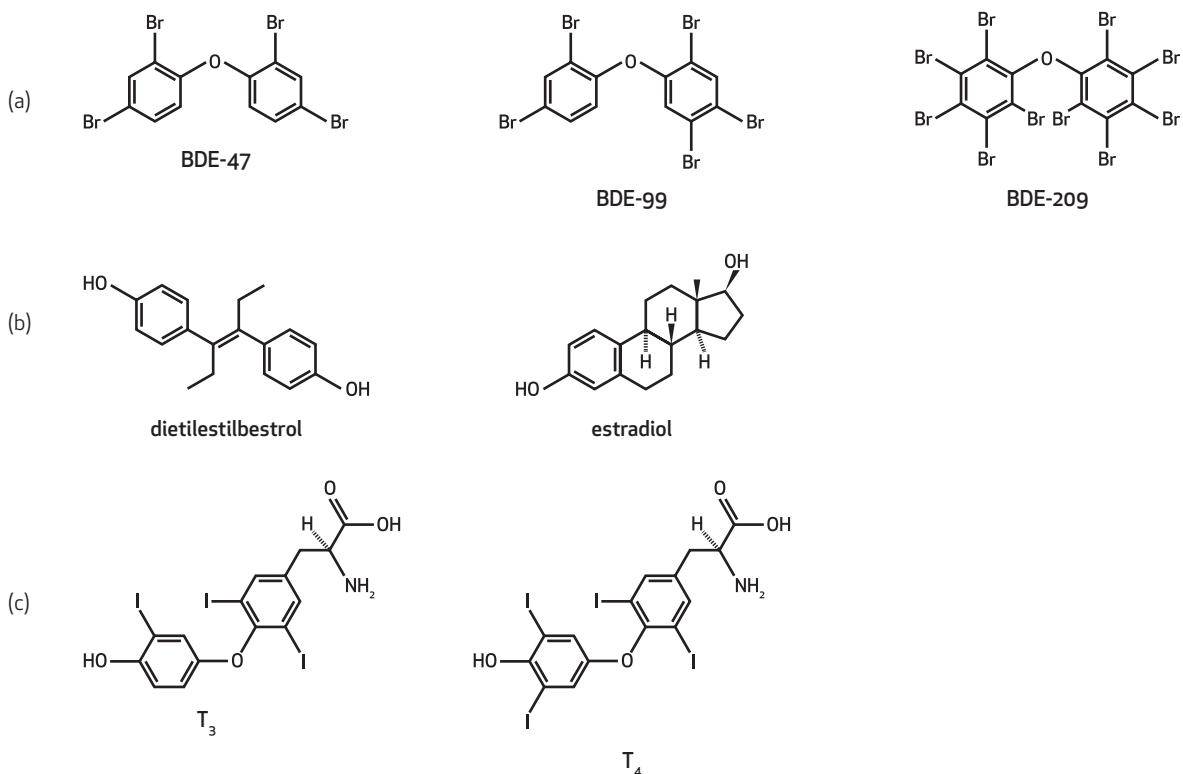


Figura 13. Estructura química de PBDE (a), estrógenos (b), y hormonas tiroideas (c).

■ 1.4. Determinación de los niveles de contaminación en el medio acuático

En las secciones anteriores se ha comentado que para sopesar el impacto que puede suponer la
 producción y uso de sustancias que no están presentes de manera natural en el medio ambiente
 no sólo se ha de determinar sus posibles efectos tóxicos, sino también el grado en que los seres vi-
 vos se ven expuestos a ellas colateralmente. La evaluación de dicha exposición requiere estrategias
 y herramientas de muestreo y análisis que permitan conocer la distribución de concentraciones
 en todos los compartimentos ambientales relevantes (en función del objetivo específico del estu-
 dio), así como la biodisponibilidad en cada uno de ellos.

Cualquier experimento o programa que pretenda medir niveles de contaminación ambien-
 tal ha de partir de una definición clara de su objetivo, en función del cual se determinan tanto
 los contaminantes y el medio o la población a estudiar como el diseño del estudio (técnicas y
 métodos empleados, instrumentación requerida, localización, número y volumen de muestras,
 tiempo y frecuencia de las medidas). La mayoría de los análisis y estudios de vigilancia ambiental

tienen como finalidad básica alguno de los puntos que se muestran en la Figura 14, que incluyen la determinación de emisiones de contaminantes al medio, la vigilancia del cumplimiento de la legislación, el estudio de procesos ambientales y los estudios sobre procesos metabólicos y riesgo ambiental (Namieski, 2002; Wu *et al.*, 2008). La complejidad científica que implica cada uno de esos objetivos aumenta en ese orden, de arriba abajo en el esquema. En cualquier protocolo analítico es primordial asegurar la representatividad del valor final obtenido respecto a la población en estudio. Esto incluye que la muestra tomada sea representativa de la población, teniendo en cuenta su posible heterogeneidad, que la alícuota de muestra analizada sea representativa de la muestra de campo, que las etapas de tratamiento no destruyan la integridad de la muestra y, finalmente, que el análisis químico dé resultados representativos del material analizado (Ramsey & Hewitt, 2005). Sin embargo, más allá de la representatividad del procedimiento en sí, si el estudio pretende proporcionar una medida significativa y fiable de la exposición de los seres vivos, su diseño requiere de especial cuidado, tanto en el momento de elección de una muestra o un programa de muestreo como en el de la elección de métodos de procesado y análisis de las muestras. Ambos han de ser tales que proporcionen una representación adecuada de las fluctuaciones de la concentración química en tiempo y espacio en el medio de interés y permitan definir concentraciones relevantes teniendo en cuenta las diferentes rutas de exposición y la biodisponibilidad de las diferentes formas del compuesto, de manera que los resultados analíticos obtenidos faciliten las estimaciones de exposición (Dobbs & Hunt, 1991).



Figura 14. Áreas de aplicación de los monitoreos de contaminantes ambientales.

1.4.1. Fracción a determinar

Puesto que la distribución espacial y temporal de los contaminantes determina la exposición, la elección del compartimento ambiental en el que el contaminante debe ser medido y la periodicidad del muestreo es un paso crítico en la vigilancia química de una masa de agua. Para llevar a cabo esa elección y que la estrategia de muestreo tenga éxito es necesario comprender la naturaleza del cuerpo de agua en estudio en su totalidad y, particularmente, en términos de variabilidad espacial y temporal y de relaciones entre biota y medio abiótico.

1.4.1.1. Matriz y periodicidad

El procedimiento más aceptado para identificar y cuantificar contaminantes orgánicos en agua es la toma de una muestra puntual seguida de su extracción y análisis en el laboratorio. Frecuentemente este análisis parte de la fracción filtrada a 0,45 μm , que es considerada la fracción disuelta (Wang *et al.*, 2009). No obstante, los estándares para contaminantes orgánicos de la WFD se refieren a la concentración total en el agua y requieren la cuantificación de la muestra completa, ya sea por su análisis directo tal cual o por determinaciones separadas en fases filtrable y sólida (Lepom *et al.*, 2009; Ademollo *et al.*, 2012). En todo caso, dada la variabilidad de las concentraciones que un contaminante puede tener en esta matriz, la utilidad de estas medidas puntuales para determinar la calidad del sistema acuático está condicionada por la periodicidad de muestreo y el coste que supone aumentar su frecuencia. En el caso de los contaminantes hidrofóbicos, además, la fracción de masa de contaminante que reside en la fase disuelta suele ser muy baja, órdenes de magnitud inferior a la que puede haber asociada a partículas o a biota. Como vimos en la sección anterior, estos compuestos tienen un alto potencial de geoacumulación y bioacumulación, por lo que los sedimentos o las partículas en suspensión (una u otra dependiendo del dinamismo del agua) y la biota resultan ser matrices más adecuadas para su control. Por otra parte, los cambios de la contaminación en estos compartimentos no son tan rápidos como en la columna de agua, de modo que estas matrices integran la contaminación en el tiempo y el espacio. Por ello, el análisis de estas matrices proporciona una medida más representativa de la calidad general del cuerpo de agua y son especialmente útiles en la estimación de tendencias a largo plazo (Ridgway & Shimmield, 2002).

Además de integrar información de la contaminación de largos periodos de tiempo, los sedimentos y las partículas, en general, constituyen una parte dinámica del ciclo hidrológico, al estar sujetas a transporte, deposición y erosión, y representan potenciales fuentes secundarias de contaminación de la columna de agua. Puesto que la capacidad de acumulación aumenta con el área superficial de las partículas, es recomendable analizar la fracción más fina (<0.063 mm) del sedimento –o bien hacer una normalización asumiendo que todo el contaminante en la muestra es retenido por esa fracción--, de manera que los resultados puedan ser comparados espacialmente independientemente de la granulometría del lugar (Carere *et al.*, 2012). Además, es habitual que las medidas sean también normalizadas al contenido de C orgánico del sedimento, ya que de él depende la capacidad de retención de los contaminantes hidrofóbicos (ver apartado 1.2.1).

La medición de la acumulación de contaminantes en los organismos vivos, que actúan como “biomonitores” o “bioindicadores”, es ampliamente utilizada para determinar los niveles ambientales de POP, como ejemplifican los *Mussel Watch Programs*, que utilizan mejillones para monitorizar el estado de las aguas costeras en varios países desde hace años (Goldberg, 1975; CIESM, 2002; Monirith *et al.*, 2003). Los residuos en los tejidos del cuerpo del organismo son un indicador más adecuado de sus efectos adversos potenciales y riesgo ecológico que la concentración en el agua ya que, además de ofrecer una medida de la contaminación integrada en el tiempo, proporcionan una idea más directa de la biodisponibilidad y de la salud global de un sistema acuático. En este caso, además de buscar una especie que sea representativa de la masa de agua en cuestión y que acumule y/o que se vea afectada por los contaminantes estudiados, se ha de poner especial cuidado en que pueda ser muestreada de manera regular sin poner en peligro

a la población del lugar y que su tamaño pueda proporcionar una cantidad suficiente de tejido para el análisis químico (AMPS, 2005). Cuando se trata de organismos de cierto tamaño, en lugar de analizar el individuo completo, se suelen analizar los órganos grasos y se suelen normalizar al contenido en lípidos de la muestra, ya que es en ellos donde se acumulan los contaminantes hidrofóbicos. El uso de organismos vivos, sin embargo, conlleva varios inconvenientes. El hecho de que cada especie viva en ambientes de un determinado tipo hace que no se pueda utilizar la misma especie en cualquier sitio, especialmente en ambientes altamente contaminados, así como la variabilidad entre especies, que hace difícil obtener resultados comparables. Por otra parte, la respuesta a estresores y las tasas de bioacumulación varían dependiendo de factores ambientales y la propia variabilidad biológica, incluso entre individuos de la misma especie. A esto hay que añadir las consideraciones éticas personales que implica la utilización de animales para provecho humano.

A este respecto, la Directiva de normas de calidad ambiental 2008/105/EC (EQSD, de *Environmental Quality Standards Directive*), una de las directivas hijas de la WFD (2000/60/EC), supone un paso importante en el uso de sedimento y biota para la estimación del estado químico de los cuerpos de agua. Además de establecer normas de calidad ambiental (NCA o EQSs, de *Environmental Quality Standards*) para agua, en ella se hace una referencia explícita al uso de sedimentos y biota como matrices de referencia, permitiendo a los estados miembros el establecimiento de NCA a nivel nacional para estas matrices alternativas en lugar de los NCA para agua (establecidos a nivel europeo). La Guía sobre monitoreo de sedimento y biota (EC, 2010), elaborada como parte de la Estrategia de Implementación Común (CIS, de *Common Implementation Strategy*) de la WFD y directivas hijas, proporciona recomendaciones prácticas para identificar la matriz de monitoreo más apropiada para cada sustancia, basándose en sus propiedades físico-químicas y en las características del cuerpo de agua. Como regla general, los compuestos con un $\log K_{ow} > 5$ deben medirse preferentemente en los sedimentos, o en la materia particulada en suspensión (SPM, de *sedimentary particulate matter*), mientras que la determinación de los compuestos con un $\log K_{ow} < 3$ debe hacerse preferentemente en muestras de agua. Para los compuestos con un $\log K_{ow}$ intermedio, se puede elegir entre sedimento o SPM y agua, dependiendo de las condiciones específicas del lugar (p. ej., el contenido de SPM, las características químicas del sedimento y la concentración de los contaminantes en el agua o las condiciones hidrodinámicas). El criterio principal para la selección de compuestos a estudiar en biota es su preferencia físico-química por los tejidos biológicos, así como la eficiencia con que es metabolizado o depurado por las diferentes especies. El control de las sustancias orgánicas se debe realizar en la biota cuando el BMF es > 1 , o el BCF es > 100 . Sin embargo, si no se dispone de datos de una medida válida del BMF, el BCF o el BAF, un $\log K_{ow} > 3$ puede considerarse un indicador del potencial de bioacumulación (Carere *et al.*, 2012). La frecuencia mínima de muestreo requerida para contaminantes prioritarios depende asimismo de la matriz. En agua esta periodicidad ha de ser al menos mensual para los contaminantes habituales, mientras que en sedimento o biota puede espaciarse a una vez al año, excepto cuando por criterios técnicos expertos se justifique otra periodicidad.

En cualquier caso, la selección de los componentes ambientales a analizar puede ser fuente de error si no se hace una interpretación adecuada reconociendo y teniendo en cuenta las variaciones en el comportamiento ambiental de cada compuesto (Wu *et al.*, 2008). Como se comentó en el apartado sobre distribución ambiental de los PBDE (1.3.3.3), las diferencias en la absorción

del medio ambiente y la cinética de acumulación, la degradación metabólica y la biomagnificación de un nivel trófico a otro dan lugar a perfiles de contaminantes diferentes entre especies incluso similares y especialmente cuando se comparan muestras biológicas con los medios abióticos a que están asociados esos organismos (Tomy *et al.*, 2004; Stapleton, 2006; Streets *et al.*, 2006; Koistinen *et al.*, 2008). Estas diferencias pueden interferir y llevar a error en el uso de las concentraciones medidas en una determinada matriz para identificar fuentes y vías de transporte o para realizar estimaciones de factores de bioacumulación y de la exposición ambiental.

1.4.1.2. La fracción biodisponible

Los monitoreos de los compartimentos abióticos como agua y sedimento a los que nos acabamos de referir se basan tradicionalmente en la medición puntual de la concentración total de sustancias orgánicas o fracción completa de la muestra. De hecho, para compuestos orgánicos, las EQS de la WFD se expresan como concentraciones totales en las muestras de agua (Ademollo *et al.*, 2012). De igual manera, en el caso de los sedimentos se realizan determinaciones lo más exhaustivas posibles que incluyen tanto el contaminante disuelto en el agua de poro como el unido a geosorbentes. Estas medidas totales pueden considerarse necesarias para cumplir el principio de precaución (Gouin, 2010) e incluso suficientes si se realizan con la frecuencia adecuada. Sin embargo, como se comentó en el apartado 1.2, la capacidad de los organismos para asimilar los contaminantes requiere en primer lugar de su disponibilidad espacial y física. Esta capacidad difiere, p. ej., según estén en la fase disuelta o asociados a la fase sólida, donde incluso hay fracciones secuestradas por materiales condensados imposibles de asimilar. Además, puesto que la exposición total de los organismos depende del tiempo, su medida ha de establecerse dentro de un plazo determinado, e igualmente la que entendemos como concentración biodisponible de un compuesto determinado en cierta matriz ha de ser definida en un marco temporal. En este sentido, p. ej., una medida promediada en el tiempo de la concentración de un contaminante en agua permite una mejor precisión de la estimación de la exposición que una medida puntual (Pawliszyn, 2006).

Al tratarse de un concepto dinámico que abarca varias etapas, la incorporación de la biodisponibilidad en las medidas ambientales y su encaje en el ámbito regulatorio son complicados y, aunque se han hecho algunos progresos (Harmsen, 2007), la biodisponibilidad todavía continúa siendo más un tema de investigación que un parámetro utilizable. Dependiendo del tipo de organismo y su zona de influencia y de la escala temporal abarcada, la biodisponibilidad observada puede variar y podría haber numerosas definiciones específicas que habrían de ser, por fuerza, definiciones operacionales. Así, el término *biodisponible* se ha aplicado mayormente en el ámbito de la contaminación de suelos y sedimentos de una manera confusa refiriéndose a medidas relacionadas con la posibilidad de asimilación por los seres vivos pero que no siempre atienden exactamente a las mismas fracciones del contaminante. Tras la definición genérica del NCR de “procesos de biodisponibilidad” (NRC, 2003); ver 1.2.1), varios autores han tratado de acotar esta dispersión acuñando diferentes términos con una definición clara de trabajo en función de la fracción de contaminante a la que se refieren. Semple *et al.* (2004) comenzaron esta discusión científica proponiendo restringir el término “biodisponible” a aquello que está disponible para

cruzar la membrana celular de un organismo desde el medio que habita el organismo de manera inmediata, mientras que lo “bioaccesible” incluye la suma de lo que está disponible inmediatamente y lo que está limitado espacial o temporalmente pero puede hacerse disponible si se dan las condiciones apropiadas, es decir, potencialmente disponible. Reichenberg & Mayer (2006) distinguen entre “accesibilidad”, la cantidad de un contaminante que es o puede ser disponible en un espacio de tiempo y unas condiciones dadas (comparable a la bioaccesibilidad de Semple) y añade como concepto complementario la “actividad química”, es decir, la energía libre que determina el potencial para procesos fisicoquímicos espontáneos como difusión, sorción y particionamiento, que en el medio acuático está estrechamente relacionada con la fugacidad o la concentración libremente disuelta. En este caso, mientras que la accesibilidad siempre será una medida definida operacionalmente, la actividad química puede ser definida de manera precisa. En la figura 15 se representa de manera esquemática las fracciones de contaminante a que se refieren cada una de estas terminologías.

Cuando la solubilidad del contaminante es el principal factor que determina su asimilación por parte los organismos, las medidas que atienden a las fracciones de contaminante libremente disueltas (o las que pueden llegar a ese estado con cierta facilidad) son un predictor útil de la biodisponibilidad. Por ello, es importante entender qué fracción de un contaminante es cuantificada mediante cada procedimiento de muestreo y análisis específico y la comparación de estas fracciones con la biodisponibilidad medida usando un indicador biológico. Para que estas medidas sean útiles es esencial que las fracciones determinadas por análisis fisico-químicos puedan ser correlacionadas con la asimilación por parte de los organismos (McLaughlin & Lanno, 2014). En 2008 vio la luz un estándar ISO 17402 (ISO, 2008) que basa su terminología en la propuesta por Lanno *et al.* (2004). Esta reserva el término “biodisponibilidad” a aquellas medidas que tienen como objetivo de medida la bioacumulación o una respuesta biológica o bien aquellas medidas químicas o físicas que puedan ser correlacionadas con la fracción biológica. La medida de la fracción de contaminante que no está unida fuertemente a la matriz sólida mediante adsorción o envejecimiento y que es potencialmente disponible para los organismos por procesos de desorción inducidos físico-químicamente es referido en este caso como “disponibilidad ambiental” (Figura 15). La “biodisponibilidad ambiental”, en cambio, incluye la fracción del compuesto disponible ambientalmente que un organismo asimila a través de procesos inducidos fisiológicamente. En el marco de esta norma, los procesos relacionados con los efectos tóxicos de los contaminantes o su acumulación interna a los organismos son denominados “biodisponibilidad toxicológica” (Peijnenburg *et al.*, 1997; Lanno *et al.*, 2004; Harmsen, 2007). En el contexto de las evaluaciones de riesgos ecotoxicológicos, la biodisponibilidad con frecuencia se refiere simplemente a la disponibilidad ambiental. Cuando se determinan las concentraciones del contaminante en organismos expuestos, se puede evaluar la biodisponibilidad ambiental o incluso la biodisponibilidad toxicológica del contaminante para esas especies. En esta norma, sin embargo, no se incluyen las distinciones hechas por Semple o Reichenberg.

A día de hoy, la discusión en cuanto a la terminología sigue sin estar cerrada. No obstante, la adaptación en la ISO 17402 de la terminología de Lanno *et al.* (2004) es probablemente un paso definitivo en el camino hacia la inclusión del concepto en el ámbito regulatorio. Esta norma es, además, una guía para seleccionar métodos apropiados, que pueden medir o bien la concentración de contaminante presente en la fase acuosa (inmediatamente disponible) o la cantidad

de contaminante en el suelo o el sedimento que puede pasar a la fase acuosa y es disponible con el tiempo (potencialmente disponible). Desde un punto de vista analítico, y con fines normativos, no cabe duda de la importancia de determinar la concentración total o cuantitativa de un contaminante en una matriz dada, especialmente si se tiene en cuenta, por una parte, que los organismos están expuestos no solo a los contaminantes presentes en la fase disuelta por bioconcentración, sino también a los que están asociados a sólidos mediante la ingestión de partículas y, por otra parte, que esa asociación es, al menos en parte, reversible. Sin embargo, desde una perspectiva ambiental y toxicológica puede llegar a ser más importante o necesaria una medida de mayor relevancia biológica que distinga entre los contaminantes disueltos y los asociados a fases sólidas y, a ser posible, que abarque una escala temporal significativa para los seres vivos, al margen de la discusión conceptual y terminológica comentada arriba. De hecho, dependiendo de la perspectiva puede ser preferible la medida de una fracción u otra. La biodegradación, p. ej., depende de la biodisponibilidad inmediata, mientras que la bioacumulación de un contaminante puede depender más de la biaccesibilidad o biodisponibilidad potencial, por lo que en entornos de biorremediación puede ser más útil la primera, mientras que cuando se trata de evaluaciones de riesgo, la segunda es más apropiada.

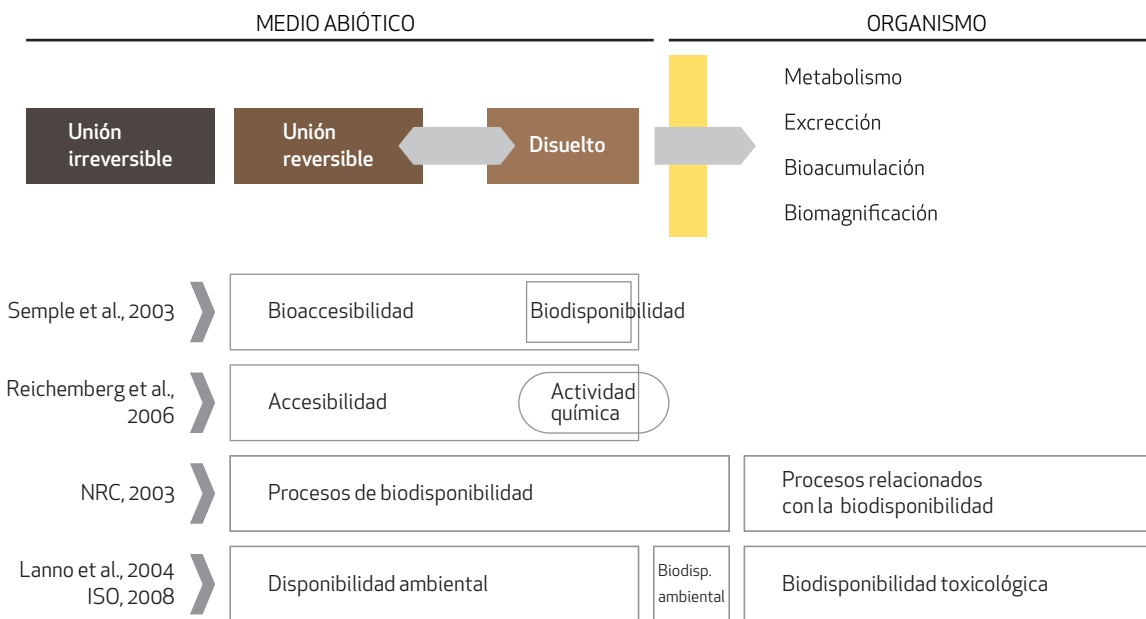


Figura 15. Representación esquemática de la terminología asociada al concepto de biodisponibilidad

1.4.2. Técnicas de determinación

Los protocolos convencionales de análisis de contaminantes orgánicos en matrices ambientales constan generalmente de varias etapas que comienzan por el muestreo o toma de la muestra y a la que sigue su preparación y tratamiento en el laboratorio, la separación y detección de los analitos, hasta llegar al análisis de datos final. Desde que en los años 70 comenzaron a analizarse los

POP en matrices ambientales, el rápido desarrollo de técnicas e instrumentación ha permitido un gran avance en la capacidad analítica y, por tanto, un incremento sustancial de la capacidad de control ambiental. Hoy en día es posible identificar y cuantificar con precisión y exactitud casi cualquier compuesto presente en matrices ambientales a concentraciones extraordinariamente bajas, con LOD que llegan en algunos casos al rango de los fentogramos. Durante mucho tiempo, el interés por mejorar la capacidad analítica se centró en las etapas de separación cromatográfica, detección y análisis de datos, poniendo énfasis en la correcta identificación de los analitos de interés en cada muestra y en la bajada de límites de detección y cuantificación, mientras que la toma y preparación de muestra han recibido mucha menor atención investigativa (Ramos & Smith, 2007). No obstante, a pesar de los progresos en el análisis instrumental, en la mayor parte de los métodos analíticos siguen siendo necesarias etapas complementarias de extracción, preconcentración, purificación y fraccionamiento, indispensables para aislar los analitos y eliminar los componentes de la matriz que pueden afectar a la separación o a la detección y que continúan siendo determinantes en el proceso global del análisis. Estos pasos previos al análisis instrumental acaparan la mayor parte del tiempo total de análisis de una muestra, especialmente en matrices complejas. Además, constituyen la mayor fuente de error del método analítico, al ser susceptibles de la pérdida de analitos y de la contaminación, por lo que determinan en gran medida la fiabilidad y la precisión final. El proceso analítico completo puede resultar en vano si la muestra no ha sido bien tomada o si su tratamiento ha sido inadecuado, si el extracto final no es representativo de la muestra original, está demasiado diluido o contiene tanto material interferente que enmascare el compuesto de interés o contamine el instrumento.

El desarrollo de técnicas que mejoren las etapas de toma y preparación de muestra en términos de rapidez, fiabilidad y sensibilidad es, por tanto, una necesidad acuciante —especialmente si se quiere dar valor a todos los avances alcanzados en cromatografía y en detección— y en los últimos años han comenzado a recibir cierta atención especial (Meyer & Majors, 2002; Pawliszyn, 2003). Si bien todavía se usan muchos métodos tradicionales, se han introducido nuevas ideas y se han desarrollado tecnologías que se caracterizan por la búsqueda de metodologías con las que se reduce la duración de estas etapas, tratando de acoplar el tiempo de preparación de muestra al tiempo de análisis instrumental. En general, se ha puesto mucho interés en la simplificación de las operaciones y la reducción del número de pasos. En este sentido, cuando es posible, se tiende a la automatización y al desarrollo de sistemas analíticos *on-line* o integrados, que reducen el tratamiento manual de la muestra, potencial fuente de error y variabilidad que en ocasiones dificulta la validación de las mediciones para cumplir con los crecientes requisitos legislativos en cuanto a precisión y exactitud. Se ha dedicado mucho esfuerzo también al desarrollo de métodos más selectivos, que permiten el análisis de matrices más difíciles al reducir la presencia de interferencias y la contaminación de la instrumentación y las columnas y métodos que proporcionan un mayor factor de concentración, disminuyendo el tamaño de muestra necesario incluso para análisis traza. Además, la preocupación por la contaminación ambiental ha comenzado a aplicarse, por fin, a los propios procedimientos de la química analítica bajo los principios de la llamada “química verde” (Welch *et al.*, 2010). Fruto de ello, y también con el fin de reducir costes, hay una tendencia al desarrollo de técnicas de preparación de muestra que reducen el volumen de disolventes utilizados (las llamadas técnicas *solvent-less*), así como de otros reactivos y adsorbentes, y consecuentemente disminuyen la cantidad de residuos generados.

Por otra parte, sin dejar de lado la importancia de estos avances, encaminados directa o indirectamente a medir virtualmente todos los POP de la manera más precisa en el límite de detección más bajo posible –muchas veces más allá de los umbrales de concentración que pueden generar efectos ambientales adversos conocidos–, cabe preguntarse en qué grado la información así obtenida es significativa. Una vigilancia rutinaria de las concentraciones abióticas y bióticas de los POP *per se* podría ser de utilidad limitada si los datos obtenidos no pueden ser relacionados directamente con la determinación de los riesgos para la salud pública y ecológica. Esta representatividad de las medidas recae fundamentalmente en las etapas de muestreo y extracción. De hecho, hoy en día, solventadas o mejoradas muchas de las dificultades que añaden variabilidad en el tratamiento de la muestra, los principales errores en las mediciones de campo se deben a la heterogeneidad espacial y temporal, más que a errores durante el análisis. Además, como se comentó en la sección anterior (1.4.1), los métodos tradicionales para evaluar el impacto ecológico de sustancias antropogénicas a partir de los niveles en muestras abióticas con los procedimientos habituales de toma de muestra puntual y extracción total, a menudo cargan en sus predicciones sesgos específicos de la matriz que dificultan la interpretación de su relevancia biológica (Greenwood *et al.*, 2009; Cui *et al.*, 2013). Aun cuando se utiliza una matriz integradora en el tiempo como es el sedimento, el enfoque tradicional para predecir el riesgo de contaminantes orgánicos hidrofóbicos en el sedimento es relacionar las concentraciones en los sedimentos normalizadas al carbono orgánico con los residuos corporales o los efectos tóxicos en los organismos. Este método, sin embargo, se ve limitado por la gran cantidad de variables que pueden influir en la biodisponibilidad (ver 1.2.1). Aunque la medida más representativa del impacto de un contaminante viene dada claramente por la determinación de su concentración acumulada o de marcadores de su presencia en la propia biota, como ya se ha dicho, la utilización de animales implica una serie de inconvenientes técnicos y éticos. Por ello, paralelamente a todas las mejoras de carácter “técnico” mencionadas más arriba, existe también una corriente que trata de desarrollar técnicas y métodos de recogida y extracción de muestra que proporcionen medidas más fáciles de interpretar en términos de representatividad biológica, tanto espacial como temporal. Mientras que la comprensión teórica de la unión de los contaminantes a la fase particulada continúa evolucionando, es necesario un enfoque práctico para abordar los problemas de sedimentos contaminados actuales. Se necesita, por tanto, un método independiente de la matriz aplicable universalmente para predecir la biodisponibilidad. Así, durante las dos últimas décadas, se han explorado una serie de métodos biomiméticos que tienen por objeto proporcionar una idea de la exposición o la biodisponibilidad de los compuestos hidrofóbicos que permitan estudiar y predecir los riesgos generados por estos contaminantes desde una mejor base de partida.

En cualquier caso, la aplicabilidad de una metodología analítica determinada depende de la fracción de contaminante que se quiera determinar y, por tanto, se ha de poner especial cuidado en la selección de las técnicas de toma y preparación de muestra, y en la optimización de las condiciones metodológicas para que se ajusten a los objetivos reales de medición. La Figura 16 relaciona las distintas fracciones existentes en el medio abiótico de los sistemas acuáticos con los tipos de técnicas que permiten su determinación. A continuación se hace una descripción de las principales técnicas analíticas empleadas en el análisis de POP en matrices ambientales, con énfasis en las técnicas que han sido empleadas para DDX y PBDE.

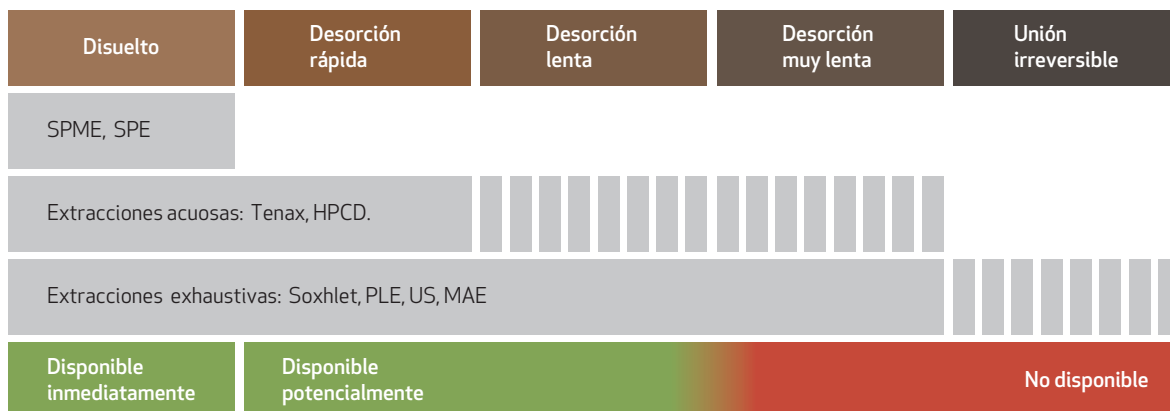


Figura 16. Relación entre las distintas fracciones de un contaminante orgánico en el medio acuoso, su biodisponibilidad y las técnicas analíticas para su determinación. La fracción extraída mediante extracciones exhaustivas dependerá de su agresividad y su capacidad para destruir la matriz. La fracción extraída mediante extracciones acuosas depende de la duración de la extracción.

1.4.3. Toma de muestra y conservación

La toma de muestra es la etapa clave de la que depende la representatividad del análisis respecto al medio o la población que se quiere estudiar. Las medidas a tomar para asegurar esa representatividad, tales como el número de réplicas y la periodicidad del muestreo, dependen de los objetivos del estudio, de las propiedades de la matriz en cuestión y de cuestiones relacionadas con la logística y los costes. Esto implica, p. ej., en el caso de muestras de sedimento de río, que sean tomadas del lecho cercano a la orilla, donde la energía del agua es menor y tiene lugar una mayor deposición de los materiales en suspensión. La profundidad, en cambio, depende del periodo de tiempo que se quiera abarcar, desde el uso de trampas y cajas de sedimentación para el muestreo de los sedimentos de deposición reciente o la recogida de los 1-5 centímetros más superficiales del lecho (dependiendo de la tasa de sedimentación) (Carere *et al.*, 2012), hasta la utilización de testigos cuando se quiere ver la evolución en la escala temporal. Cuando se toman muestras de biota en los ríos, p. ej., si la especie es móvil, como en el caso de peces, se intenta seleccionar puntos de muestreo que estén separados por barreras físicas que impidan su paso (p. ej. una presa). Además de la selección de edades y sexos, es importante también tener en cuenta la variabilidad estacional de las reservas lipídicas de la especie muestreada. Las muestras de agua generalmente se toman de manera discreta o puntual, con una periodicidad limitada por los costes. En ocasiones se recogen de manera integrada o compuesta con dispositivos automáticos que toman pequeñas alícuotas de muestra a intervalos sucesivos, de manera que la muestra final se usa como representativa de la “media” durante el tiempo de muestreo. En el laboratorio se realiza la selección de la fracción de interés, ya sea por filtrado (muestras acuosas) o por tamizado (sedimentos).

La cantidad de muestra requerida depende de la carga de contaminante prevista en la muestra y de la sensibilidad de la técnica de detección ulterior. Como precauciones generales, el muestreo, al igual que el resto del proceso, ha de hacerse con materiales adecuados que no alteren la composición de la muestra por contaminación, y adoptar las medidas necesarias para su preservación antes del análisis, que incluyen conservación a baja temperatura, protección de la luz (muy importante para los compuestos sensibles como es el caso del BDE-209), y/o adición de

reactivos que eviten la degradación microbiana en muestras acuosas. En el caso de los compuestos hidrofóbicos como PBDE y DDX, y cuando no se utiliza vidrio desactivado, la conservación de muestras acuosas puede incluir la adición de un porcentaje de metanol que prevenga de la pérdida de analitos de interés por adsorción a la superficie del recipiente contenedor.

1.4.4. Preparación de muestra

Generalmente, antes del análisis instrumental final, es necesario un tratamiento previo de la muestra que consiste básicamente en su homogeneización, la extracción de los analitos de la matriz, la purificación del extracto y, finalmente, su concentración. Las técnicas empleadas dependen del tipo de matriz a analizar, sólida o líquida, y de la complejidad que ésta presente. Normalmente, las técnicas convencionales tienen como objetivo la extracción exhaustiva de todo el contaminante presente en la matriz, por lo que el primer parámetro que se tiene en cuenta para evaluar la bondad de un método o técnica es el porcentaje de recuperación de analito en el extracto final. Los principales obstáculos a que se enfrenta el analista son la complejidad de algunas matrices ambientales (especialmente biota) y las bajas concentraciones en que se suelen encontrar los compuestos de interés, sobre todo en el caso de compuestos emergentes. En familias de compuestos como los PBDE, el desarrollo de métodos de análisis conlleva, además, la dificultad de abordar el amplio intervalo de propiedades físico-químicas que cubren y las consecuentes diferencias de comportamiento durante el análisis.

Para contaminantes semivolátiles, como el DDT y los PBDE, las técnicas de preparación de muestra clásicas se basan en el uso de líquidos o fluidos que arrastran los compuestos de interés. Como comentábamos más arriba, en los últimos años han derivado hacia una amplia variedad de modalidades que reducen el consumo de disolventes y reactivos al tiempo que aportan una mayor eficiencia y reproducibilidad. Para analitos volátiles presentes en muestras líquidas o sólidas, es frecuente el uso de técnicas de extracción en la fase vapor mediante purga de la muestra, como el espacio de cabeza (HS, del inglés *head space*) o el *Purge & Trap*, ya que producen extractos limpios y pueden conectarse *online* con el cromatógrafo de gases. Estas técnicas también pueden ser una buena opción para compuestos semivolátiles cuando se emplean modos de muestreo de los compuestos de alta capacidad como las microextracciones que se comentarán en el siguiente apartado (Salgado-Petinal *et al.*, 2006; Mmualefe *et al.*, 2009).

1.4.4.1. Extracción de muestras acuosas

Dada la baja solubilidad de los compuestos haloaromáticos y su tendencia en el medio acuoso a asociarse a la fase particulada, el esfuerzo dedicado al desarrollo de métodos para su estudio en agua no ha sido tan importante como el dedicado a matrices ambientales sólidas (Vonderheide *et al.*, 2008). Esto es especialmente cierto en el caso de los PBDE, cuyas bajas concentraciones en el agua constituyen una limitación en el uso de muchas técnicas de análisis convencionales que no proporcionan los LOD necesarios. La EQSD, p. ej., establece un límite para la media anual de PBDE (suma de BDE-28, BDE-47, BDE-99, BDE-100, BDE-153 y BDE-154) en aguas superficiales continentales y otras aguas superficiales de 0.5 y 0.2 ng/L, respectivamente, y

de 25 ng/L para suma de DDX en todas las aguas superficiales, lo que implica utilizar métodos analíticos con LOQs de 0.35, 0.014 y 175 ng/L (un 30% por debajo de los valores límite) (EU, 2008; Lepom *et al.*, 2009).

La clásica extracción líquido-líquido (LLE, del inglés *Liquid-Liquid Extraction*) de agitación con disolventes apolares, sigue siendo ampliamente utilizada para compuestos hidrofóbicos, incluyendo los DDX (Veljanoska-Sarafiloska *et al.*, 2013) y los PBDE (Robles-Molina *et al.*, 2010). Sin embargo, la extracción en fase sólida (SPE, de *Solid Phase Extraction*), que se basa en el empleo de sorbentes que retienen los analitos al pasar la muestra acuosa a través de ellos y son posteriormente eluidos con disolventes, es, actualmente, la técnica de preferencia para muestras líquidas (Covaci *et al.*, 2007; Sánchez-Avila *et al.*, 2011), con una cada vez más amplia gama de fases sólidas preempaquetadas más o menos selectivas y equipos automatizados e incluso conectados en línea con el cromatógrafo. Además, mediante el uso de columnas multicapa, la SPE permite simultanear la extracción y la purificación, lo que reduce significativamente el consumo de disolventes y también el grado de manipulación de la muestra (Ramos *et al.*, 2007b).

Actualmente existen, además, toda una serie de técnicas enmarcadas en las tendencias de simplificación, miniaturización y reducción del consumo de reactivos y disolventes mencionadas al principio de esta sección, y se han aplicado para el análisis de diversos contaminantes orgánicos, incluyendo DDX y PBDE (Tabla 7). Esas técnicas incluyen sistemas miniaturizados de LLE y de SPE.

Las formas miniaturizadas de LLE, llamadas microextracción en fase líquida (LPME, de *Liquid-Phase Micro Extraction*) o microextracción en solvente (SME, de *Solvent MicroExtraction*) (Zhao *et al.*, 2002), evitan al menos algunos de los problemas asociados con la LLE convencional, como el consumo de disolvente, que se reduce drásticamente. La LPME se puede hacer en distintos modos y “submodos”, a los que se ha dado muchos nombres diferentes que se refieren al mismo principio pero con diferentes configuraciones. El modo más sencillo es la microextracción en gota sencilla (SDME, de *Single-Drop MicroExtraction*), que utiliza una gota de disolvente como fase extractante (Li *et al.*, 2007) reduciendo el volumen de disolventes utilizado al mínimo (nanolitros o microlitros). La LPME asistida con membrana (MASE, de *Membrane-Assisted Extraction*), cuyos poros y lumen hacen de soporte al extractante orgánico (microlitros), ya sea en modo de fibras huecas (HF, de *Hollow-Fibres*), o membranas en forma de bolsas o láminas (Fontanals *et al.*, 2006). Una tendencia más reciente en LPME es la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME, de *Dispersive Liquid-Liquid MicroExtraction*). En ella, la extracción de los analitos se lleva a cabo en un pequeño volumen de disolvente orgánico que se dispersa en la muestra acuosa gracias a una tercera fase líquida inmiscible en muestra y extractante y a veces ayudado con ultrasonidos o con agitación (Rezaee *et al.*, 2006; Fontana *et al.*, 2009).

Por otra parte, en los últimos años, se ha extendido el uso de técnicas que utilizan un polímero absorbente que actúa como una fase líquida inmovilizada donde los analitos se disuelven estableciendo un equilibrio con la fase acuosa. La microextracción en fase sólida (SPME, del inglés *Solid Phase Microextraction*) (Arthur & Pawliszyn, 1990), que ha sido aplicada tanto en el análisis de DDT como de PBDE (Polo *et al.*, 2004; Ratola *et al.*, 2006; Mmualafe *et al.*, 2009) emplea una fibra químicamente inerte de sílice fundida recubierta con una capa fina de la fase extractiva polimérica. La fibra es puesta en contacto con la muestra por inmersión directa en la misma (DI-SPME, de *Direct Immersion*) o con el espacio de cabeza en el vial (HS-SPME, de

Head Space), de manera que se produce una partición del analito entre la fase polimérica y la muestra. El recubrimiento convencional tiene un grosor de 100 μm y un volumen total de unas 0.5 μL por fibra, con lo que generalmente no se consigue una extracción exhaustiva cuantitativa. La microextracción en capa fina (TFME, de *Thin-Film MicroExtraction*) es un formato más reciente que utiliza una lámina en lugar de una fibra y cuyo atractivo reside en su mayor relación superficie/volumen (Jiang & Pawliszyn, 2012). En la extracción por sorción en barra agitadora (SBSE, de *Stir Bar Sorptive Extraction*) la fase polimérica (entre 50 y 300 μL) cubre una barra magnética agitadora de 10-40 mm de largo con una chaqueta de vidrio (Baltussen *et al.*, 1999; Llorca-Porcel *et al.*, 2006; Camino-Sánchez *et al.*, 2012). Al igual que en la SPME, también puede utilizarse en modo inmersión o en modo espacio de cabeza y el proceso de extracción depende de los coeficientes de partición entre el analito y la fase extractante. Puesto que el volumen de fase sólida es unas 100 veces mayor que en la SPME, se pueden extraer mayores cantidades de analito de la muestra, por lo que tiene una mejor sensibilidad y se puede alcanzar una extracción cuantitativa. El polidimetilsiloxano (PDMS) es el polímero más utilizado tanto en SPME como en SBSE, ya que es adecuado para la extracción de compuestos hidrofóbicos en muchos tipos de matrices. No obstante, en la última década se han desarrollado otras fases poliméricas como, p. ej., poliacrilato (Rico-Rico *et al.*, 2010) o polidimetilsiloxano divinilbenzeno (Wu & Ding, 2010) que pretenden ampliar las aplicaciones de estas técnicas. Tras la extracción, la desorción de los analitos concentrados en las fibras de SPME o las barras de SBSE puede conseguirse por la aplicación de altas temperaturas que volatilizan los compuestos, de manera que son arrastrados por una corriente de gas directamente al cromatógrafo (evitando el uso de disolventes). Además, ambas pueden utilizarse también asociadas a métodos de purga de la muestra, p. ej. HS, tanto en el caso de muestras acuosas como sólidas, lo que puede acortar el tiempo de extracción de la muestra significativamente, debido a la mayor tasa de difusión de los analitos en la fase gaseosa que en la solución acuosa (Salgado-Petinal *et al.*, 2006; Mmualefe *et al.*, 2009). En general, la SPME y la SBSE son atractivas porque combinan aislamiento, concentración y enriquecimiento en un solo paso, con lo que se reduce el tiempo de preparación de muestra. Además requieren volúmenes de muestra pequeños e incluso pueden utilizarse directamente en el campo como muestreadores pasivos (ver apartado 1.4.4.1), lo que simplifica aun más las etapas previas al análisis instrumental.

Por último, la miniaturización de la SPE también permite una reducción del disolvente y acoplamiento en línea, que aporta rapidez y sensibilidad. Esta tendencia se ha basado principalmente en el uso de fases extractivas como fibras, gránulos, y adsorbentes que son empaquetadas de manera reproducible en tubos, capilares, jeringas, agujas e incluso puntas de micropipeta (Barri, 2009). Una de ellas es la microextracción en sorbentes empaquetados (MEPS, de *MicroExtraction in Packed Sorbents*) donde el sorbente es integrado en una jeringa de líquidos que permite la manipulación de la muestra con poco volumen vacío y reduce el tiempo de manipulación unas 30 y 100 veces en comparación con la SPME y SBSE, respectivamente, ahorrando tiempo y recursos. Puede ser conectado al cromatógrafo de gases o de líquidos sin modificaciones y ser completamente automatizado. Aunque la mayoría de las aplicaciones se han hecho en muestras biológicas y compuestos hidrófilos (Páleníková & Hrouzková, 2014), ya ha comenzado a utilizarse en muestras ambientales para compuestos como PAH y pesticidas organoclorados (Prieto *et al.*, 2010).

Un aspecto al que no siempre se dedica suficiente atención es la fiabilidad del método empleado en cuanto a la extracción del contaminante asociado a la fase particulada tanto en casos en que se pretende analizar la muestra de agua completa (como requiere la WFD, p. ej.) como en aquellos en que se asume que se está midiendo el contaminante en la muestra filtrada a un determinado tamaño de partícula. Si se aplica un proceso de extracción único, y no separación de fases previa y extracción con distintos métodos, algunos de los métodos descritos para la extracción de muestras de agua, requerirían de una etapa previa en la que se indujese la desorción de los contaminantes asociados a partículas, que, de no hacerse, pueden no ser extraídos y, por tanto, subestimar la carga de contaminante de la muestra (Wolska, 2008; Ademollo *et al.*, 2012; Hanke *et al.*, 2012). Por otra parte, cuando se trata de medir la fracción disuelta de contaminantes hidrofóbicos, es una práctica común filtrar las muestras a 0.45 µm antes de la extracción, ya que los filtros con un diámetro de poro menor se saturan muy rápidamente. Sin embargo, las medidas obtenidas de esa manera incluyen la fracción unida a la DOM y a los coloides de la muestra. Si el objetivo del estudio es la determinación de la actividad química del contaminante, la captación molecular de técnicas como la SPME o la SBSE puede ser considerada una ventaja, ya que sólo extraen la fracción realmente disuelta (ver apartado de técnicas biomiméticas 1.4.5).

Tabla 7. Comparación de métodos de extracción de muestras líquida (Hyötyläinen, 2009).

Condiciones típicas	LLE	SPE	SPME	SBSE	MicroSPE	SDME	MASE
Tamaño de muestra (mL)	1-1000	1-100	0.5-20	1-100	0.01-0.1	1-100	0.1-100
Tiempo de extracción (min)	2-30	2-10	10-90	90-720	2-10	10-120	10-120
Volumen de disolvente (mL)	10-200	1-5	-	-	0.01-0.5	0.001-0.005	0.01-0.5
Eficiencia de extracción	Cuantitativa	Cuantitativa	No cuantitativa	No cuantitativa - Cuantitativa	Cuantitativa	No cuantitativa	No cuantitativa
Factor de concentración	Bajo	Medio	Alto	Alto	Medio	Alto	Alto
Simplicidad	Alta	Media	Media	Media	Media	Media	Media
Automatización	Baja	Alta	Alta	Moderada	Alta	Baja	Moderada-Alta
Robustez/ Repetibilidad	Media	Buena	Media	Buena	Buena	Media	Buena
Parámetros a optimizar	- tipo de disolvente - fuerza iónica - pH - volumen de disolvente	- tipo de adsorbente - purificación - disolvente de elución - volumen de disolvente	- modo de muestreo - tipo y grosor del recubrimiento - tiempo - pH - fuerza iónica - agitación - temperatura - condiciones de desorción - procedimiento de calibración	- modo de muestreo - tipo de recubrimiento - tiempo - temperatura - pH - fuerza iónica - condiciones de desorción - procedimiento de calibración	- tipo de adsorbente - purificación - disolvente de elución - volumen de disolvente	- tipo de disolvente - volumen de la gota - fuerza iónica - pH - tiempo de extracción - agitación - forma de la punta de la aguja - temperatura	- tipo de disolvente - volumen de disolvente - fuerza iónica - pH - tiempo de extracción

Tabla 7. (Continuación)

Condiciones típicas	LLE	SPE	SPME	SBSE	MicroSPE	SDME	MASE
Coste por análisis	Bajo	Medio	Bajo	Bajo		Bajo	Bajo
Coste de la instrumentación	Bajo	Medio	Medio	Medio		Bajo	Bajo

LLE: extracción líquido-líquido; SPE: extracción en fase sólida; SPME: microextracción en fase sólida; SBSE: extracción por sorción en barra agitadora; MicroSPE: microextracción en fase sólida; SDME: microextracción en gota sencilla; MASE: microextracción en fase líquida asistida con membrana

1.4.4.2. Extracción de muestras sólidas

Las muestras sólidas, tanto en el caso de los sedimentos como en biota, necesitan de un pretratamiento que implica su triturado y homogenización y generalmente también su secado —ya sea adicionando sulfato sódico anhidro o por liofilización— con el fin de facilitar el acceso a la matriz de los disolventes apolares utilizados en la extracción posterior.

El Soxhlet, donde la muestra es extraída por un disolvente que recircula a través de ella gracias a ciclos de evaporación y condensación, ha sido la técnica más ampliamente utilizada para la extracción de POP en matrices complejas. Hoy en día, pese a requerir periodos de extracción de horas, sigue siendo la técnica de referencia por su eficiencia, robustez y bajo coste para compuestos hidrofóbicos, DDX y PBDE incluidos (USEPA, 2007; Covaci *et al.*, 2007).

Las técnicas de desarrollo más reciente incorporan el empleo de distintos tipos de energía para acelerar el proceso de extracción manteniendo (o incluso mejorando en muchos casos) la eficiencia del Soxhlet. Así, actualmente, existe una variedad de opciones que permiten reducir el tiempo de extracción a minutos y también el uso de disolventes orgánicos, lo que trae como consecuencia una disminución de la contaminación y de los costes del análisis (Tabla 8). Dentro de este grupo, la Extracción asistida con ultrasonidos (US o UAE, del inglés *Ultrasound Assisted Extraction*, o SAE, de *Sonication Assisted Extraction*) aplica radiación de ultrasonidos en un baño o con una sonda a una muestra dispersada en disolvente. Los ultrasonidos inducen la cavitación del disolvente extractante e incrementan el proceso de transferencia de masa de los analitos a la fase líquida, que se separa luego de la muestra por centrifugación o filtrado. Para conseguir extracciones eficientes, el proceso se suele repetir dos o tres veces, lo que la hace difícil de automatizar. Es una técnica que ha demostrado ser útil tanto para el análisis de DDX (USEPA, 1996a; Xue *et al.*, 2008) como de PBDE (Vilaplana *et al.*, 2008; Cristale & Lacorte, 2013), especialmente en sedimento. La Extracción asistida por microondas (MAE, de *Microwave Assisted Extraction*) (Li *et al.*, 1997; Bayen *et al.*, 2004; Vilaplana *et al.*, 2009) se basa en la utilización de energía de microondas para calentar el disolvente en contacto con la muestra. Esta energía térmica proporcionada facilita la capacidad del disolvente para penetrar en la matriz y solubilizar los analitos, al tiempo que ayuda a la rotura de los enlaces entre los analitos y la matriz y favorece la difusión del analito. La elección del disolvente de extracción debe hacerse con cuidado, ya que tiene que ser polar y absorber este tipo de radiación. Generalmente se requiere una etapa de

filtración o de purificación antes del análisis final y no es posible su acoplamiento online con el cromatógrafo. Aunque de uso menos extendido, la Extracción con fluidos supercríticos (SFE, de *Supercritical Fluid Extraction*) también resulta ventajosa para la extracción de analitos no polares. Emplea dióxido de carbono puro (CO₂) como medio de extracción en lugar de disolventes orgánicos. Los fluidos supercríticos tienen una viscosidad menor que la de los líquidos y coeficientes de difusión mayores, lo que aumenta la tasa de penetración del fluido en la muestra y la eficiencia de la extracción. Los analitos extraídos son atrapados en un disolvente orgánico o en una fase sólida. La selectividad de la SFE puede ser controlada optimizando las condiciones de temperatura y presión del fluido supercrítico (CO₂) y añadiendo modificadores (como metanol). La SFE es atractiva principalmente por las bondades del CO₂ como medio de extracción en comparación con los disolventes orgánicos generalmente empleados en otras técnicas, que suelen ser tóxicos y/o inflamables y los extractos son muy limpios. Ha sido empleada tanto en la extracción de DDX (van der Velde *et al.*, 1992; Zuloaga, 2001) como de PBDE (Rodil *et al.*, 2005; Vilaplana *et al.*, 2008).

De desarrollo más reciente es la Extracción con líquidos presurizados (PLE, del inglés *Pressurized Liquid Extraction*), también llamada extracción acelerada con disolventes (ASE, del inglés *Accelerated Solvent Extraction*), se basa en la extracción con disolventes a alta temperatura, gracias a una presión suficientemente alta para que este se mantenga en estado líquido por encima del que sería su punto de ebullición a presión atmosférica. La PLE es una técnica completamente automatizada que reduce el tiempo de extracción de horas a minutos y puede reducir el consumo de disolvente hasta un 90% con respecto al Soxhlet. Por otra parte, permite la inclusión de la etapa de purificación en un único paso junto con el proceso de extracción. Por estos motivos fue la técnica seleccionada para los análisis de DDX y PBDE en sedimentos y biota realizados durante el desarrollo de esta tesis, como se verá en el capítulo 2 de esta memoria. Su éxito para el análisis de compuestos orgánicos en matrices ambientales ha ido en aumento desde entonces (ver Tabla 12, en el capítulo 2). Cuando en lugar de disolventes orgánicos se utiliza agua a altas temperaturas y presiones la técnica se conoce como Extracción con agua caliente presurizada (PHWE, del inglés *Pressurized Hot Water Extraction*), Extracción con agua sobrecalentada (SHWE, de *Superheated Water Extraction*) o extracción con agua subcrítica (SWE, de *subcritical water extraction*), mucho menos extendida que la PLE normal (Kronholm *et al.*, 2007).

Por otra parte, en los últimos años se han descrito algunas técnicas menos costosas a nivel instrumental. En la dispersión de matriz en fase sólida (MSPD, de *Matrix Solid Phase Dispersion*) la muestra es molida con la matriz sólida y es empaquetada en una columna por la que se pasa un disolvente apropiado que eluye los analitos. Es una técnica atractiva por su simplicidad y flexibilidad, no necesita preparación ni mantenimiento de equipos y ofrece la posibilidad de simultanear la extracción y la purificación (Baker, 2007). Además requiere poca cantidad de muestra, tiene un tiempo de extracción corto y usa menos disolvente que las técnicas convencionales. Sin embargo, el aspecto negativo es la poca automatización y que la molienda de la muestra con la fase sólida es trabajosa. Se ha utilizado, p. ej., para el análisis de DDX y de PBDE en peces (Labadie *et al.*, 2010a; Hela & Papadopoulos, 2013). En esta línea, el método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*), originalmente desarrollado para el análisis de residuos de pesticidas en vegetales (Anastassiades *et al.*, 2003), comienza ahora a ser empleado para análisis ambientales, entre ellos DDX en suelos (Rashid *et al.*, 2010) y PBDE en peces (Fontana *et al.*, 2011).

La elección de un método de extracción u otro depende de la naturaleza de la matriz que se desea analizar. La selección del disolvente o mezcla de disolventes depende, asimismo, de la técnica de extracción y de las características de la matriz. Las condiciones de extracción han de ser optimizadas cuidadosamente, especialmente la temperatura, para obtener una eficiencia de extracción máxima sin que se produzca descomposición, p. ej. de DDT a DDE y DDD (Gfrerer & Lankmayr, 2005) o desbromación en el caso del análisis de PBDE de alto grado de bromación (hexa- a decabromados) (Webster, 2009).

Tabla 8. Comparación de métodos de extracción de muestras sólidas (modificada de Hyötyläinen (2009).

Condiciones típicas	Soxhlet	PLE	UAE	MAE	SFE	MSPD
Tamaño de muestra (g)	10-100	5-50	1-30	1-10	1-10	0.5-10
Tiempo de extracción (min)	360-1440	5-40	3-40	5-40	20-60	2-20
Volumen de disolvente (mL)	>100	<50	<50	<50	0-10	1-5
Selectividad	Baja	Baja	Baja	Baja	Alta	Alta
Automatización	Baja	Alta	Media	Media	Alta	Baja
Habilidad necesaria	Baja	Media	Media	Media	Alta	Media
Parámetros a optimizar	- tipo y volumen de disolvente - temperatura - tiempo - cantidad de muestra	- tipo de disolvente - temperatura - tiempo - número de ciclos de extracción - cantidad de muestra	- tipo y volumen de disolvente - temperatura - tiempo - cantidad de muestra - frecuencia	- tipo y volumen de disolvente - temperatura - tiempo - cantidad de muestra - potencia	- temperatura - presión - tiempo - cantidad de muestra - medio de recolección - tipo de modificador	- tipo de adsorbente - ratio muestra /adsorbente - disolvente de elución
Coste por análisis	Medio	Medio	Bajo	Bajo	Medio	Medio
Coste de la instrumentación	Bajo	Alto	Medio	Medio	Alto	Bajo

PLE: Extracción con líquidos presurizados; UAE: Extracción asistida con ultrasonidos; MAE: Extracción asistida por microondas; SFE: Extracción con fluidos supercríticos; MSPD: Dispersión de matriz en fase sólida

Purificación

Las técnicas de extracción exhaustivas son poco selectivas y arrastran, junto con los analitos de interés, otras muchas sustancias presentes en la muestra de características más o menos similares a los analitos. Estas impurezas pueden deteriorar el proceso cromatográfico y entorpecer la identificación y cuantificación del analito a niveles bajos, por lo que, a pesar de la disponibilidad actual de técnicas de extracción rápida, todavía se siguen necesitando una o más etapas de purificación, en ocasiones, muy laboriosas. Así, en el caso de análisis de sedimentos, es conveniente eliminar la posible presencia de azufre elemental mediante tratamiento con cobre en polvo, sílice modificada con AgNO_3 , con mercurio o cromatografía de permeación en gel (GPC, de *Gel Permeation Chromatography*) (USEPA, 1996b; Ilyas *et al.*, 2011; Bendig & Vetter, 2013). En el

caso de matrices de origen biológico y otras muestras con gran contenido lipídico como los lodos residuales, esta etapa es especialmente importante, ya que la grasa se extrae junto con los compuestos lipófilos. Por ello suele retirarse realizando un ataque con ácido sulfúrico concentrado, que implica varias etapas de LLE secuenciales, o bien cromatográficamente, mediante SPE en columnas de sílice acidificada, alúmina, florisil o GPC.

Algunos de estos procedimientos han podido ser incorporados en la etapa de extracción, como la adición de cobre mezclado con las muestras de sedimento durante la extracción en el Soxhlet (Tadeo *et al.*, 2012; Dirtu *et al.*, 2013).

La extracción con líquidos presurizados selectiva (SPLE, de *Selective Pressurized Liquid Extraction*) o ASE *online*, incluye en la extracción PLE una limpieza del extracto, introduciendo una capa de fase sólida en la celda de extracción, con lo que se reduce significativamente la necesidad de etapas adicionales de purificación. Esta técnica fue aplicada por primera vez al análisis de PBDE y DDT en sedimentos y peces durante el trabajo experimental de esta tesis (ver Capítulo 2).

1.4.5. Técnicas biomiméticas

Como se comentó en la introducción de esta sección, en las últimas dos décadas ha habido una tendencia a explorar toda una serie de técnicas de muestreo y/o tratamiento de muestras ambientales que pretenden dar medidas más representativas en términos de exposición sin necesidad de recurrir al análisis de organismos vivos. Éstas técnicas se diferencian de las utilizadas convencionalmente en que no suponen una extracción completa de los analitos de la matriz, sino que se basan en una partición selectiva de ellos entre la fracción disuelta o la que desorbe fácilmente de la fase particulada y un sustituto de la fase lipídica de la biota, simulando el proceso de asimilación y bioconcentración del contaminante por parte de los organismos vivos (Parkerton *et al.*, 2000; Ehlers & Loibner, 2006). El procedimiento analítico consiste básicamente en una primera etapa en que la fase sustituta entra en contacto con la muestra permitiendo el proceso de partición del contaminante entre ambas, y una segunda etapa en que la cantidad total de contaminante concentrado en la fase sustituta es cuantificada aplicando técnicas convencionales de extracción y análisis. Mediante este procedimiento de extracción sólo se mide la cantidad de contaminante disponible para ser absorbida por la fase sustituta y no la que permanece unida a la materia orgánica, por lo que se consideran técnicas que miden la fracción biodisponible del contaminante en el medio (ver apartado 1.2.2), lo que ha sido validado mediante experimentos en que se ha llevado a cabo una exposición paralela de seres vivos y se ha medido su acumulación o su degradación microbiana.

Dentro de esta categoría se pueden incluir dos tipos de técnicas, según la fracción de contaminante que miden. Un primer grupo estaría constituido por aquellas que concentran parte de la fracción disuelta capaz de bioacumularse sin alterar el equilibrio entre ésta y los sólidos presentes en el medio (*non-depleting*), de la misma manera que, en la mayoría de las situaciones ambientales, el volumen de agua contaminada es suficientemente grande y la toma de contaminantes por los organismos acuáticos no afecta a su concentración acuosa (Verhaar *et al.*, 1995). En este tipo de técnicas la fase sustituta se equilibra con las fracciones disuelta y reversible y proporcionan una medida de la actividad química. El otro grupo lo formarían técnicas que utilizan fases sustitutas secuestrantes, con las que se establece un equilibrio muy desplazado, de manera

que además del contaminante disuelto, se produce una extracción parcial del compuesto asociado a la fase particulada y permiten explorar la capacidad de los contaminantes para desorber de los sedimentos (Karickhoff & Morris, 1985). Algunos autores se refieren a ambos tipos de fases sustitutas como “muestreadores pasivos” (Akkanen *et al.*, 2012). Sin embargo, en la forma más extendida de referirse a estos tipos de técnicas se utiliza el término “muestreador pasivo” para las primeras, mientras que las segundas son consideradas “extracciones parciales” (Cui *et al.*, 2013), nomenclatura que se seguirá de aquí en adelante en esta memoria.

1.4.5.1. Extracciones parciales

En contraposición a las extracciones exhaustivas de sedimento, que incluyen en su medida tanto la fracción de contaminante disuelta en el agua intersticial como la unida irreversiblemente a geosorbentes –y, por tanto, sobreestiman las cantidades de contaminante disponibles para ser asimilados por los organismos vivos–, las extracciones parciales pretenden obtener una medida de la fracción potencialmente biodisponible o bioaccesible (según la definición de Semple *et al.* (2004)) o la disponibilidad ambiental (según Lanno *et al.* (2004) e ISO 17402) (ver apartado 1.2.2), cuantificando solamente la fracción realmente disuelta y la que puede ser desorbida con cierta facilidad. Para este fin se han utilizado materiales sólidos que, añadidos a una suspensión acuosa de la muestra, secuestran o atrapan las moléculas disueltas, de manera que agotan el contaminante en la fase disuelta y favorecen su desorción de los diferentes dominios de unión presentes en la matriz estudiada. En este sentido, esta técnica de extracción imita la actividad de degradación de los microorganismos en suelos y sedimentos y se consigue medir la fracción de contaminante potencialmente disponible.

Además de las extracciones con fases sustitutas, que se pueden considerar biomiméticas, en la literatura científica se han descrito otros procedimientos de extracción parcial con el fin de aislar la fracción accesible de diferentes analitos y matrices. Así, se han llevado a cabo estudios en que se han utilizado disolventes suaves, como mezclas alcohol:agua o ácidos orgánicos o incluso con fluidos biológicos que simulan la digestión (Tang *et al.*, 1999; Voparil & Mayer, 2004). Cuypers *et al.* (2000) propusieron el uso de persulfato para oxidar la materia orgánica amorfa y liberar la fracción accesible. Recientemente, también se ha examinado el uso de algunas de las tecnologías avanzadas de extracción comentadas en el apartado anterior tales como PLE o SFE como herramientas potenciales para predecir la biodisponibilidad (Tao *et al.*, 2004; Latawiec *et al.*, 2008). Estas estrategias de extracciones líquidas son de implementación más fácil. Sin embargo, en ellas la extracción depende de la fuerza del disolvente, lo que limita su interpretación conceptual frente al uso de fases sólidas, donde lo que controla la extracción es la accesibilidad y la cinética de desorción a partir de la matriz de la muestra, de manera similar a lo que suele ocurrir en los sistemas naturales (ver 1.2.1).

La mayoría de las técnicas de extracciones parciales se han desarrollado en el contexto de remediación de suelos y sedimentos contaminados para predecir la degradación microbiológica de los compuestos hidrofóbicos. La inclusión de este tipo de técnicas en la norma ISO 17402 (ISO, 2008) sobre calidad de suelos y sedimentos refleja como se están empleando cada vez más para estudiar la exposición real de distintas familias de organismos.

Principio funcional

Cuando a una suspensión acuosa de sedimento se añade una fase secuestrante con capacidad para atrapar todo el contaminante disuelto en el agua, la concentración en la fase disuelta se hace casi negligible. Estos materiales actúan como un sumidero infinito de los compuestos desorbidos, de manera que fuerzan una desorción continua desde las partículas de sedimento hacia la fase disuelta debido al gradiente de difusión creado. La velocidad de esta desorción es, por tanto, el factor limitante en estas extracciones, que sirven así para estudiar las cinéticas de desorción de los contaminantes asociados al sedimento en los sistemas acuáticos.

Si se miden las cantidades de contaminante que se desorben de manera consecutiva del sedimento por espacios de tiempo cortos y se representan gráficamente como en la Figura 17, se observa una fase de desorción rápida inicial (horas o días) seguida de una liberación más lenta.

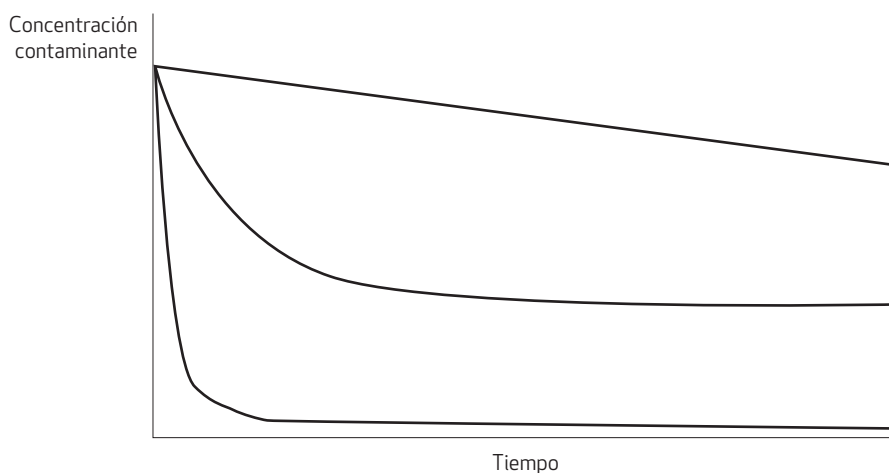


Figura 17. Curvas típicas de desorción de contaminantes en suspensiones acuosas de sedimento.

Este comportamiento se ha descrito ajustándolo a modelos cinéticos de primer orden que dividen el producto químico en dos o tres grupos con diferentes tasas de desorción. En los modelos de tres compartimentos, además de la fracción de contaminante de desorción rápida (F_{rap}) se distingue entre una fracción de desorción lenta (F_{slow}) y una fracción muy lenta (F_{vs}) (Karickhoff & Morris, 1985; Cornelissen *et al.*, 2001; ISO, 2008). Asumiendo que no se produce readsorción significativa en el sedimento:

$$dF_{rap,t}/dt = k_{rap}F_{rap,t} \quad (1)$$

$$dF_{slow,t}/dt = k_{slow}F_{slow,t} \quad (2)$$

$$dF_{vs,t}/dt = k_{vs}F_{vs,t} \quad (3)$$

en donde $F_{rap,t}$, $F_{slow,t}$ y $F_{vs,t}$ son las fracciones de la concentración total inicial del contaminante que se mantiene retenida todavía a tiempo t y k_{rap} , k_{slow} , y k_{vs} son las constantes de velocidad de primer orden para la desorción rápida, lenta y muy lenta, respectivamente. Si se denomina $F_{des,t}$ a la fracción desorbida al tiempo t , el balance de fracciones en cualquier momento viene dado por:

$$F_{rap,t} + F_{slow,t} + F_{vs,t} + F_{des,t} = 1 \quad (4)$$

y en el instante inicial:

$$F_{rap} + F_{slow} + F_{vs} = 1 \quad (5)$$

Las constantes de desorción y las fracciones pueden ser cuantificadas por ajuste numérico de las ecuaciones (1)–(5) a los datos experimentales con el fin de calcular los parámetros F_{rap} , F_{slow} y F_{vs} (equivalentes a $F_{rap,t}$, $F_{slow,t}$ y $F_{vs,t}$ a $t=0$) y k_{rap} , k_{slow} , k_{vs} , o bien utilizando la solución analítica aproximada:

$$1 - F_{des,t} = F_{rap}e^{-k_{rap}t} + F_{slow}e^{-k_{slow}t} + F_{vs}e^{-k_{vs}t} \quad (6)$$

$$\frac{S_t}{S_0} = F_{rap}e^{-k_{rap}t} + F_{slow}e^{-k_{slow}t} + F_{vs}e^{-k_{vs}t} \quad (7)$$

donde, S_t y S_0 son las cantidades de analito que se mantienen unidas al sedimento a tiempo t y al inicio del experimento, respectivamente, correspondiente al eje Y de la Figura 16.

Siempre que la capacidad de fase secuestrante sea suficiente para actuar a modo de sumidero infinito, el modelo es independiente del material de que se trate, ya que, como se ha dicho más arriba, el factor limitante de la extracción es la desorción de la muestra, que es lo que se modela matemáticamente (Cornelissen *et al.*, 1997; Zhao & Pignatello, 2004). Para ello se ha de tener en cuenta la capacidad del material y la relación entre las cantidades de extractante y sedimento. La cantidad de extractante utilizada debería estar siempre donde el aumento de agente extractante ya no aumenta la eficiencia de la extracción (Figura 18).

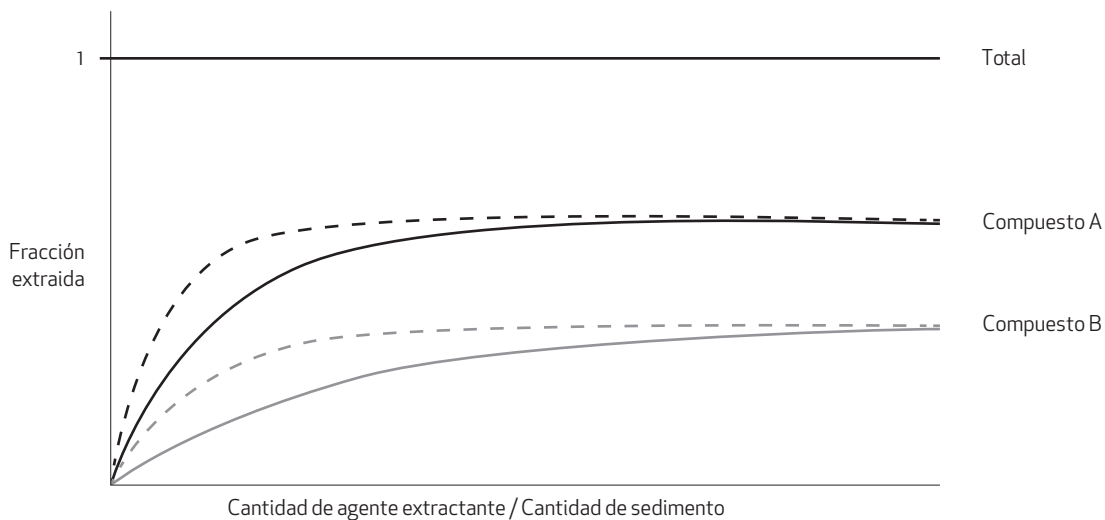


Figura 18. Dependencia de la eficiencia en extracciones parciales sobre la relación entre la cantidad de agente extractante y la cantidad de sedimento extraído. Las líneas punteadas y continuas representan agentes extractantes diferentes, mientras que los distintos colores representan distintos contaminantes, más (A) o menos (B) bioaccesibles (tomada de Brack *et al.* (2009) con permiso de Elsevier).

La observación de distintas tasas de desorción se relaciona con la existencia de diferentes mecanismos de unión o retención en los sedimentos, como se describe en el apartado 1.2.1. La fracción de desorción rápida (F_{rap}), se supone asociada a la materia orgánica amorfa del sedimento por una isoterma lineal y está en equilibrio con la concentración libremente disuelta en el agua de poro, que se considera inmediatamente disponible. Por el contrario, las fracciones de desorción lenta (F_{slow}) y muy lenta (F_{vs}) se suponen asociadas a la materia orgánica condensada en una forma no lineal de tipo Langmuir (Karickhoff & Morris, 1985; Xing & Pignatello, 1997; Jonker & Koelmans, 2002). Estas fracciones pueden considerarse potencialmente disponibles, ya que con tiempo suficiente pueden llegar a disociarse de la fase particulada; sin embargo, con el envejecimiento del sedimento contribuyen a la existencia de residuos no extractables (NER, de *Non-Extractable Residues*) que persistirán en el mismo durante un periodo prolongado de tiempo. Diversos estudios han comprobado que las fracciones de desorción rápida y las concentraciones libremente disueltas asociadas se relacionan con la capacidad de transformación microbiana de los contaminantes, así como con sus concentraciones en organismos bentónicos e incluso peces (Moermond *et al.*, 2004; Voparil & Mayer, 2004; Harwood *et al.*, 2012; Lydy *et al.*, 2015), de ahí que se consideren métodos de determinación de la fracción biodisponible.

En la bibliografía se pueden encontrar métodos de extracciones acuosas de suelos y sedimentos llevados a cabo con distintos tipos de materiales. El primer material utilizado fue la resina Tenax® TA, un polímero poroso basado en el óxido de poli-2,6-difenilfenileno que se usa normalmente como relleno de columnas cromatográficas y como material adsorbente. Presenta baja polaridad, no adsorbe agua y tiene una alta capacidad de adsorción para un número importante de compuestos, lo que le confiere una capacidad de extracción “casi infinita” de los contaminantes hidrofóbicos presentes en una muestra acuosa (Cornelissen *et al.*, 1997; Cornelissen *et al.*, 2001). Además, tiene la ventaja de que es reutilizable y económico. Esta fue la resina elegida en este trabajo, donde se aplicó por primera vez a PBDE. En el Capítulo 3 se describe con mayor detalle. Otro tipo de resina que se ha utilizado para este fin es la Amberlita® XAD², un copolímero de estireno divinilbenceno poroso de gran área superficial y estructura química no iónica e hidrofóbica. Su uso ha sido mucho menor que el del Tenax®, y centrado en PAH, PCB e hidrocarburos (Carroll *et al.*, 1994; Hawthorne *et al.*, 2002; Lei *et al.*, 2004).

Por otra parte, otros autores han propuesto el uso de agentes solubilizantes en lugar de fases sólidas. El más utilizado de este tipo es la hidroxipropil-b-ciclodextrina o HPCD (Reid, 1999; Dean & Scott, 2004; Hickman & Reid, 2005). La HPCD es un oligosacárido cíclico con una parte exterior hidrófila y una cavidad interior apolar con forma toroidal, donde los compuestos hidrofóbicos pueden ser encapsulados, formando complejos de inclusión solubles en agua. Después de la extracción, la solución de HPCD es separada del suelo por filtración o centrifugación. Aunque la técnica con HPCD es atractiva porque es rápida y operacionalmente fácil, tiene la desventaja de que su capacidad extractiva es limitada y depende del contaminante en cuestión. También se han usado para este fin surfactantes no iónicos (p. ej. Triton X-100) (Volkering *et al.*, 1998; Cuyper *et al.*, 2002). Estos compuestos tienen la capacidad de formar micelas, en las que quedan incluidos los compuestos hidrofóbicos, de manera que se incrementa su solubilidad. No obstante, el uso de surfactantes y agentes solubilizantes para predecir la disponibilidad conlleva cierta contradicción, ya que estos agentes también se usan para mejorar la propia biodisponibilidad de los contaminantes en estudios de biorremediación (Boopathy & Manning, 1999; Fava

et al., 2003). No está claro hasta que punto estos agentes interactúan con la matriz proporcionando una fase en la cual los compuestos lábiles se pueden particionar sin necesidad de la disolución acuosa del compuesto (Hickman & Reid, 2005), de manera más parecida a las extracciones con disolventes suaves, lo que limita su interpretabilidad en términos de biodisponibilidad.

1.4.5.2. Muestreadores pasivos

Los muestreadores pasivos concentran los contaminantes de la fase disuelta sin alterar el equilibrio entre ésta y las fases sólidas presentes en el medio, de manera similar a la bioconcentración de contaminantes en el medio natural. Así, esta técnica permite medir la actividad química o la fracción inmediatamente disponible del contaminante. A diferencia de las fases secuestrantes utilizadas en las extracciones parciales, los muestreadores pasivos son aplicables *in situ*.

De manera general, un dispositivo de muestreo pasivo (PSD, de *Passive Sampling Device*) consta de una fase receptora afín al compuesto objetivo, con la que el analito establece una partición una vez que esta se introduce en el medio o matriz a estudiar. El material receptor (disolvente, resina polimérica, adsorbente poroso o reactivo químico) suele estar separado del medio por una membrana que lo protege al tiempo que modula el flujo de sustancias que se establece entre ambas fases (Figura 19). La concentración en la fase receptora es luego medida y convertida en información útil sobre la concentración en el punto de muestreo.

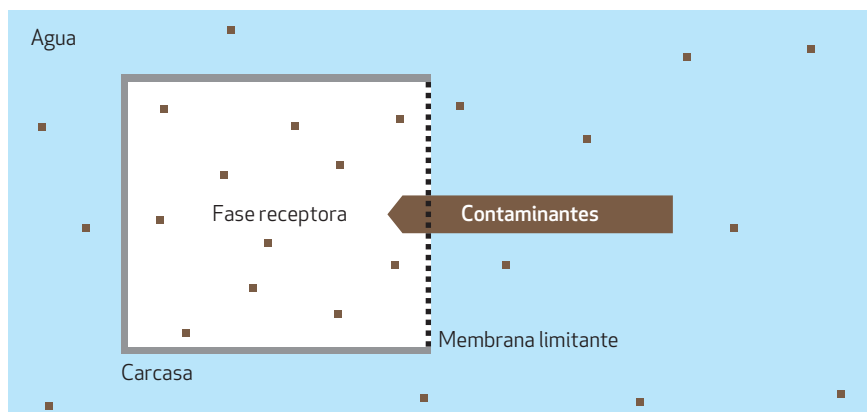


Figura 19. Esquema de un dispositivo de muestreo pasivo

El diseño del muestreador, en cuanto a geometría y materiales, determina su funcionalidad y su aplicabilidad para determinados tipos de contaminantes y matrices ambientales. Así, aunque fue una técnica desarrollada inicialmente para la monitorización de la calidad del aire –la primera patente de un PSD data de 1927 (Gordon & Lowe, 1927), en 1980 se desarrolló el primer PSD para agua (Byrne & Aylott, 1980). Desde entonces, y especialmente en la última década, han ido desarrollándose una gran variedad de muestreadores pasivos (con mayor o menor éxito) para el muestreo en agua de un amplio rango de compuestos, tanto microcontaminantes orgánicos como especies metálicas. En algunos países ha empezado a plantearse como una estrategia útil para el control rutinario de contaminantes, como refleja la reciente norma ISO acerca de su uso (ISO, 2011).

Además de las ventajas interpretativas en cuanto a la estimación del grado de exposición de los seres vivos a los contaminantes, los muestreadores pasivos proporcionan una serie de ventajas “técnicas” respecto a los métodos convencionales de toma de muestra y análisis en el laboratorio, como son la simplificación de los protocolos, al integrar muestreo y preconcentración de muestra en un solo paso, o el menor consumo de disolventes. De hecho, algunos de los dispositivos utilizados como muestreadores pasivos *in situ* proceden de técnicas de análisis de agua vistas en el apartado 1.4.4.1, como la SPME. En el caso de los contaminantes hidrofóbicos, con tendencia a unirse a la materia orgánica de las matrices acuosas, el uso de este tipo de dispositivos es especialmente ventajoso si se quiere medir la fracción verdaderamente disuelta ya que, con otras técnicas, es muy difícil conseguir distinguirla de la asociada a DOM y fases coloidales.

Principio funcional

A pesar de que existe una amplia gama de PSD que varían en tamaño, composición de la fase receptora, presencia o ausencia de membrana, los principios que rigen captación de contaminantes son muy similares. Una vez inmerso en el medio de estudio, la diferencia de potenciales químicos del compuesto entre el medio y el muestreador hace que se genere un flujo neto de difusión pasiva de analito hacia la fase receptora del muestreador. La velocidad a la que se acumula el compuesto en la fase receptora va disminuyendo con el tiempo de exposición, según se reduce la diferencia entre potenciales, hasta que esta diferencia se anula y el sistema alcanza el equilibrio (si la concentración en el agua no fluctúa significativamente) (Figura 20).

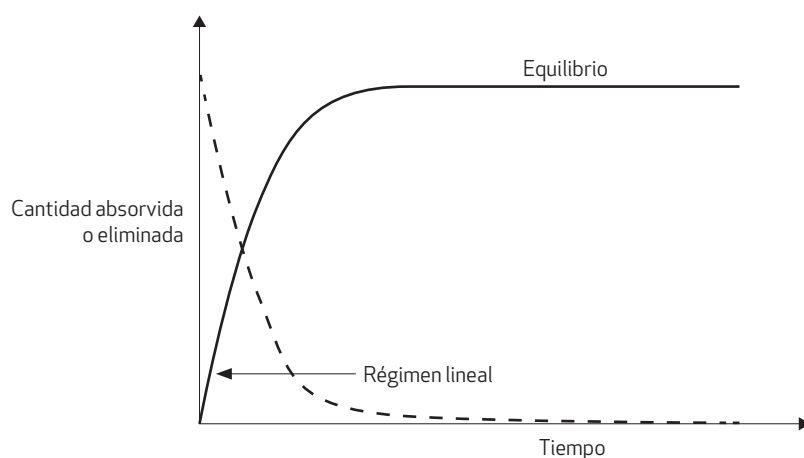


Figura 20. Curva genérica de acumulación de un contaminante en un muestreador pasivo durante la exposición (línea sólida) y curva de eliminación de compuestos de referencia presentes en el muestreador antes de la exposición (línea punteada)

Se han utilizado dos modelos diferentes para describir el intercambio de analitos entre el agua y el muestreador pasivo, bien basándose en modelos que describen la bioconcentración—basados a su vez en su analogía con la cinética de las reacciones químicas—o bien en modelos que representan la transferencia de masa a través de diferentes ambientes secuenciales (Huckins *et al.*, 2006). Ambos modelos, fácilmente interconvertibles, se diferencian sólo en la definición de las constantes que usan y se simplifican en la misma ecuación, que describe la curva de la Figura 20 (línea sólida):

$$C_s = K_{sw}C_w[1 - \exp(-k_e t)] \quad (1)$$

donde C_s es la concentración del analito en el muestreador, C_w es la concentración del analito en el agua, K_{sw} el coeficiente de partición muestreador-agua y k_e la constante del proceso de liberación del compuesto del muestreador al medio.

Tanto en la fase inicial como en la fase final de la curva, este comportamiento es susceptible de ser simplificado matemáticamente, en base a lo cual se distinguen los distintos regímenes en que puede operar un PSD. Cuando el tiempo de exposición del muestreador es suficientemente largo ($k_e t \gg 1$), la concentración de contaminante acumulado alcanza su valor de equilibrio, proporcional a la concentración en el medio en ese momento a través del coeficiente de partición K_{sw} , que define la capacidad de retención del muestreador para un determinado compuesto. K_{sw} es fácil de determinar experimentalmente (Smedes *et al.*, 2009) o se puede estimar mediante relaciones empíricas como una función del $\log K_{ow}$ (Booij *et al.*, 2003; Huckins *et al.*, 2006; Vrana *et al.*, 2006a; Adams *et al.*, 2007), lo que permite la determinación de la concentración del contaminante presente en el medio muestreado. La concentración disuelta de analito puede ser calculada entonces a partir de la concentración en el muestreador, como el ratio de la concentración en el muestreador y el coeficiente de partición muestreador-agua específico del analito (Mayer *et al.*, 2000):

$$C_s = K_{sw}C_w \quad (2)$$

Para poder aplicar esta ecuación, se debe alcanzar una concentración estable tras un tiempo de respuesta conocido. Además, el tiempo de respuesta debe ser inferior a cualquier fluctuación producida en el medio circundante.

Por el contrario, al comienzo de la exposición, cuando muestreador y agua están aun lejos del equilibrio termodinámico, $k_e t \ll 1$, la tasa de desorción de analito de la fase receptora es todavía desdénable y la masa acumulada es proporcional a la concentración en el agua y al tiempo de exposición:

$$C_s = K_{sw}k_e C_w t \quad (3)$$

$$M_s = V_s K_{sw} k_e C_w t \quad (4)$$

con M_s y V_s la masa de analito acumulado y el volumen de la fase receptora, respectivamente.

El producto $V_s K_{sw} k_e$ es constante para cada par compuesto-muestreador, y se conoce como tasa de muestreo o *Sampling Rate* (R_s), que es equivalente al volumen de agua que es aclarado del analito por unidad de tiempo.

$$M_s = R_s C_w t \quad (5)$$

R_s es independiente de la concentración de analito en el agua, de manera que esta concentración puede ser calculada a partir de la masa acumulada en el muestreador durante el tiempo en que ha estado expuesto al medio.

$$C_w = \frac{M_s - M_0}{R_s t} \quad (6)$$

Si C_w es constante en el tiempo la acumulación de masa en el muestreador es lineal. Cuando se dan fluctuaciones de la concentración en el agua, la masa acumulada es proporcional al promedio de la concentración respecto al tiempo (TWA, de *Time-Weighted Average*) (Vrana *et al.*, 2005a; Huckins *et al.*, 2006). Esto permite obtener información de mayor amplitud temporal.

La aplicación del muestreo pasivo en estas condiciones presenta una dificultad adicional, ya que R_s no sólo es específica de cada analito y cada muestreador, sino que depende de las condiciones ambientales, fundamentalmente temperatura, turbulencia y *biofouling* (generalmente, las cinéticas de muestreo aumentan a flujos y temperaturas altos (Vrana *et al.*, 2005b)). Para conocer la R_s y el intervalo de linealidad, los muestreadores pasivos deben calibrarse previamente a escala de laboratorio para cada compuesto en experimentos de exposición a concentraciones conocidas y en diferentes ambientes controlados.

$$R_s = \frac{M_s}{C_w t} \quad (7)$$

No obstante, acotar correctamente la enorme variabilidad de las condiciones ambientales en el campo requiere una calibración *in situ* del muestreador. Para solventar este problema se recurre al uso de Compuestos de Referencia de Rendimiento (PRC, de *Performance Reference Compounds*) que se añaden a la fase receptora antes de la exposición (Huckins *et al.*, 2002). La disipación de estos compuestos una vez que el muestreador es expuesto al medio es gobernada por la ecuación:

$$M = M_0 \exp(-k_e t) \quad (8)$$

donde M_0 es la masa presente al inicio de la exposición y M la masa cuando se retira el muestreador, que describe la curva punteada de la Figura 20. A partir de ella se puede estimar la constante de eliminación del PRC (k_e):

$$k_e = -\frac{\ln(M/M_0)}{t} \quad (9)$$

A partir de la k_e y del coeficiente de partición muestreador-agua del PRC (K_{sw}) se puede estimar la R_s *in situ* para el PRC (ecuación X). Siempre que la velocidad de disipación del PRC sea directamente proporcional a la velocidad de acumulación de la especie monitorizada (intercambio isotrópico), esta R_s puede considerarse como representativa de la tasa de muestreo de los compuestos objetivo con propiedades físico-químicas similares al PRC y ser utilizada para compensar el efecto de las variables medioambientales.

El tiempo necesario para alcanzar el equilibrio depende del contaminante, de las condiciones de exposición y del diseño del muestreador. Para compuestos poco hidrofóbicos y fases receptoras de poco espesor, alcanzar el equilibrio puede ser cuestión de minutos a días. En cambio, para

compuestos muy hidrofóbicos y fases receptoras no polares gruesas, llegar al equilibrio podría tardar meses o años, por lo que se calibran en modo lineal (Lohmann *et al.*, 2012). Se suele hablar de muestreadores “de equilibrio” y muestreadores “cinéticos”, según operen en un régimen u otro. Por otra parte, la aproximación al estado estacionario es más adecuada en aquellas situaciones en las que la variación temporal en la concentración del analito es muy pequeña. Así, los muestreadores de equilibrio han sido utilizados mayormente para medir concentraciones de contaminantes en aguas subterráneas y en agua intersticial del sedimento (Lydy *et al.*, 2014). Este tipo de muestreo permite la determinación de la concentración disuelta, la fugacidad y actividad química sin la necesidad de variables cinéticas (Mayer *et al.*, 2000). En aplicaciones fuera del equilibrio, en cambio, la gran capacidad de algunos muestreadores permite la acumulación de contaminantes hidrofóbicos en el rango lineal durante periodos prolongados de exposición (desde días a varias semanas) e integra las posibles fluctuaciones en la concentración del analito proporcionando valores medios de concentración. En la mayoría de los estudios ambientales, se han empleado muestreadores en modo de no-equilibrio, por razones de practicidad. Estos muestreadores aportan la ventaja adicional de que proporcionan una información de mayor amplitud temporal, más representativa de la exposición que las habituales medidas puntuales (con la técnica puntual se necesitaría una frecuencia de muestreo prohibitivamente costosa) (Figura 21). Además, al concentrar el contaminante durante un periodo prolongado, equivalente a la preconcentración *in situ* de un gran volumen de agua, los muestreadores cinéticos permiten la detección de valores de concentración a niveles de traza (ng/L), establecidos por las cada vez más exigentes legislaciones medioambientales.

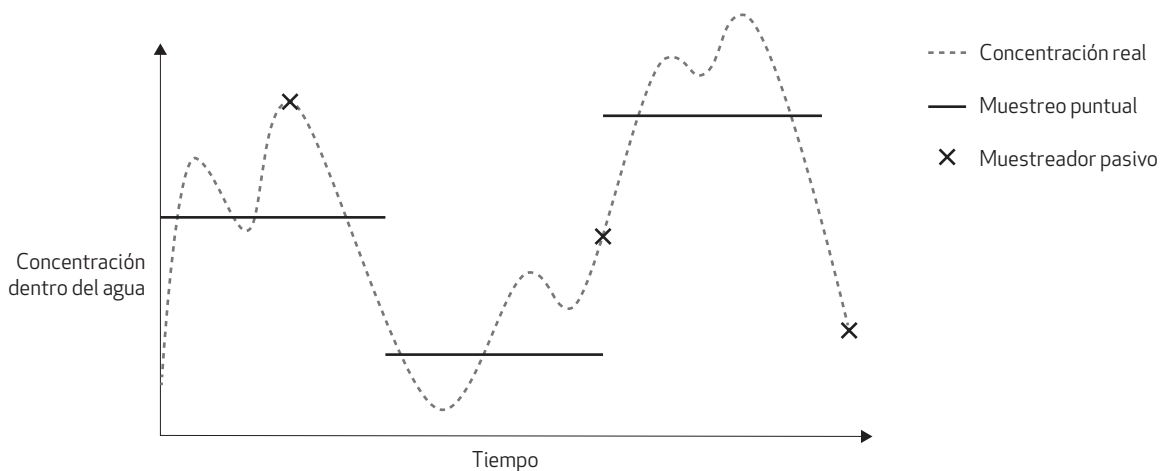


Figura 21. Representación temporal de las concentraciones obtenidas mediante muestreos puntuales y muestreo pasivo.

En la literatura científica se puede encontrar una gran variedad de diseños de muestreadores pasivos para compuestos orgánicos no polares, aunque no todos han llegado a utilizarse de manera extendida (Figura 22). El dispositivo de membrana semipermeable (SPMD, de Semi-Permeable Membrane Device) fue el primer muestreador que se utilizó en una escala notable para compuestos orgánicos en medio acuoso *in situ* y es actualmente el PSD más desarrollado para este fin (Huckins *et al.*, 1990; Petty *et al.*, 2000; Huckins *et al.*, 2006), especialmente en aguas

(superficiales y subterráneas), pero también en sedimentos (Vinturella et al., 2004). La configuración típica consiste en un tubo plano de polietileno de baja densidad (LDPE, de *Low-Density Polyethylene*) de 90 cm de largo y 2.5 cm de ancho (con un área superficial de $\sim 460 \text{ cm}^2$) relleno con 1 mL de trioleína sintética. Fue diseñado para secuestrar y concentrar los contaminantes orgánicos libremente disueltos con $\log K_{ow}$ entre 3 y 10 y ha sido usado para el monitoreo de DDX y PBDE en agua (Booij et al., 2002; Rayne & Ikononou, 2002; Mueller et al., 2011). Dependiendo del compuesto, puede mantenerse en modo lineal durante 14-30 días y han permitido alcanzar LOD de incluso 1 pg/L para los PBDE (Booij et al., 2002). La mayor desventaja de este PSD es el procedimiento de extracción en el laboratorio de los contaminantes acumulados en la trioleína, además de cierta fragilidad.

Otro diseño que ha llegado a ser disponible comercialmente es el dosímetro cerámico (Grathwohl, 1999; Cristale et al., 2013; Addeck et al., 2014). Un tubo cerámico de 1 cm de diámetro y 5 cm de largo con 0.15 cm de grosor y tamaño de poro de 5 nm hace de membrana limitante de difusión. En el interior de este tubo, cerrado con tapas de teflón (PTFE, de Politetrafluoroetileno), se encuentra la fase receptora formada por gránulos de adsorbente (amberlita). El recubrimiento absorbente sellado dentro de membrana (MESCO, de *Membrane-Enclosed Sorptive Coating*) consiste en una barra agitadora recubierta de PDMS o una barra o cordón íntegramente de PDMS que se encierra en una bolsa de membrana de diálisis de celulosa regenerada llena de agua destilada. Este dispositivo es una adaptación de la técnica de SBSE (Baltussen et al., 1999) para el muestreo integrativo de compuestos orgánicos hidrofóbicos y combina el muestreo pasivo con las ventajas de la preconcentración de muestras de agua sin uso de disolventes y la desorción de los analitos directamente en el cromatógrafo. Evita la necesidad de purificación de los extractos necesaria con otros muestreadores. Además, la inyección de todo el extracto hace que sea muy sensible a pesar de la pequeña superficie y el volumen del muestreador. El MESCO se ha calibrado y su eficiencia ha sido probada en campo para contaminantes orgánicos persistentes tales como pesticidas, PCB, PAH y POP seleccionados en agua (Vrana et al., 2001; Vrana et al., 2006b).

El Chemcatcher fue desarrollado como una alternativa única a la variedad existente de diseños enfocados al muestreo de tipos concretos de contaminantes (Greenwood et al., 2007). Este diseño puede albergar diferentes combinaciones de fase receptora y membrana de difusión dependiendo de los contaminantes que se quieran muestrear, incluidos compuestos más polares (para los que la técnica apenas se había desarrollado hasta ese momento) y los metales (hasta entonces muestreados con dispositivos de gradiente de difusión en capa fina (DGT, de *Diffusive Gradient in Thin-film*; (Davison & Zhang, 1994)). La primera versión para la toma de muestras de compuestos orgánicos no polares del Chemcatcher estaba compuesta por un disco Empore de C18 y una membrana de LDPE y permitía el muestreo de contaminantes con $\log K_{ow}$ mayor de 3 (Kingston et al., 2000). Una optimización posterior añadiendo un pequeño volumen de octanol a la fase receptora disminuyó la resistencia interna del muestreador a la transferencia de masa de los compuestos hidrofóbicos con $\log K_{ow}$ por encima de 5 (Vrana et al., 2005b; Vrana et al., 2010). Parte del trabajo experimental de esta tesis se engloba dentro del proyecto europeo de desarrollo de este muestreador. En el trabajo experimental de esta tesis, se trató de evaluar este muestreador para la concentración de PBDE y DDX en agua (ver Capítulo 4).

Existen otros muchos ejemplos de muestreadores bifásicos (membrana + fase receptora) para el muestreo de contaminantes hidrofóbicos en agua con diseños diferentes pero de funcionamiento similar a los comentados, que incluyen membranas rellenas de disolvente, similares a los SPMD, como el TRIMPS (*Trimethyl Pentane Passive Sampler*) (Leonard *et al.*, 2002), y otros diseños con soporte sólido, como el PISCES (*Passive In Situ Concentration/Extraction Sampler*) (Litten *et al.*, 1993), que no han tenido un uso muy extendido.

Por otra parte, se ha visto que algunos materiales poliméricos muestran una afinidad por los compuestos hidrofóbicos similar a los SPMD, y en los últimos años está ganando mucho interés la utilización de muestreadores monofásicos, consistentes en una fase sorbente polimérica configurada como lámina o tira o como película fina sobre un soporte sólido (p. ej. fibras o vidrio). El principal atractivo de estos muestreadores es que proporcionan una mayor facilidad de procesamiento de muestra, además de que el modelado del transporte de contaminantes en ellos es más simple.

Entre los materiales utilizados destacan las siliconas (SR, de *Silicone Rubber*). Entre ellas se encuentra el polidimetilsiloxano (PDMS), recubrimiento típico en las fibras de microextracción en fase sólida (SPME) y las barras agitadoras de extracción por sorción (SBSE), que han sido mencionadas anteriormente al referirnos a técnicas modernas de extracción de muestras de agua en el laboratorio (ver 1.4.4.1). Además de estos dos (Mayer *et al.*, 2000; Heringa & Hermens, 2003; Xu *et al.*, 2007), el PDMS también se está utilizando en otros formatos menos frágiles y con más capacidad, como láminas o cordones, que permiten el muestreo integrativo (Ouyang *et al.*, 2007; Rusina *et al.*, 2010; Smedes & Booij, 2012). Un avance reciente es el recubrimiento interior de viales, que permite alcanzar el equilibrio en espacios muy cortos de tiempo debido al espesor ultrafino del recubrimiento (Reichenberg *et al.*, 2008). En la última década se ha incorporado el uso de otros polímeros, tanto para SPME y SBSE como en otros formatos que no requieren soporte sólido, como es el caso del LDPE (utilizado también como barrera de difusión en muestreadores bifásicos) (Müller *et al.*, 2001; Hale *et al.*, 2009; Bao *et al.*, 2011), el polioximetileno (POM) (Jonker & Koelmans, 2001; Sormunen *et al.*, 2010) o el etilenvinilacetato (EVA) (Meloche *et al.*, 2009), entre otros.

Los tiempos de equilibrio de estos muestreadores varían según su capacidad y su relación superficie-volumen. Las fibras de SPME, p. ej., no solo han sido utilizadas tanto en modo de equilibrio (Müller *et al.*, 1999; Mayer *et al.*, 2000), sino también en modo cinético para calcular la TWA, manteniendo la fibra retraída a una distancia en la jeringa (Martos & Pawliszyn, 1999; Sukola *et al.*, 2001).

En 2008, comenzó a desarrollarse un nuevo sistema, conocido como muestreador integrativo de flujo continuo (CFIS, de *Continuous Integrative Flow Sampler*), que permite la determinación de la TWA de compuestos orgánicos en agua sin necesidad de PRC. Se trata de un dispositivo sumergible con una pequeña bomba peristáltica que produce un flujo constante del agua a través de una celda donde se ubican varias barras agitadoras de PDMS, de manera que las tasas de muestreo no se ven afectadas por la turbulencia del medio. Ha sido utilizado para el análisis de PAH y pesticidas organoclorados en distintos ambientes (Llorca *et al.*, 2009).

En general, el análisis químico de los muestreadores pasivos implica los procedimientos de extracción y purificación convencionales utilizando métodos similares a los usados para sedimentos y biota, seguido de la inyección de una alícuota del extracto final para su análisis instrumental.



Figura 22. Fotografías de dispositivos de muestreo pasivo para contaminantes hidrofóbicos: (a) SPMD, (b) Dosímetro cerámico, (c) Chemcatcher, (d) MESCO, (e) LDPE SPME-TWA, (f) barra y lámina de SR

Sin embargo, algunos muestreadores como los de PDMS, siempre que tengan un tamaño pequeño, como SPME, SBSE, MESCO, barras o membranas, permiten la desorción del muestreador completo directamente en el GC, para ser analizados sin necesidad de más tratamiento, lo que los convierte en una alternativa muy atractiva especialmente frente a los SPMD.

Por otra parte, la posibilidad de utilizar PSD para correlacionar la asimilación de compuestos hidrofóbicos en organismos acuáticos ha sido examinada en varios trabajos, la mayor parte con SPMD y bivalvos (Meadows *et al.*, 1998; Heltsley *et al.*, 2005; Bayen *et al.*, 2009). En general, estos experimentos han encontrado correlaciones buenas, lo que justifica el uso de esta técnica como predictora de la biodisponibilidad o la bioacumulación de contaminantes hidrofóbicos en la fase acuosa. Entre 2001 y 2005, p. ej., en el programa *Mussel Watch* que se desarrolla habitualmente en aguas costeras holandesas se incorporaron, paralelamente a la exposición de mejillones, láminas de silicona para el seguimiento de PAH y PCB. Los resultados obtenidos revelaron una fuerte correlación entre ambos (Smedes, 2007). Este tipo de comparaciones entre la concentración disuelta libremente o la concentración en el muestreador y la bioacumulación o la toxicidad para ciertos organismos también se ha llevado a cabo en sedimentos (Leslie *et al.*, 2002; Harwood *et al.*, 2012). Así, p. ej., Friedman *et al.* (2009) encontraron una fuerte correlación entre poliquetos y LDPE expuestos a sedimentos contaminados en el laboratorio.

No obstante, el éxito de estas correlaciones ha dependido de las especies examinadas, debido a que la acumulación de contaminantes depende de características que son propias de cada especie e incluso de cada individuo, como la capacidad para metabolizar xenobióticos, la composición lipídica corporal, los hábitos alimentarios o los patrones migratorios. Booij *et al.* (2006),

tras evaluar los datos publicados hasta entonces sobre exposiciones paralelas de SPMD y biota, concluyeron que los SPMD proporcionan estimaciones de las concentraciones de exposición más fiables que la propia biota, puesto que la cinética de acumulación del SPMD es más fácil de conocerse que los valores reales de los BAF *in situ* para cada organismo.

Tabla 9. Comparación entre distintos dispositivos de muestreo pasivo para contaminantes hidrofóbicos.

Condiciones típicas	SPMD	Chemcatcher apolar	MESCO	Dosímetro cerámico	eq-SPME	TWA-SPME	SR	LDPE
Superficie de intercambio	457 cm ²	17,5 cm ²	0,33 cm ²	15,7 cm ²	0,1 cm ²	0,0045 cm ²	Muy variable: 0,3-320 cm ²	Variable: 100-850 cm ²
Volumen de la fase aceptora	1000 uL	600 uL	16 uL	3900 uL	0,6 uL	0,6 uL	8-8000 uL	400-2200 uL
Rango de log K _{ow}	3-10	4-6	3-7	1-5	3-7	1-3	3-10	3-10
R _s típicas	1-20 L/d	0,2-0,8 L/d	2,5-12 mL/d	1,5-3,5 mL/d	-	-	5-30 L/d	5-120 L/d
Periodo de exposición típico	15-30 d	7-14 d	20-28 d	30-365 d	30 min-horas	40-130 d	14-84 d	14-21 d
Régimen	Integrativo	Integrativo	Integrativo	Integrativo	Equilibrio	Integrativo	Equilibrio / Integrativo	Integrativo
Fragilidad	alta	baja	media	baja	alta	media	baja	baja
Volumen de disolvente / Simplicidad del análisis	~400 mL (complicado y largo)	10-20 mL	Nulo (desorción térmica)	20-30 mL	Nulo (desorción térmica)	Nulo (desorción térmica)	Nulo si se hace desorción térmica	Variable dependiendo del tamaño
Sensibilidad	alta	media	media	media	baja	media	alta	alta
Coste por análisis	alto	medio	medio	medio	bajo	medio	bajo	muy bajo

SPMD: dispositivo de membrana semipermeable; MESCO: recubrimiento absorbente sellado dentro de membrana; nd-SPME: microextracción en fase sólida *de equilibrio* (tipo desechable); TWA-SPME: microextracción en fase sólida integrativa (tipo inyector); SR: siliconas; LDPE: polietileno de baja densidad

1.4.6. Análisis instrumental

La identificación y cuantificación de POP en matrices ambientales es un reto para los químicos analíticos, ya que usualmente están presentes en concentraciones ultratrazas y en presencia de niveles relativamente más altos de otras sustancias, especialmente en el caso de compuestos emergentes. Las concentraciones de PBDE que se observan en matrices ambientales, p. ej., suelen ser menores que las de otros compuestos orgánicos semivolátiles, como los PCB. Por ello, para determinar sus niveles de manera fiable se necesitan métodos instrumentales altamente selectivos y sensibles. Como se comentó al principio de este capítulo, la etapa final de identificación ha acaparado gran parte del esfuerzo analítico del análisis de POP en los últimos años. El desarrollo de instrumentación analítica proporciona ahora LOD mucho más bajos. Al mismo tiempo, el aumento de la

disponibilidad comercial de estándares marcados isotópicamente con ^{13}C o ^2H permite en muchos casos el uso de la dilución isotópica (ID, de *Isotope Dilution*), que es, con mucho, el método de cuantificación más preciso y fiable para el análisis de compuestos orgánicos a nivel de traza.

1.4.6.1. Inyección y separación

Desde los años 60, los POP (típicamente sustancias cloradas, y más recientemente bromadas) (ver apartado 1.3) se han determinado mediante técnicas de cromatografía de gases (GC, de *Gas Chromatography*), inicialmente con columnas empaquetadas. Hoy en día, la separación se ha mejorado con el uso de columnas capilares y la GC continúa siendo la técnica de preferencia para la separación de compuestos no polares y volátiles. Actualmente, los detectores más avanzados han aumentado la posibilidad de identificación de analitos cuando no se puede obtener una separación cromatográfica completa, lo que puede ayudar a acortar el tiempo de cromatograma. Sin embargo, muchas veces, las cantidades traza de los analitos de interés coeluyen con otros componentes presentes en la matriz en concentraciones mayores y, aún cuando se dispone de detectores de última generación, sigue siendo necesaria una buena separación para la obtención de una cuantificación precisa en extractos de muestras ambientales.

La inyección en el sistema cromatográfico de gases es una etapa crítica tanto para el DDT como para los PBDE. Es bien conocido que el p,p'-DDT puede sufrir degradación favorecida por la matriz (por formación de p,p'-DDD, vía descloración y/o p,p'-DDE vía deshidrocloración) durante la inyección en el cromatógrafo de gases, que se ve agravada por la contaminación del puerto de inyección con residuos de alto punto de ebullición y que requiere de una limpieza y un pretratamiento cuidadosos del puerto de inyección del cromatógrafo (Foreman & Gates, 1997; Brown *et al.*, 2004; Gfrerer & Lankmayr, 2005). La adición previa de estándares internos marcados isotópicamente y el uso de MS para la cuantificación permite resolver el problema.

Los PBDE de grado alto de bromación (octa- a decaBDE), también se pueden degradar y sufrir desbromación si la temperatura del puerto de inyección *split/splitless* (normalmente entre 250 y 300 °C) es demasiado alta o si el tiempo de permanencia de los PBDE en el *liner* es demasiado largo (Tollbäck *et al.*, 2003; Björklund *et al.*, 2004; Blanco & Vieites, 2010). Por el contrario, una temperatura inferior a 300 °C en el modo de inyección *split/splitless* disminuye la evaporación del BDE-209, que va directamente a la columna junto con el disolvente dejando residuos en el *liner*, que debe ser reemplazado regularmente y limpiado apropiadamente para reducir el riesgo de contaminación secundaria de las muestras en análisis (Covaci *et al.*, 2003; Björklund *et al.*, 2004; Stapleton, 2006 *et al.*, 2006). La aplicación de presión (*Pressure Pulsed Splitless Injector*) mejora significativamente el rendimiento de la inyección, ya que disminuye el tiempo de residencia en el inyector y permite inyectar volúmenes mayores (de hasta 5 μL), proporcionando LOD más bajos. Por último, la inyección en columna, particularmente con válvula rotatoria, ha ganado popularidad recientemente en el análisis de los PBDE, ya que elimina la discriminación de los congéneres de peso molecular alto (incluyendo el BDE-209) y la degradación térmica en el inyector (Covaci *et al.*, 2003). Asimismo, esta técnica permite inyecciones de mayor volumen, lo cual es particularmente importante para las muestras con cantidad de trazas de PBDE (Björklund *et al.*, 2003b; Covaci *et al.*, 2007; Kolic *et al.*, 2009). La mayor desventaja

es que se requiere inyectar extractos muy limpios, ya que de otro modo la columna de GC puede deteriorarse rápidamente. Una alternativa interesante, especialmente si los efectos de la matriz no se pueden eliminar por completo, puede ser o bien el inyector de vaporización por temperatura programada (PTV, *Programmed Temperature Vaporizing Injector*) o el PTV con gran volumen de inyección (PTV-LVI, de *Large Volumen Injection*), que permiten inyectar volúmenes mayores (de hasta 125 μL) y, con ello, la determinación de concentraciones menores de PBDE (Stapleton *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2010). Además, la combinación de inyección en frío con una vaporización controlada elimina muchas de las desventajas comunes de los *inlets* calientes convencionales (Björklund *et al.*, 2004).

Respecto a la cromatografía en sí, a día de hoy, la mayoría de los estudios se llevan a cabo con columnas cromatográficas capilares, con fases estacionarias silícicas no polares o semipolares (p. ej. DB-5, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). En teoría, las columnas capilares largas o de diámetros internos estrechos con fases estacionarias de poco espesor pueden ayudar a proporcionar una separación mejor de algunos pares de POP difíciles, como BB-153 y BDE-154. Esta etapa adquiere gran importancia en el caso de los PBDE, debido tanto al gran número de isómeros como de posibles interferencias. El desarrollo de métodos cromatográficos que asignen tiempos de retención para los distintos componentes de la serie de congéneres de PBDE está limitado por la disponibilidad comercial de estándares individuales, aunque algunos autores han desarrollado algoritmos basados en las relaciones estructurales de las fases estacionarias y los patrones de sustitución bromada para el cálculo de los tiempos de retención de los compuestos no disponibles (Wang *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2006). Cuando se sintetizaron los primeros estándares con congéneres no presentes en las mezclas comerciales, Eljarrat *et al.* (2002) optimizaron en nuestro laboratorio la identificación de 40 congéneres, que fue el método utilizado en el momento en que se realizaron los primeros trabajos experimentales de esta tesis. Posteriormente, Korytár *et al.* (2005a) estudiaron el orden de elución de 126 PBDE para siete columnas capilares diferentes y, más recientemente, Wei *et al.* (2010) han proporcionado los tiempos de retención relativos de 180 congéneres en dos columnas capilares bajo diferentes condiciones de operación. En general, la mayor eficiencia de separación para PBDE se consigue con columnas capilares no polares o semipolares de 30-60 m con diámetros <0.25 mm (Covaci *et al.*, 2003) ; Stapleton *et al.*, 2006; Lacorte & Guillamon, 2008). Por otra parte, se ha observado que la degradación es dependiente de la fase estacionaria, incluso entre columnas “equivalentes” (Björklund *et al.*, 2004; Korytár *et al.*, 2005a). La columna DB-XLB (J&W Scientific) parece ser la más eficiente para la separación de PBDE, seguida de la DB-1 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Esta última es, sin embargo, la preferida para análisis de rutina, ya que causa una menor degradación de los congéneres más bromados. Por otra parte, se ha visto también que una temperatura alta (325 °C) es óptima para prevenir efectos de discriminación pero provoca una pérdida significativa de los congéneres más bromados. De hecho, estos congéneres con frecuencia requieren condiciones especiales que incluyen temperaturas de inyector y de columna moderadas, así como columnas de GC más cortas y estrechas con poco espesor de fases (p. ej., 10-15 m de largo x 0,10 mm de diámetro interno x 10-20 μm de espesor de película) (Björklund *et al.*, 2004; Stapleton *et al.*, 2006).

Actualmente existe una tendencia creciente a usar GC bidimensional (GCxGC) en el análisis de POP y ha sido aplicada con éxito en el análisis de contaminantes polihalogenados (Korytár *et al.*, 2006). Ejemplos del potencial de la GCxGC acoplada a MS son la separación completa de

192 congéneres de PCB (Focant *et al.*, 2004a) o la determinación simultánea de 97 contaminantes ambientales, incluyendo DDE (Matamoros *et al.*, 2010). Aunque la técnica de GCxGC todavía se considera una alternativa muy cara a la GC tradicional, su alto poder de resolución, permite el análisis de mezclas complejas, incluso con ECD, siendo esta combinación relativamente barata (Muscalu *et al.*, 2010). Esta técnica también ha sido evaluada para el análisis de PBDE, ya que, incluso con las fases estacionarias más eficientes, la GC unidimensional no puede separar todos o casi todos los congéneres de la serie. De los 126 congéneres de PBDE estudiados por Korytár *et al.* (2005a), con la fase más eficiente (DB-XLB), 55 congéneres no pudieron ser separados individualmente y se producían 22 coeluciones. Con GCxGC y una combinación de columnas DB-1 × 007-65HT (Quadrex), los mismos autores consiguieron reducir el número de analitos no resueltos a 35 (con 17 coeluciones), así como identificar los nona-BDE (206, 207 y 208) como los principales productos de descomposición del BDE-209 durante la GC y mejorar la separación de otros BFRs o MeO-BDE, que pueden estar presentes en muestras ambientales (Korytár *et al.*, 2005b). Por su parte, Focant *et al.* (2004b) en un método multirresiduos para PBDE, PBB, PCB y plaguicidas organoclorados vieron que con GC integral × GC se conseguía la separación de TBBP-A y BDE-153, aunque no la de otros FR y, también, metabolitos hidroxilados y metoxilados. Bordajandi *et al.* (2008) probaron combinaciones de nueve columnas con diferentes polaridades y selectividades (p. ej., ZB-5, HT-8 y BPX-50) para la separación de ocho clases de POP incluyendo OCP, PCB, PBDE, y PCDD/Fs. Encontraron que ciertas combinaciones de columnas proporcionaban mejor resolución entre familias seleccionadas (p. ej. HT-8 x BPX-50 para PBDE y PCDD/Fs, y DB-17 x HT-8 para OCP) y permitían hacer un barrido rápido de esos compuestos en extractos de muestras reales no fraccionadas. Por otra parte, muchos OCP en la lista de la Convención de Estocolmo, son ópticamente activos o tienen isómeros quirales, como el o,p'-DDT, los alfa-y beta-Clordanos o algunos congéneres de PCB con rotación restringida en el enlace bifenilo central. Una columna GC capilar quiral combinada con una columna de GC no quiral en tándem proporcionan una separación adicional de este tipo de compuestos que ha servido, p. ej., para calcular las tasas de transformación de POP en una red alimentaria (Wong *et al.*, 2004). A pesar de las ventajas de esta técnica, sin embargo, el procesamiento bajo criterios de calidad del gran volumen de datos que genera la GCxGC y el análisis cuantitativo todavía no está resuelto y dificulta su consolidación como alternativa viable en análisis de rutina.

1.4.6.2. Detección

Durante años, las técnicas químicas para el análisis de los POP se centraron en el acoplamiento de la GC a detectores convencionales, típicamente el detector de captura de electrones (ECD, de *Electron Capture Detector*), debido a su alta sensibilidad para los compuestos que contienen elementos electronegativos en sus moléculas, como es el caso de contaminantes orgánicos aromáticos clorados y bromados (Guzzella *et al.*, 2008). El ECD sigue siendo una técnica de detección de rutina de bajo coste y fácil manejo, con LOD instrumentales de 0,1-0,5 pg para OCP (Haglund *et al.*, 2008). No obstante, hoy en día este detector juega un papel más bien modesto, ya que en matrices complejas con presencia de otros compuestos halogenados es imposible una identificación inequívoca y se producen fácilmente interpretaciones erróneas (Alaee *et al.*, 2001). El ECD se puede aplicar al análisis de PBDE en muestras con concentraciones altas. Se

han empleado con éxito, p. ej., para el análisis de PBDE en muestras de leche humana, combinado con dos columnas capilares de diferente polaridad, que disminuyen significativamente las coeluciones (Lind *et al.*, 2003). Recientemente se han visto buenos resultados para el análisis de BDE-209 con ausencia de degradación, que se considera el inconveniente más significativo en el caso de análisis de congéneres altamente bromados (Kebede *et al.* 2011).

La espectrometría de masas (MS, de *Mass Spectrometry*), que se viene utilizando para el análisis de POP desde la década de 1980, es, actualmente, el detector acoplado más comúnmente a la GC, debido a que la separación de masas resuelve muchos de los problemas de coelución entre las diferentes categorías de analitos (p. ej. PCB-180 y BDE-47). Ahora, a medida que están disponibles comercialmente más estándares de POP marcados con ^{13}C y ^2H , otra ventaja de la MS es que permite la aplicación de dilución isotópica (Mechlińska *et al.*, 2010).

La forma de ionización que se utiliza más habitualmente en la entrada del espectrómetro de masas en el análisis de POP es el impacto o ionización electrónica (EI, de *Electron Ionization*). La mayoría de los métodos para DDX se basan en esta técnica (Vryzas *et al.*, 2009; Bouwman *et al.*, 2012; Cao *et al.*, 2013). La EI también ha sido aplicada para el análisis de PBDE, basando la cuantificación en iones moleculares $[\text{M}]^+$ o $[\text{M}-\text{Br}_2]^+$ (Tollbäck *et al.*, 2003; Isoaari *et al.*, 2005; Vetter & Rosenfelder, 2008). Sin embargo, la sensibilidad que se obtiene con ella no es muy buena, especialmente para los congéneres de mayor grado de bromación (al aumentar el peso molecular y disminuir la volatilidad), lo que limita su uso con detectores modestos (Covaci *et al.*, 2007).

La ionización química negativa (NCI, de *Negative Chemical Ionization*), más suave que la EI, proporciona una mayor sensibilidad para compuestos halogenados, por lo que es la técnica más utilizada para PBDE (Law *et al.*, 2006a; Labadie *et al.*, 2010b; Liu *et al.*, 2011b; Cincinelli *et al.*, 2012). Sin embargo, es menos selectiva, ya que solamente produce iones negativos monoatómicos $[\text{Br}]^-$ ($m/z = 79$ y 81), utilizando el espectrómetro de masas esencialmente como un detector selectivo de bromo (excepto para el BDE-209). En modo de NCI, en el que sólo los iones $[\text{Br}]^-$ son monitoreados, la interferencia en la determinación de los PBDE puede provenir de otros contaminantes orgánicos bromados tales como MeO-PBDE y PBB. Los picos de MeO-tetra-BDE y congéneres MeO-Cl-tetraBDE no están bien separados de los picos de BDE-100 y BDE-99 (Marsh *et al.*, 2004) al igual que ocurre con el BDE-154 y el PBB-153 en columnas DB-5 (Covaci *et al.*, 2003). Durante el análisis de muestras ambientales para el contenido de PBDE por GC-NCI-MS, a menudo aparecen en los cromatogramas picos de compuestos desconocidos. Algunos de ellos fueron identificados como sustancias que ocurren naturalmente en el ambiente, producido por las algas y esponjas. En este grupo, se observan derivados metoxilo e hidroxilo de éteres de difenilo bromados: MeO-BDE y OH-BDE. Los procedimientos de extracción y de purificación para la determinación de MeO-BDE y OH-BDE son los mismos que para los PBDE, lo que provoca la presencia simultánea de estos compuestos en los extractos finales.

Además, la NCI no puede discriminar los PBDE marcados con ^{13}C y ^2H de los analitos nativos, con lo que elimina la posibilidad de su uso como patrones internos y de la cuantificación por dilución isotópica, que sí es posible con EI (Alaee, 2001; Eljarrat *et al.*, 2002). Recientemente, González-Gago *et al.* (2011) han sintetizado PBDE marcados con ^{81}Br para la determinación por dilución isotópica con NCI-MS de varios PBDE en muestras de agua de río y tejido de peces validado por SRM 1947, sin que se observase intercambio isotópico entre átomos de bromo.

Se han utilizado instrumentos con diferentes analizadores de masa, p. ej. sectores magnéticos, cuadrupolos (Q, de *Quadrupole*), trampas de iones (IT, de *Ion Trap*) y analizadores de tiempo de vuelo (TOF, de *Time-Of-Flight*). En general, los analizadores de masas de baja resolución (LRMS, de *Low-Resolution Mass Spectrometry*), como los Q y las IT pueden ser utilizados para los POP más abundantes (p. ej. PCB orto-sustituídos, PAH, algunos OCP), pero esta técnica no se puede utilizar para el análisis de ultratrazas, o cuando se han de cumplir mínimos legislativos (p. ej., para PCDD/F, PBDE, no-ortoPCB), ya que tienen algunas limitaciones, como es la posibilidad de falsos positivos debido a la baja resolución de masas (Muir & Sverko, 2006).

En el caso de los PBDE, la LRMS puede ser suficiente si se trabaja con NCI, pero no suele serlo si se aplica EI. La EI-LRMS se considera útil debido al bajo coste de la instrumentación y a su fácil mantenimiento, y proporciona buenos resultados para las muestras con un contenido relativamente alto de PBDE. Sin embargo, cuando están presentes en niveles muy bajos de concentración, como a menudo ocurre, también puede dar lugar a problemas causados por la coelución de interferencias con las mismas masas. P. ej., la masa nominal de los iones monitorizados para diBDE es la misma que la de los penta-CBs ($m/z=326$). Una interferencia similar ocurre entre tetra-BDE y heptaCB, como la coelución entre BDE-47 y CB-180 en columnas DB-5 de 30m, como se puede observar en la Figura 23 (Eljarrat *et al.*, 2003; Covaci *et al.*, 2003). Alae *et al.* (2001) vieron que dentro de los congéneres con el mismo número de átomos de bromo, aquellos que tienen sustituciones en las posiciones “orto” forman iones $[M-Br_2]^+$, que es más específico que los iones $[M]^+$ (Blanco & Vieites, 2010). También se dan interferencias por la presencia de dibenzofuranos bromados (PBDF), que pueden ser evitadas bajando la energía de ionización de 70 a 35 eV, de manera que la proporción de iones moleculares aumenta (Morris *et al.*, 2004).

Cuando se acopla a MS de alta resolución (HRMS, de *High-Resolution Mass Spectrometry*), la EI adquiere la sensibilidad suficiente y resulta la técnica más selectiva y precisa para la determinación de PBDE (Athanasidou *et al.*, 2006; Hites, 2008; Losada *et al.*, 2010a). Un estudio comparativo llevado a cabo para determinar PBDE en muestras de leche materna mostró que los LOD obtenidos por un analizador TOF de alta resolución fueron un orden de magnitud inferior a los obtenidos con el analizador cuadrupolo tradicional (Kazda *et al.*, 2004). El sector magnético de doble enfoque (Sector-MS) también puede proporcionar datos sensibles y selectivos (Thomsen *et al.*, 2002). Sin embargo, el coste de los instrumentos de HRMS es muy alto para análisis de rutina y su puesta en marcha requiere habilidades técnicas específicas.

Una herramienta muy útil para propósitos de confirmación es la MS en tándem (MS/MS), que se ha convertido en el método de elección para la cuantificación de bajos niveles de compuestos de interés en presencia de una señal de fondo alta procedente de la matriz, como ocurre en muestras ambientales (Gonçalves & Alpendurada, 2004). Además, la eliminación de posibles interferencias puede proporcionar un incremento efectivo en la sensibilidad del análisis (Lagante & Oswald, 2008). La ruta de fragmentación en MS/MS depende del tipo de conéner. Para tetra-, penta- y hexaBDE, no sustituidos en la posición “orto”, el mayor grupo de iones resulta de la pérdida de átomos de bromo, mientras que el fragmento predominante para otros congéneres es $[M-COBr]^+$. Los di- y tri-BDE pierden el último átomo de bromo durante la etapa de excitación, a excepción de los no sustituidos en la posición orto (BDE-11, BDE-12, BDE-13, BDE-15, BDE-35 y BDE-37), para los que los iones hijos de mayor intensidad provienen de la pérdida del fragmento COBr (Pirard *et al.*, 2003). Mackintosh *et al.* (2012) compararon el

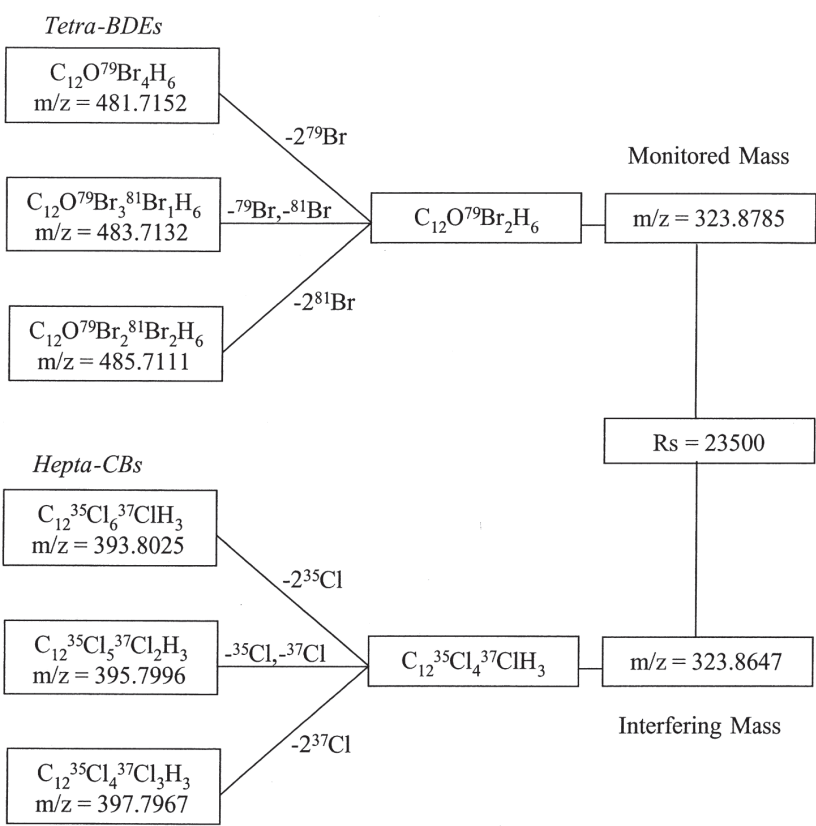
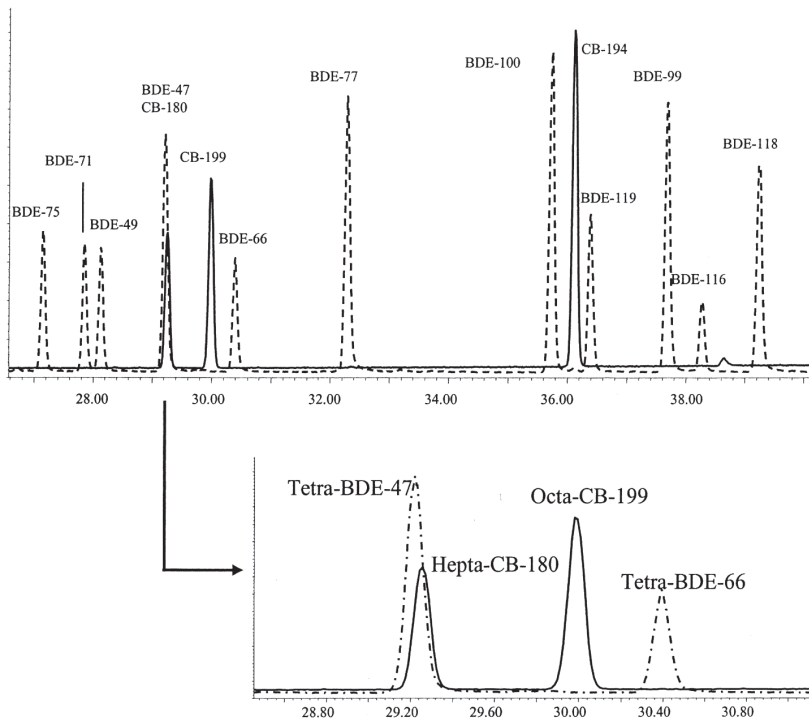


Figura 23. (a) Ejemplo de coelución entre los picos correspondientes a la inyección de soluciones estándar de PBDE y PCB con una columna HP-5ms (30 m x 0,25 mmdíametro interno, 0,25mm espesor de película). (b) Interferencias entre tetra-BDE y hepta-CBs. Se necesita una resolución de 23500 para resolver los iones obtenidos por pérdidas de dos átomos de bromo y dos átomos de cloro, respectivamente (Eljarrat et al., 2003).

rendimiento analítico entre la MS/MS de triple cuadrupolo (QqQ-MS/MS) y la HRMS para la determinación de PBDE en peces y observaron que la QqQ-MS/MS ofrecía LOD iguales o incluso inferiores que los de la HRMS. Sin embargo, la QqQ-MS/MS tenía algunas interferencias isobáricas que podían ser causa de falsos positivos. La MS/MS con cuadrupolo y trampa de iones (QTrap o QIT-MS/MS) se ha aplicado con éxito para el análisis de bajas concentraciones (ng/g) de mono- a heptaBDE en muestras ambientales (p. ej., lodos de depuradora). Los cromatogramas obtenidos no mostraron efectos significativos de la matriz, ni problemas de coeluciones que interfieran, lo que la convierte en una alternativa prometedora de bajo coste, rápida y fiable a los instrumentos de HRMS para el análisis de matrices complejas (Gómara *et al.*, 2006; Blanco & Vieites, 2010; Malavia *et al.*, 2011). No obstante, el desarrollo de la metodología de GC-QTrapMS para el análisis de los congéneres octa- a decaBDE requiere todavía mayor investigación.

Tabla 10. Comparación entre las técnicas de MS utilizadas en el análisis de PBDE

	NCI-LRMS	EI-LRMS	EI-HRMS	QIT-MS/MS
Sensibilidad	media	baja	alta	media
Selectividad	baja (ión bromuro)	media (masa molecular nominal)	alta (masa molecular exacta)	media (masa molecular nominal)
Exactitud	media (patrón interno)	alta (dilución isotópica)	alta (dilución isotópica)	alta (dilución isotópica)
Coste	bajo	bajo	alto	medio

NCI-LRMS: ionización química negativa y espectrometría de masas de baja resolución; EI-LRMS: ionización por impacto electrónico y espectrometría de masa de baja resolución; EI-HRMS: ionización por impacto electrónico y espectrometría de masa de alta resolución; QIT-MS-MS: espectrometría de masa en tándem con cuadrupolo y trampa de iones

También recientemente, se han introducido algunas técnicas de detección atractivas para el análisis por CG de PBDE, como la MS con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS, de *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*). Comparada con otras técnicas como ECD y MS, la ICP-MS ofrece mejor sensibilidad y selectividad, gracias a la eficiencia de la ionización con el uso de plasma y a que solo detecta los iones de bromo, lo que elimina las posibles interferencias que resultan de la presencia de compuestos clorados o sulfurados (Xiao *et al.*, 2007).

Además, aunque la GC sigue siendo dominante en el análisis de los contaminantes orgánicos no polares, la cromatografía líquida (LC, del inglés *Liquid Chromatography*) también ha aparecido en escena para algunos de ellos. Por ejemplo, muchas de las determinaciones de los compuestos perfluorados previamente realizadas por GC se realizan ahora por LC-MS/MS debido a su simplicidad y a que no necesita derivatización (Llorca *et al.*, 2011). El uso de esta cromatografía ha permitido realizar acoplamiento en línea con la SPE, por ejemplo para el DDT (Torres Padrón *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2006; Vega *et al.*, 2008). En el caso de los PBDE y pese a su bajo poder de resolución comparado con la GC, algunos autores han trabajado con ella como una alternativa posible para evitar el riesgo de degradación térmica de los congéneres de PBDE altamente bromados, particularmente con separación bidimensional y/o MS/MS con fotoionización a presión atmosférica (APPI, de *Atmospheric Pressure Photo Ionization*) (Debrauwer *et al.*, 2005; Lagalante & Oswald, 2008; Ma *et al.*, 2011).

2

Analisis químico convencional
mediante SPLE y niveles
ambientales en sedimentos
y biota

■ 2.1. Introducción

Como se ha comentado en la introducción general, para evaluar el grado en que los seres vivos se ven expuestos a las propiedades tóxicas de los contaminantes es fundamental poder determinar la concentración en las matrices ambientales a las que estos pueden acceder. Actualmente las diferentes normativas relativas a la calidad de los sistemas acuáticos se basan en el análisis total de la concentración en muestras de la columna de agua, incluyendo tanto la fracción disuelta como la asociada a sólidos, por considerar que ambas son accesibles de una forma u otra para los seres vivos. Para compuestos hidrofóbicos, cuya concentración disuelta es muy baja a veces se sustituye el análisis de muestras de agua por el de sedimento (p. ej. en la directiva hija de la WFD sobre sedimento y biota (EC, 2010)). En este caso, también bajo el principio de precaución, se adopta igualmente el criterio de exhaustividad del análisis. En este capítulo se tratan los resultados referentes al desarrollo y aplicación de métodos para el análisis de la carga total de PBDE y DDX en sedimentos de río y peces, que se llevó a cabo mediante extracción con líquidos presurizados selectiva seguida de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (SPLE-GC-MS).

En el momento en que se comenzó el trabajo experimental de esta tesis, el hallazgo del incremento de los niveles ambientales y humanos de PBDE (Norén & Meironyté, 2000), las evidencias de su transformación ambiental en congéneres no presentes en las mezclas comerciales (De Boer *et al.*, 2000; Hale *et al.*, 2002) y las crecientes sospechas de posibles efectos indeseados (Fowles *et al.*, 1994), habían elevado el grado de preocupación a tal punto que comenzaba a considerarse la necesidad de su regulación. Sin embargo, la mayoría de los estudios existentes se limitaban al estudio de los principales congéneres presentes en las mezclas técnicas. Para comprender el comportamiento y el alcance de la exposición a este grupo de compuestos, era necesario el desarrollo de métodos que permitiesen el análisis de un mayor número de congéneres individuales.

Por otra parte, habían entrado en el mercado una serie de nuevas técnicas de preparación de muestra, tales como la PLE, la MAE o la SFE, que se caracterizan por el menor consumo de disolventes, el menor tiempo de extracción, y la automatización, al tiempo que mantienen la eficiencia de las técnicas tradicionales o incluso la mejoran (ver 1.4.4.1), y que podían suponer una mejora significativa respecto a los métodos de análisis existentes para los POP históricos, como es el caso de los DDX. De estas técnicas, la PLE —también conocida por el nombre comercial de su primer fabricante (Dionex): extracción con disolventes acelerada (ASE, de *accelerated solvent extraction*)— es la más exhaustiva, y partía con la ventaja de que, generalmente, se pueden adoptar directamente los mismos disolventes que son utilizados en los métodos Soxhlet existentes para los analitos en cuestión. Además, a diferencia de la MAE, la PLE no requiere una etapa de filtración posterior. Estas características hicieron que esta técnica fuese aceptada rápidamente en 1995 por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA o EPA, del inglés *United States Environmental Protection Agency*) como método de análisis de POP en residuos sólidos (USEPA, 1995) y que haya llegado a utilizarse ampliamente como procedimiento de extracción para una variedad de aplicaciones ambientales (incluyendo protocolos de PHWE, en la que se utiliza agua como extractante).

En una PLE convencional, la muestra se empaqueta en una celda de acero inoxidable, normalmente dispersada en un adsorbente inerte o secante, como Hydromatrix, tierra de diatomeas o sulfato sódico y, una vez insertada ésta en un sistema de flujo cerrado (Figura 24), es extraída

con un disolvente a alta temperatura, habitualmente por encima de su punto de ebullición (hasta 200°C) y una presión relativamente alta (hasta 20 MPa) (Richter *et al.*, 1996). La energía térmica proporcionada en la PLE, hace que la viscosidad y tensión superficial del disolvente se reduzca, incrementando su capacidad para penetrar en la matriz y arrastrar los analitos -cuya solubilidad también se ve incrementada-, al tiempo que ayuda a la rotura de los enlaces de adsorción superficial entre analitos y matriz. La alta presión, además de mantener el disolvente en el estado líquido incluso a las altas temperaturas utilizadas, puede ayudar a forzar la entrada del disolvente en los poros de la matriz. Estas condiciones, encaminadas a favorecer una extracción exhaustiva de los analitos de la matriz, permiten una mayor rapidez y un menor consumo de disolvente que los métodos clásicos de extracción a temperatura cercana a la ambiental y a presión atmosférica (20-30 min y 10-50 mL frente a 10-48 h y 100-200 mL en el Soxhlet). No obstante, la estabilidad térmica de los analitos de interés y, en ocasiones de la matriz, puede plantear limitaciones en las condiciones experimentales.

Básicamente, casi todas las investigaciones se han realizado en un modo de extracción estática, que incluye un intervalo de 5-20 min. en el que el disolvente añadido inicialmente se mantiene en contacto con la muestra antes de ser transferido al vial de recogida. Tras este tiempo, se bombea disolvente fresco para lavar la muestra y las líneas de conexión, que finalmente es purgado al vial usando un gas adecuado, generalmente N₂. También se han realizado algunos experimentos en los que la PLE se ha ejecutado en un modo dinámico (Luque-García & Luque De Castro, 2003), de manera que el disolvente es bombeado a través de la celda de manera continua durante la extracción, si bien implica un mayor consumo de disolvente.

El pretratamiento de la muestra necesario para la extracción mediante PLE es similar a los de otras técnicas de extracción con disolventes, y en la mayoría de los métodos se reduce a su secado, su homogeneización y, en algunos casos, su tamizado. De igual manera, y a pesar del control que se puede ejercer en la selectividad de la extracción mediante la modificación de parámetros como el disolvente y la temperatura, la PLE suele necesitar de procedimientos de purificación de los extractos similares a los utilizados en los protocolos clásicos de determinación de contaminantes orgánicos en muestras ambientales. Estas etapas de purificación de los extractos necesarias antes de la inyección en el sistema cromatográfico, alargan el proceso y suponen una mayor manipulación de la muestra, con los inconvenientes en cuanto a reproducibilidad que ello puede implicar. La PLE, sin embargo, ha permitido simplificar y automatizar estos protocolos considerablemente. Varios autores sugirieron diferentes formas de realizar los procesos de extracción y de purificación de manera simultánea, mediante la inclusión en la propia celda de PLE de los adsorbentes o productos químicos que se utilizan para la purificación de los extractos (clásicamente utilizados en una etapa independiente), ya sea mezclado con la muestra o formando una columna bajo ella, en lo que se ha dado en llamar PLE Selectiva (SPLE, del inglés *Selective Pressurized Liquid Extraction*). Uno de estos “atajos” es la inclusión de cobre en polvo en la extracción de sedimentos, para prevenir la extracción del azufre elemental, que puede interferir en el análisis instrumental (especialmente cuando se utiliza detector de captura de electrones o ECD), e incluso provocar obstrucciones del sistema de PLE (Kreisselmeier & Dürbeck, 1997; Schantz *et al.*, 1997; Smedes & De Boer, 1997). Especialmente prometedora era la inclusión en la celda de adsorbentes en la celda del ASE para purificar los extractos de matrices grasas. En el momento en que se comenzó

este trabajo, esta práctica había sido probada en cuatro estudios para la extracción de PCB, DDT y otros POP en matrices biológicas (Ezzell, 1996; Björklund *et al.*, 2001; Gómez-Ariza *et al.*, 2002) y suelos (Hubert *et al.*, 2000).

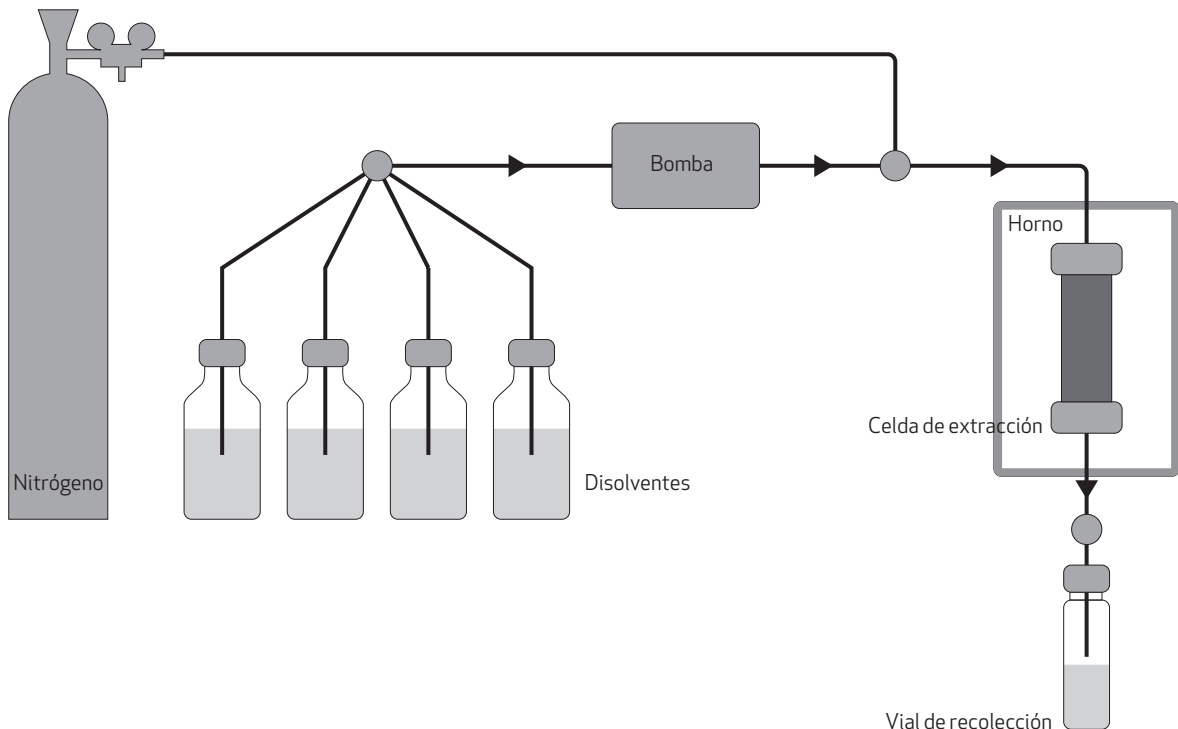


Figura 24. Diagrama esquemático de un sistema de PLE.

■ 2.2. Trabajo experimental

El trabajo experimental referente a métodos de análisis “convencionales” dio lugar a varias publicaciones científicas, de las cuales se presentan aquí las que mejor se adecúan al hilo conductor de la tesis. El primer artículo presentado (Artículo #1) describe la optimización de un método analítico para la determinación de mono- a hepta-BDE en muestras de sedimentos de río y sedimentos costeros mediante SPLE seguida de GC-MS. La aplicación del método para la extracción del BDE-209, cuyas características físico-químicas implican la aplicación de condiciones diferentes a la del resto de congéneres de PBDE, se describe en el artículo #2. Posteriormente, dicha metodología fue validada satisfactoriamente para la determinación en biota (peces) de PBDE, así como del DDT y sus metabolitos, y aplicada en muestras procedentes de la cuenca del río Ebro (artículos #3 y #4). En la discusión de resultados se hace referencia a los datos más relevantes no incluidos en estos artículos.

La metodología optimizada y aplicada para los dos grupos de compuestos, tanto en sedimentos como en biota (pez entero, músculo e hígado) consiste en la extracción y purificación simultánea de la muestra mediante SPLE, gracias a la inclusión en la celda de extracción de una columna de alúmina y, en el caso del sedimento, también de cobre (Figura 25), tal como se

describe en los artículos. El pretratamiento de la muestra consistió en su secado por liofilización y molienda, excepto cuando el tamaño de muestra era demasiado pequeño, como ocurría en el caso del hígado de peces, en que se añadió Na_2SO_4 , ya que si la masa de muestra es muy pequeña, una vez seca resulta difícil de manejar sin que se produzcan pérdidas. La determinación posterior se llevó a cabo por GC acoplada a MS, con columnas con 5% fenil - 95% metilpolisiloxano de 30 metros, excepto en el caso del BDE-209, que requirió el uso de una columna más corta y condiciones especiales. Para los DDX se aplicó ionización por EI, con monitorización del ión molecular, mientras que, en el caso de los PBDE, por cuestión de sensibilidad, se monitorizó en ion bromuro, tras ionización mediante NCI.

En el marco del proyecto TRACOAL, sobre contaminantes en puertos, en el año 2002 se realizaron una serie de campañas de muestreo en varios “puntos calientes” en el área de influencia de emisarios procedentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (EDAR o WWTPs, de *waste water treatment plants*) de la costa mediterránea, así como de algunos puntos de los ríos Llobregat y Besos, que sirvieron para la aplicación de los métodos desarrollados en los Artículos #1 y #2. La aplicación del método desarrollado en los artículos #1 y #2 de manera extensiva, incluyendo muestras de peces y el análisis de DDX, se llevó a cabo en el río Cinca, en torno al área industrial de Monzón (Huesca), punto de la Red de Control de Sustancias Peligrosas de origen industrial (RCSP) de la Confederación Hidrográfica del Ebro (CHE). Parte de los resultados de la primera campaña de muestreo realizada en esta área, en el año 2002, se detallan en los artículos #3 (BFRs) y #4 (DDX). En el año 2004-5 se realizó otra serie de campañas en las que, además de los análisis de sedimentos y biota autóctonos, se realizó un experimento de bioacumulación de contaminantes en peces en jaulas.

El muestreo de sedimento, tanto en las zonas costeras de Cataluña (Artículos #1 y #2) como en el río Cinca (Artículos #3 y #4) se llevó a cabo de manera convencional, recogiendo los 2 cm superficiales con pala o con draga Van Veen dependiendo de la accesibilidad del sitio. En el laboratorio se seleccionó la fracción del sedimento inferior a 120 μm . Los peces fueron capturados mediante pulso eléctrico y seleccionados por edad y especie.

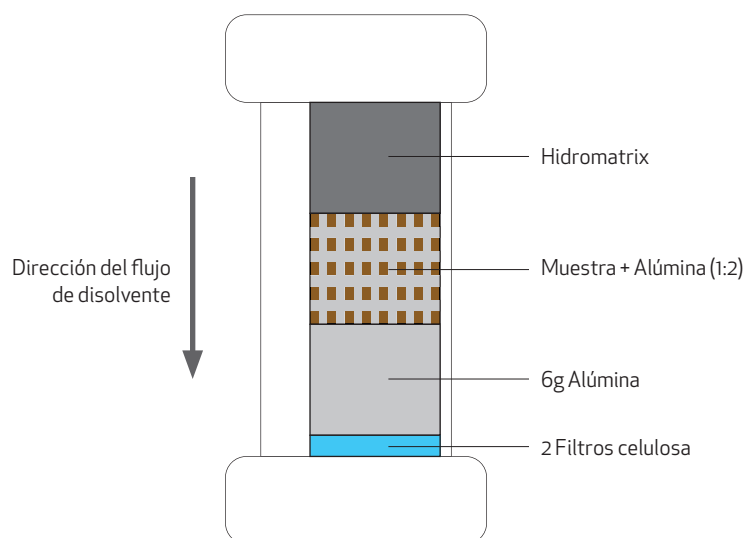


Figura 25. Distribución de muestra y adsorbentes en el interior de la celda del ASE

■ 2.3. Artículo científico #1

Determination of 39 polybrominated diphenyl ether congeners in sediment samples using fast selective pressurized liquid extraction and purification

A. de la Cal, E. Eljarrat, D. Barceló
J Chromatogr A (2003) 1021(1-2):165-173



Determination of 39 polybrominated diphenyl ether congeners in sediment samples using fast selective pressurized liquid extraction and purification

Agustina de la Cal, Ethel Eljarrat*, Damià Barceló

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

Received 1 April 2003; received in revised form 2 September 2003; accepted 10 September 2003

Abstract

In order to reduce time of analysis, a new pressurized liquid extraction (PLE) method that automatically and rapidly achieves quantitative and selective extraction of 39 polybrominated diphenyl ether (PBDE) congeners in sediment samples was optimized. It consists of on-line cleanup by inclusion of sorbents in the extraction cell. The new method was compared with a conventional method based on the use of Soxhlet extraction followed by solid-phase extraction (SPE) with cartridges. The instrumental determination was performed by GC–MS, using negative chemical ionization in the selected-ion monitoring mode. Recoveries from 47 to 82% were obtained for spiked tri- to hepta-PBDE congeners in sediment sample. The repeatability of replicate extractions was better than 15% relative standard deviation. The detection limits obtained with the new developed method were between 1 and 46 pg/g dry weight. The reduction in the sample preparation (extraction + cleanup) time (from days to 30 min) with a similar efficiency than that afforded by the conventional Soxhlet extraction–SPE cleanup technique indicates the suitability of this method. The method was applied to sediment samples where the analytes were detected in the range of 0.86–2.49 ng/g dry mass.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Pressurized liquid extraction; Extraction methods; Sediments; Polybrominated diphenyl ethers; Halogenated compounds

1. Introduction

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are used in large quantities as flame-retardant additives in polymers, especially in the manufacture of a great variety of electrical appliances, including televisions and computers, building materials, and textiles [1]. Structural similarity to other environmental chemicals with known toxic effects (polychlorinated biphenyls (PCBs), polybrominated biphenyls (PBBs), dioxins) indicated that PBDEs can be harmful to health. The acute toxicity of PBDEs is low, however, there is concern for its long-term effects on the endocrine system [2,3]. Moreover, for many countries decreasing levels of organochlorine compounds have been reported recently in human milk [4] while levels for PBDEs increased continuously since 1972 [5]. Due to these findings, there is a growing tendency to analyze PBDEs in various environmental and biotic matrices.

The development of analytical methods to analyze PBDEs is a hard task. Several methods for analysis of PBDEs have been developed involving extraction with organic solvents or supercritical fluid extraction and further cleanup by adsorption chromatography [6] or by SPE [7]. Most of the analyses have concentrated on only a few specific major PBDE congeners. However, a simple and rapid method for the ultra-trace quantification of individual congeners is required to determine the extent of environmental exposure, the risk associated with specific congeners and their fate in the environment.

It is a well-known fact that pressurized liquid extraction (PLE) allows reduction of both extraction time and organic solvent consumption and increases sample throughput. Their uses have been reported for several studies in different applications. Recently, a review of the PLE applications for the extraction of moderately non-volatile organic pollutants from a variety of solid environmental matrices has been published [8]. In particular, there are studies on the analysis of different pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), PCBs, polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzo furans (PCDFs) in sediments

* Corresponding author. Tel.: +34-93-400-6170; fax: +34-93-204-5904.

E-mail address: eeeqam@cid.csic.es (E. Eljarrat).

and sludge. However, in most of the reported applications of PLE, an exhaustive cleanup of the extracts prior to injection in the chromatographic system is necessary [9,10]. In an attempt to eliminate this time-consuming step, some authors proposed in-cell cleanup by packing the sample dispersed in an adsorbent, such as modified silica, Florisil or alumina [11,12], for PCB determinations. To our knowledge, there are no works concerning the PBDE extraction by PLE.

The aim of this study was to develop a rapid and simple method for the congener-specific determination of 39 different PBDEs, from mono- to hepta-BDE congeners, in sediment samples. An analytical method based in selective pressurized liquid extraction (SPLE) without further cleanup step was optimized. The quality parameters of the method are reported. In addition, the method was compared with conventional system using a Soxhlet extraction followed by a SPE cleanup. Different sediment samples from Catalonia (NE Spain) were analyzed using the developed method.

2. Material and methods

2.1. Standards and reagents

The Polybrominated Diphenyl Ether Analytical Standard Solution EO-5099 and the Decabrominated Diphenylether (BDE-209) were purchased from Cambridge Isotope Labs. (MA, USA). The components of EO-5099 solution were: 3 mono-BDEs, 7 di-BDEs, 8 tri-BDEs, 6 tetra-BDEs, 7 penta-BDEs, 5 hexa-BDEs and 3 hepta-BDEs (see Table 1). Moreover, the mixture also contains 11 ^{13}C -labeled BDE congeners: 1 mono-BDE (^{13}C]BDE-3), 1 di-BDE (^{13}C]BDE-15), 1 tri-BDE (^{13}C]BDE-28), 2 tetra-BDEs (^{13}C]BDE-47 and ^{13}C]BDE-77), 4 penta-BDEs (^{13}C]BDE-99, ^{13}C]BDE-100, ^{13}C]BDE-118 and ^{13}C]BDE-126), 1 hexa-BDE (^{13}C]BDE-153) and 1 hepta-BDE (^{13}C]BDE-183). The concentrations of each compound ranged from 100 pg/ μl for the mono congeners to 250 pg/ μl for the hepta congeners. The decachlorinated biphenyl (PCB-209) was purchased from Lab. Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany).

Five different solutions were prepared in order to check the linearity of the method. These solutions contained 39 PBDE congeners as well as the BDE-209, at different

concentrations ranging between 5 and 200 pg/ μl , and the PCB-209 always at 100 pg/ μl .

Solvents (dichloromethane and hexane) for organic trace analysis were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Alumina and Florisil cartridges were obtained from IST. Alumina (0.063–0.200 mm) and copper (<63 μm) were obtained from Merck, and Hydromatrix (pelletized diatomaceous earth) from Varian.

2.2. Sample collection

Samples analyzed in this study were river and marine sediments (RS and MS, respectively) collected using a Van Veen grab. The samples were transferred to the laboratory at a temperature of 4 °C, then frozen at –20 °C before being freeze dried. The lyophilized samples were grounded and homogenized by sieving through a stainless steel 2-mm sieve, and stored in sealed containers at –20 °C until analysis.

For the optimization studies, a river sediment control obtained from river receiving domestic wastewater mixed with wastewater originating from the rubber industry was used.

2.3. Selective PLE

Before extraction, 10 μl of surrogate standard were added to 1 g dry mass of each sample. Spiked samples were kept overnight to equilibrate. PLE was carried out using a fully automated ASE 200 system (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). The PLE conditions were optimized for the extraction of PBDE congeners from sediment samples as discussed in Section 3. Alumina was selected as sorbent in the extraction cell. The final optimized method was as follows: a 22 ml extraction cell was loaded by inserting two cellulose filters into the cell outlet, followed by 6 g of alumina. Spiked samples of 1 g were ground with alumina and copper (1:2:2). The mixture was loaded into the extraction cell on top of alumina. The dead volume was filled with hydromatrix, and the cell was sealed with the top cell cap. The extraction cell was filled with a hexane–dichloromethane (1:1) mixture until the pressure reached 1500 psi, and heated to 100 °C (1 psi = 6894.76 Pa). After an oven heat-up time of 5 min under these conditions, two static extractions of 10 min at constant pressure and temperature were developed. After this static period, fresh solvent was introduced to flush the lines

Table 1
PBDE congeners involved in the present study

Mono-BDEs	Di-BDEs	Tri-BDEs	Tetra-BDEs	Penta-BDEs	Hexa-BDEs	Hepta-BDEs
BDE-1	BDE-7	BDE-17	BDE-47	BDE-85	BDE-138	BDE-181
BDE-2	BDE-8	BDE-25	BDE-49	BDE-99	BDE-153	BDE-183
BDE-3	BDE-10	BDE-28	BDE-66	BDE-100	BDE-154	BDE-190
	BDE-11	BDE-30	BDE-71	BDE-116	BDE-155	
	BDE-12	BDE-32	BDE-75	BDE-118	BDE-166	
	BDE-13	BDE-33	BDE-77	BDE-119		
	BDE-15	BDE-35		BDE-126		

and cell, and the extract was collected in the vial. The flush volume amounted to 100% of the extraction cell. The extraction was cycled twice. The volume of the resulting extract was about 35 ml. Extracts were finally concentrated to incipient dryness and re-dissolved with 10 μ l of the recovery standard (PCB-209, 100 pg/ μ l) and 40 μ l of isooctane prior to the analysis by GC–negative chemical ionization (NCI)–MS.

In order to estimate the repeatability of the SPLE method, triplicate analyses were carried out with the river sediment control spiked with PBDE congeners at levels between 1 and 3 ng/g.

2.4. Soxhlet extraction

Soxhlet extraction for comparison of the SPLE results was accomplished in cellulose thimbles containing 1 g sediment control. Two grams of copper was added to sediment to remove sulfur interference. Triplicate extractions were done using 75 ml of a mixture of hexane–dichloromethane (1:1) for 24 h. In order to test the efficiency of the Soxhlet extraction, a subsequent extraction was performed. After extraction, the extracts and the rinses of the Soxhlet were combined, concentrated to a few milliliter by rotary evaporation and then subjected to the cleanup procedure.

2.5. Cleanup

After extraction with Soxhlet, crude extracts were subjected to a purification step. Amount of 2 and 6 g of alumina and Florisil SPE cartridges were tested and compared. The conditioning parameters, sample loading volume and elution parameters were optimized. SPE cartridges were conditioned with 20 ml hexane. The sample volume loaded was \sim 1 ml, and the elution step was performed with 30 ml hexane–dichloromethane (1:2). Samples were finally concentrated to incipient dryness and re-dissolved with 10 μ l of the recovery standard (PCB-209, 100 pg/ μ l) prior to the analysis by GC–NCI–MS.

2.6. Gas chromatography/mass spectrometry

GC–NCI–MS analyses were performed on a gas chromatograph Agilent 6890 connected to a mass spectrometer Agilent 5973 Network (Agilent). A HP-5 ms (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m film thickness) containing 5% phenyl-methylsiloxane (model HP 19091S-433) capillary column was used for the determination of congeners from mono- to hepta-BDEs. The temperature program was from 110 $^{\circ}$ C (held for 1 min) to 180 $^{\circ}$ C (held for 1 min) at 8 $^{\circ}$ C/min, then from 180 to 240 $^{\circ}$ C (held for 5 min) at 2 $^{\circ}$ C/min, and then from 240 to 265 $^{\circ}$ C (held for 6 min) at 2 $^{\circ}$ C/min, using the splitless injection mode during 1 min. The operating conditions were as follows: ion source temperature = 250 $^{\circ}$ C, ammonia as chemical ionization moderating gas at an ion source pressure of 1.9×10^{-4} Torr

[13] (1 Torr = 133.322 Pa). The experiments were carried out monitoring the two most abundant isotope peaks from the mass spectra corresponding to $m/z = 79$ and 81 ($[\text{Br}]^{-}$).

Confirmation criteria for the detection and quantification of PBDEs should include the following: (a) retention time for all m/z monitored for a given analyte should maximize simultaneously ± 1 s, with signal-to-noise ratio ≥ 3 for each; (b) the ratio between the two monitored ions should be within 15% of the theoretical. Quantification was carried out by internal standard procedure with the PCB-209 as internal standard.

3. Results and discussion

3.1. Investigation of selective PLE

The PLE is a system accepted by the US Environmental Protection Agency (EPA) and other environmental agencies for the extraction of organic compounds from solid matrices. It has been widely applied for the extraction of contaminants like PCBs, pesticides, PAHs from different solid samples. The advantage of this system is that the extraction time is very much reduced and it is automated.

Preliminary studies were carried out in order to select the adsorbent for the selective PLE method. A mixture of 39 PBDE congeners selected for this study, as well as the BDE-209, was loaded in different SPE cartridges: 2 and 6 g of alumina and Florisil. Table 2 shows the different recoveries obtained using these cartridges. As can be seen, both sorbents give acceptable recoveries for the mono- to hepta-BDE congeners. Recoveries were more than 54% (with the exception of mono-BDEs), with values increasing with the degree of bromination. However, the BDE-209 was completely lost with Florisil, whereas the use of alumina cartridges resulted in a good BDE-209 recovery (59–73%). These differences on BDE-209 recoveries could be attributed to the lower polarity of this compound, compared with lower brominated BDE congeners. For this reason, and in order to obtain a methodology to analyze all the degree of bromination, the use of Florisil was rejected and alumina was selected as the sorbent for the SPLE method.

A river sediment control was subjected to SPLE with the aim of finding conditions under which this extraction technique would achieve both an extraction efficiency comparable with the Soxhlet extraction, and an extract ready for injection into the GC–MS system. To optimize the SPLE method, an amount of 1 g of sample spiked with 1–3 ng (depending on the degree of bromination) of the PBDE congeners was dispersed with 2 g of alumina as well as with 2 g of cooper. The extraction cell was charged, and different temperatures (40, 70, 100, and 150 $^{\circ}$ C) were tested using a pressure of 1500 psi and a flush volume of 85% of the cell volume. The effect of the temperature on the recovery is presented in Fig. 1a. One congener of each degree of bromination was selected for the representation. However, similar

Table 2
PBDE recoveries obtained using different SPE cartridges in the purification step

	Alumina		Florisil	
	2 g	5 g	2 g	5 g
Mono-BDEs				
BDE-1	19	27	20	35
BDE-2	24	36	23	39
BDE-3	20	29	22	42
Di-BDEs				
BDE-10	54	66	56	71
BDE-7	65	78	62	78
BDE-11	69	84	64	83
BDE-8	76	94	71	29
BDE-12 + 13	70	84	66	82
BDE-15	70	85	65	84
Tri-BDEs				
BDE-30	79	88	80	86
BDE-32	91	104	91	96
BDE-17	93	108	92	102
BDE-25	90	107	89	100
BDE-28 + 33	89	105	88	98
BDE-35	94	112	95	106
BDE-37	91	110	90	104
Tetra-BDEs				
BDE-75	95	108	99	103
BDE-71	97	113	102	107
BDE-49	97	113	94	108
BDE-47	100	116	105	112
BDE-66	99	116	101	113
BDE-77	106	134	110	123
Penta-BDEs				
BDE-100	103	119	110	114
BDE-119	101	120	111	112
BDE-99	104	122	109	115
BDE-116	96	118	101	108
BDE-118	106	128	112	121
BDE-85	110	132	116	124
Hexa-BDEs				
BDE-154	108	125	117	119
BDE-153	106	127	115	117
BDE-138	113	139	118	125
BDE-166	92	116	92	96
Hepta-BDEs				
BDE-183	106	126	108	107
BDE-181	105	128	93	87
BDE-190	112	135	99	93
Deca-BDE				
BDE-209 ^a	59	73	0	0

^a BDE-209 analyses were performed using a DB-5 ms (15 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness) column. The temperature program was from 140 °C (held for 1 min) to 325 °C (held for 10 min) at 10 °C/min [18].

behavior was observed for the rest of congeners. For all the temperatures tested (with the exception of mono-, di- and tri-BDEs at 40 °C), recoveries were between 40 and 120%, the range established in some EPA methods [14,15] as the minimum requirement of well accepted methods. However, the best results were achieved working at 100 °C, with re-

coveries ranging between 66 and 106%. This temperature was selected for further experiments.

The effect of the pressure on the recovery was studied in the range between 1000 and 2000 psi (1000, 1500, and 2000 psi), using a temperature of 70 °C and a flush volume of 115% of the cell volume. Results were presented in Fig. 1b, and no significant influence on the recoveries was observed. Acceptable recoveries were obtained for the three different pressures tested, with the exception of mono-BDE congeners. As pressure of 1500 psi is the default pressure of the system, this value was selected for further experiments. Other PLE studies [11,16] also showed that pressure is a parameter without significant effect on the extraction process. The main purpose of applying an increased pressure is to keep the liquid from boiling.

The influence of the solvent used to rinse the cell after the static extraction step (flush percentage) was also studied, modifying its value between 85 and 115% (85, 100, and 115%). These experiments were carried out at 70 °C and 1500 psi. No significant influence on the recoveries was observed (Fig. 1c); however, slightly better recoveries were obtained working at 100%. Thus, the optimal conditions for the SPLE analysis of PBDEs were: temperature of 100 °C, pressure of 1500 psi and 100% of flush volume. These optimal conditions differed from those obtained by Gómez-Ariza et al. [12] for the SPLE analysis of PCBs. They worked at 40 °C, pressure of 2000 psi and 150% of flush volume.

Finally, it should be pointed out that hexane–dichloromethane (1:1) was selected as the extraction solvent in the present work. However, hexane–dichloromethane (80:20) was also tested using the optimized conditions in the SPLE system (100 °C, 1500 psi, 100% flush volume). Similar recoveries were obtained with both extraction solvents (Table 3).

3.2. Comparison of SPLE and Soxhlet–SFE methods

Once the SPLE method was optimized, a study of the repeatability was carried out, analyzing by triplicate the same river sediment spiked with the different PBDE congeners. Results were compared with those obtained using the conventional system with Soxhlet extraction followed by a SPE cleanup with alumina cartridges. Previously, the efficiency of the Soxhlet extraction was tested carrying out a subsequent extraction. No PBDEs were detected in the re-extraction samples, concluding that the first Soxhlet extraction was virtually exhaustive.

Table 3 shows the mean values as well as the associated relative standard deviation of the two methods studied. Recoveries obtained using the optimized SPLE method ranged from 22 to 82%, whereas those obtained by conventional method were in the range of 42 and 81%. In general, the conventional method gives better recoveries for the mono- to tri-BDE congeners. For the rest of congeners (from tetra- to hepta-BDEs), similar results were obtained using both systems. The higher recoveries obtained by the conventional

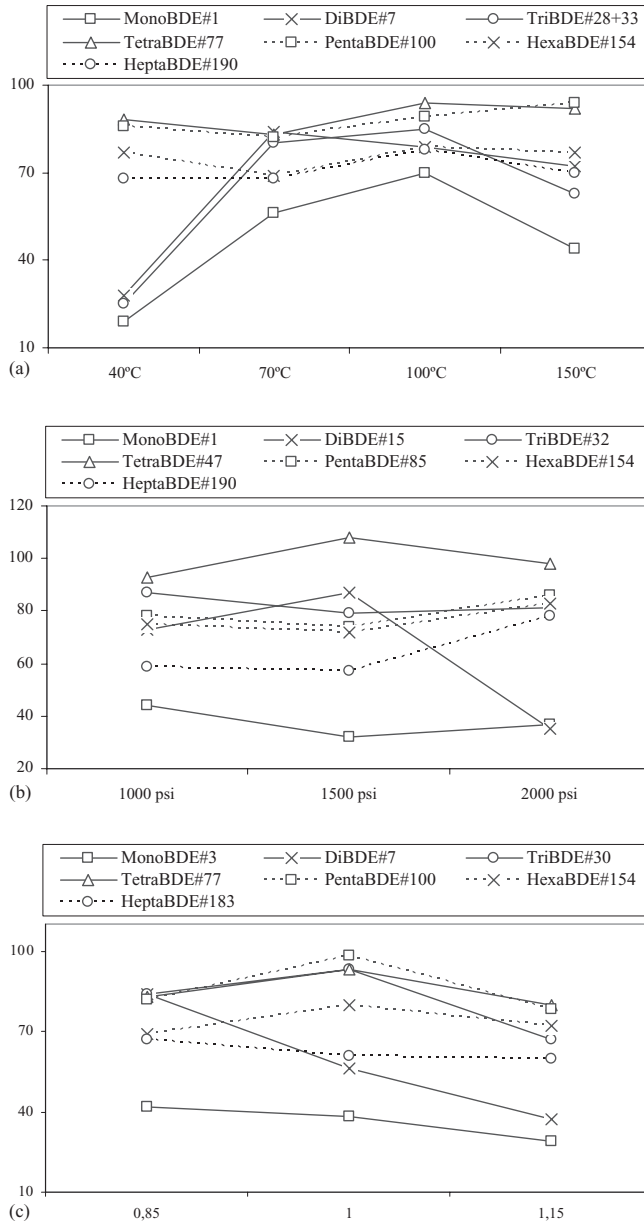


Fig. 1. (a) Influence of the temperature on the selective extraction of PBDEs (1500 psi and 85% of flush volume); (b) influence of the pressure on the selective extraction of PBDEs (70 °C and 115% of flush volume); and (c) influence of the flush volume on the selective extraction of PBDEs (70 °C and 1500 psi).

method for the lower brominated compounds could be attributed to the purification of the extracts. The chromatographic region where mono- through tri-BDEs eluted, presented a high degree of purification when conventional system was applied. However, relative standard deviations of the SPLE method were lower than those obtained using the conventional method, especially when the degree of bromination increased. For the major congeners de-

tected in sediment samples, tetra-BDE-47, penta-BDE-99, penta-BDE-100 and hexa-BDE-153, the optimized SPLE method achieved recoveries in the range of 60 and 75%, with relative standard deviation lower than 5%. The low standard deviations obtained with SPLE method could be the result of the automation of the system.

The method detection limits (LOD_{method}) obtained using SPLE followed by GC–NCI–MS in SIM mode are shown

Table 3

PBDE recoveries obtained using the conventional Soxhlet–SPE method as well as the optimized SPLE method

	Soxhlet–SPE method		Optimized SPLE method		SPLE, hexane–dichloromethane (4:1)
	Mean (<i>n</i> = 3)	RSD (%)	Mean (<i>n</i> = 3)	RSD (%) CV	
Mono-BDEs					
BDE-1	42	6	23	9	24
BDE-2	78	32	24	4	38
BDE-3	46	9	22	11	28
Di-BDEs					
BDE-10	53	3	41	4	38
BDE-7	57	2	40	9	39
BDE-11	51	2	34	5	34
BDE-8	51	2	34	5	34
BDE-12+13	58	1	41	7	39
BDE-15	61	7	34	13	30
Tri-BDEs					
BDE-30	64	1	53	10	56
BDE-32	65	1	54	8	57
BDE-17	71	3	56	6	57
BDE-25	64	4	56	6	57
BDE-28 + 33	68	2	62	6	63
BDE-35	70	3	67	7	70
BDE-37	70	4	70	10	72
Tetra-BDEs					
BDE-75	68	7	65	5	68
BDE-71	76	2	72	6	70
BDE-49	77	10	72	6	70
BDE-47	81	4	74	2	79
BDE-66	71	7	72	3	73
BDE-77	74	12	82	2	85
Penta-BDEs					
BDE-100	70	8	60	1	62
BDE-119	67	10	63	4	63
BDE-99	82	9	75	2	77
BDE-116	67	8	58	2	60
BDE-118	69	14	67	1	70
BDE-85	70	13	66	1	69
Hexa-BDEs					
BDE-154	67	9	61	3	63
BDE-153	63	13	68	5	71
BDE-138	64	16	65	5	70
BDE-166	64	16	65	5	70
Hepta-BDEs					
BDE-183	61	12	53	10	59
BDE-181	52	11	46	12	54
BDE-190	53	12	47	14	55

SPLE recovery results, using hexane–dichloromethane (4:1) as solvent extraction, were also included.

Table 4

PBDE detection limits (expressed as pg/g) obtained by SPLE–GC–NCI–MS and Soxhlet–SPE–GC–NCI–MS

	SPLE–GC–NCI–MS	Soxhlet–SPE–GC–NCI–MS
Mono-BDEs	18–26	16–50
Di-BDEs	1–19	4–21
Tri-BDEs	5–10	4–14
Tetra-BDEs	12–34	3–13
Penta-BDEs	6–46	7–27
Hexa-BDEs	8–24	13–36
Hepta-BDEs	6–13	5–15

in Table 4. The values were compared with those obtained using the conventional Soxhlet–SPE–GC–NCI–MS method. The LODs were based on the peak-to-peak noise of the baseline near the analyte peak obtained by analyses of a spiked sediment control, and on minimal value of signal-to-noise ratio of 3. The LOD_{method} obtained with the new developed method were between 1 and 46 pg/g, showing similar values to those found for Soxhlet–SPE followed by GC–NCI–MS (from 3 to 50 pg/g).

Fig. 2 shows the chromatograms obtained for spiked sediment using both system. Extracts were sufficiently clean,

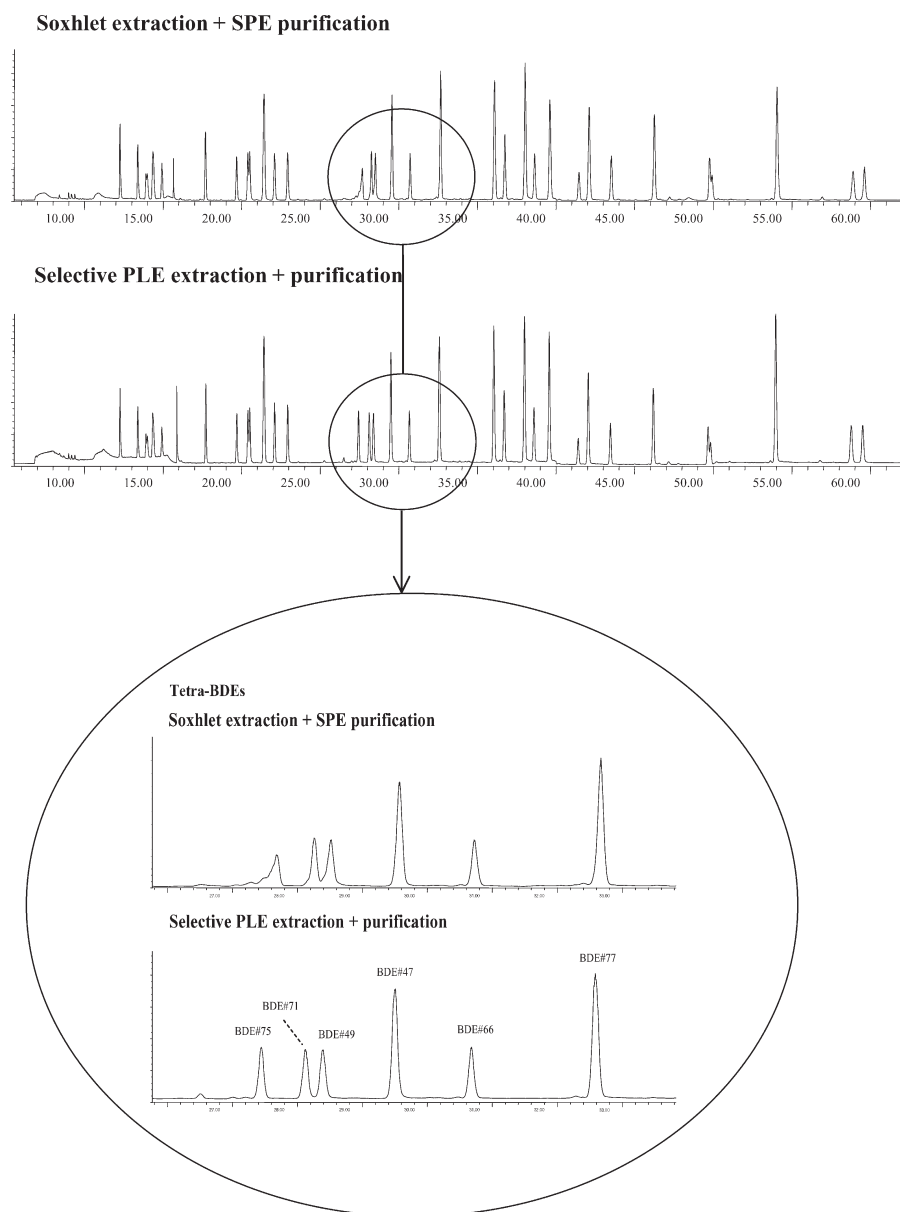


Fig. 2. m/z 79 chromatograms obtained for a spiked sediment sample using the SPLE and the conventional procedures. Tetra-BDEs window was magnified.

allowing the detection and quantification of different PBDE congeners; however, for some chromatographic regions, the purification obtained by SPLE method was better than those afforded using the conventional method. This is reflected for the tetra-BDE window, i.e. the BDE-75 coeluted with an interferent peak using the Soxhlet–SPE, whereas this interference was removed in the SPLE chromatogram.

In addition to extraction recoveries and reproducibility, it is interesting to compare the relative merits of each extraction technique. The relative consumptions of organic solvent

were ~ 75 ml for Soxhlet and ~ 35 ml for SPLE. However, for spent time the save was considerably when SPLE was used: 2 days for Soxhlet + SPE and 30 min for SPLE. The SPLE present a number of advantages, being less time consuming and more automated than the conventional method.

3.3. Application of SPLE method to sediment samples

The developed methodology was applied to the analysis of two river and five marine sediments. Table 5 shows the

Table 5
PBDE concentration levels (expressed in ng/g dry mass) of sediment samples

	RS1 ^a	RS2	MS1 ^b	MS2	MS3	MS4	MS5
BDE-47	0.30	0.09	0.07	0.09	0.10	0.13	0.09
BDE-100	0.17	0.14	nd	0.11	0.10	0.13	nd
BDE-99	0.52	0.65	0.14	0.16	0.16	0.22	0.16
BDE-118	nd ^c	0.24	nd	0.18	0.18	0.22	0.18
BDE-154	0.12	0.28	nd	nd	0.09	0.11	nd
BDE-153	0.28	0.51	0.24	0.24	0.24	0.32	0.27
BDE-183	0.44	0.59	0.40	0.41	0.44	1.22	0.62
Total PBDEs	1.83	2.49	0.86	1.19	1.32	2.34	1.32

^a RS = river sediment.

^b MS = marine sediment.

^c nd = not detected.

different PBDE congeners detected, as well as their concentration levels (concentrations were not corrected for the recoveries). Seven different PBDE congeners (BDE-47, -100, -99, -118, -154, -153 and -183) were detected, and total PBDE levels ranged from 0.86 to 2.49 ng/g. For sample RS1, BDE-47, -99 and -100 were the predominant peaks (Fig. 3). The sum of these three congeners represented the 54% of the total PBDE contamination. These results were in accordance with published environmental levels, where major congeners detected were BDE-47, -99, -100, -153 and -209. BDE-209 determination was not included in the present study. Analysis of this high brominated congener includes a number of additional difficulties. The compound is not stable at higher temperatures in the injector and at the GC column.

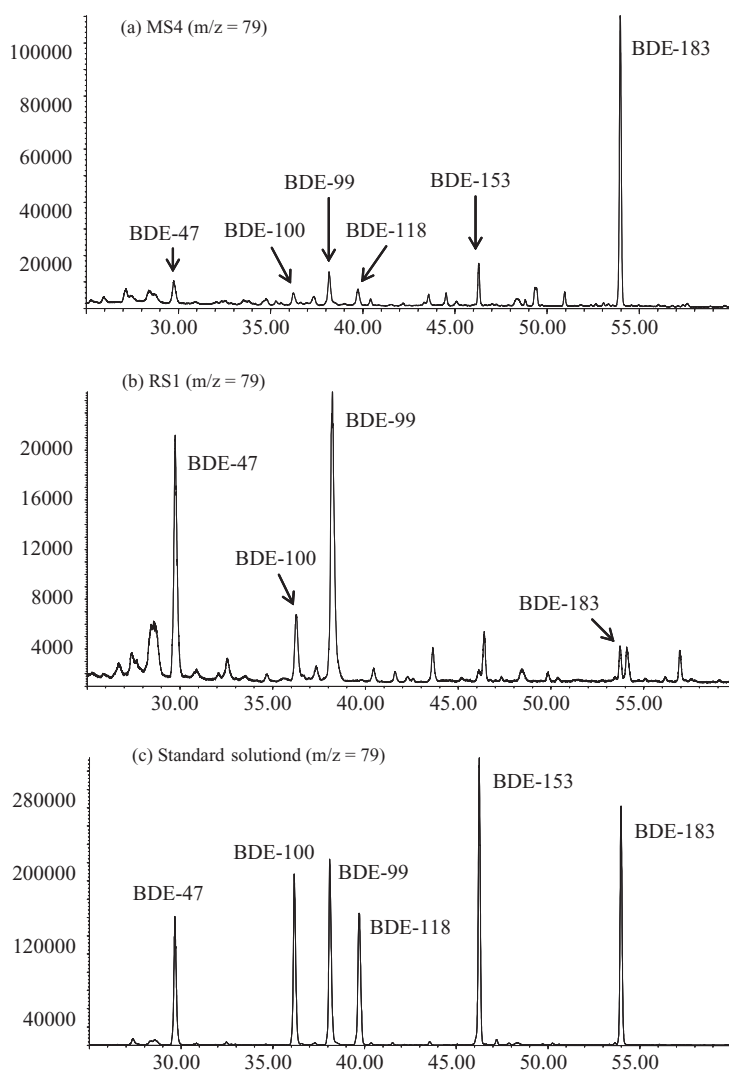


Fig. 3. m/z 79 chromatograms of (a) marine sediment, (b) river sediment, and (c) standard solution. Different BDE congeners were identified in the two sediment samples.

Moreover, the compound is sensitive for degradation by UV light and their behavior in the MS source is different from that of low brominated compounds. Further investigation will be made in order to determine BDE-209 in these samples.

Other samples analyzed (MS1, MS2, MS3, MS4 and MS5) showed a principal contribution from BDE-183, which was present at concentrations varying from 0.40 to 1.22 ng/g. In these cases, the hepta-brominated congener constituted between 33 and 52% of the total PBDE contamination. BDE-183 is often taken as indicative of the presence of the octa-BDE formulations [17]. The presence of BDE-183 could indicate the source of PBDE contamination in the studied area: the use of commercial formulations such as octa-BDE. These results indicated the need to apply analytical methods covering all the bromination degrees. Our methodology was able to determine from the mono-through hepta-BDE congeners, instead previous protocols focused only on the BDE-47, -99 and -100 determinations.

4. Conclusions

A simple and rapid method for the determination of mono- to hepta-BDE congeners in sediment samples has been developed using a selective PLE and GC-MS. Results demonstrated that this SPLE approach compares satisfactorily with traditional Soxhlet extraction methods. Applying the developed methodology gives increased possibilities of automation with no extra cleanup step needed, leading to substantial time savings as compared to classical methodologies.

The developed method was applied to PBDE determinations in sediment samples, where the analytes were detected in the range of 0.86–2.49 ng/g dry mass. Hepta-brominated congeners constituted between 33 and 52% of the total PBDE contamination in some of the samples analyzed, indicating the importance to cover all the bromination degrees in the analytical methodologies for PBDE determinations.

Acknowledgements

This research project was made possible by funding provided by the European Union under the Energy, Environ-

ment and Sustainable Development program (Standardized aquatic monitoring of priority pollutants by passive sampling (STAMPS), Project number EVK1-CT2002-00119), and by the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (TRACOAL, PPQ2001-1805-C03-01 and BQU2002-10946-E). R. Chalor and D. Fanjul are thanked for assistance with the MS work.

References

- [1] Environmental Health Criteria 162: Brominated Diphenyl Ethers, WHO, Geneva, 1994.
- [2] T. Helleday, K.L. Tuominen, A. Bergman, D. Jansson, *Mutat. Res.* 439 (1999) 137.
- [3] I.A.T.M. Meerts, E.A.C. Luijckx, G. Marsh, E. Jakobsson, A. Bergman, A. Brouwer, *Organohalogen Compd.* 37 (1998) 147.
- [4] K. Norén, D. Meironyté, *Chemosphere* 40 (2000) 1111.
- [5] D. Meironyté, K. Norén, A. Bergman, *J. Toxicol. Environ. Health* 58 (1999) 101.
- [6] J. de Boer, K. de Boer, J. Boon, in: *The Handbook of Environmental Chemistry*, Springer, Berlin, 2000, p. 61.
- [7] C. Thomsen, E. Lundanes, G. Becher, *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 282.
- [8] L. Ramos, E.M. Kristenson, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 3.
- [9] L. Ramos, J.J. Vreuls, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 891 (2000) 275.
- [10] A. Hubert, K.D. Wenzel, M. Manz, L. Weissflog, W. Engewald, G. Schürmann, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1294.
- [11] A. Müller, E. Björklund, C. van Holst, *J. Chromatogr. A* 925 (2001) 197.
- [12] J.L. Gómez-Ariza, M. Bujalance, I. Giraldes, A. Velasco, E. Morales, *J. Chromatogr. A* 946 (2002) 209.
- [13] E. Eljarrat, S. Lacorte, D. Barceló, *J. Mass Spectrom.* 37 (2002) 76.
- [14] US Environmental Protection Agency, EPA Method 1668: Toxic Polychlorinated Biphenyls by Isotope Dilution High Resolution Gas Chromatography/High Resolution Mass Spectrometry, Office of Science and Technology, March 1997.
- [15] US Environmental Protection Agency, EPA Method 1613: Tetra Through Octa Chlorinated Dioxins and Furans by Isotopic Dilution HRGC-HRMS, Washington, DC, 1994.
- [16] N. Saim, J.R. Dean, M.P. Abdullah, Z. Zakaria, *Anal. Chem.* 70 (1998) 420.
- [17] R.J. Law, M. Alaei, C.R. Allchin, J.P. Boon, M. Lebeuf, P. Lepom, G.A. Stern, *Environ. Int.* 29 (2003) 757.
- [18] E. Eljarrat, A. de la Cal, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* (2003) in press.

■ 2.4. Artículo científico #2

Determination of decabromodiphenyl ether in sediments using selective pressurized liquid extraction followed by GC-NCI-MS

E. Eljarrat, **A. de la Cal**, D. Barceló
Anal Bioanal Chem (2004) 378(3):610-614

Ethel Eljarrat · Agustina de la Cal · Damià Barceló

Determination of decabromodiphenyl ether in sediments using selective pressurized liquid extraction followed by GC–NCI–MS

Received: 15 May 2003 / Revised: 1 August 2003 / Accepted: 13 August 2003 / Published online: 25 September 2003

© Springer-Verlag 2003

Abstract A method based on selective pressurized liquid extraction (SPLE) followed by gas chromatography–negative ion chemical ionization–mass spectrometry (GC–NCI–MS) has been evaluated for analysis of decabromodiphenyl ether (PBDE-209) in sediment samples. Instrumental operating conditions such as source temperature and system pressure were optimized in the NCI–MS system, giving an instrumental detection limit of 2 pg. The limit of determination of the entire SPLE–GC–NCI–MS procedure was around 50 pg g⁻¹ dry weight (dw), with repeatability of replicates between 4 and 21% relative standard deviation. Application of the method to 13 different river and marine sediment samples collected in Spain revealed that levels of decabromodiphenyl ether ranged between 2 and 132 ng g⁻¹ dry weight.

Keywords Decabromodiphenyl ether · Selective pressurized liquid extraction · Sediment

Introduction

The extensive use of products containing flame retardants like polybrominated diphenyl ethers (PBDE) has resulted in the release of these compounds into the environment. Structural similarity to other environmental chemicals with known toxic effects (polychlorinated biphenyls, PCB, polybrominated biphenyls, PBB, and dioxins) could indicate that PBDE also could be harmful to health. The acute toxicity of PBDE is low, however, there is concern about their long term effects on the endocrine system [1, 2]. For many countries decreasing levels of organochlorine compounds have been reported recently [3] whereas levels of PBDE have increased continuously since 1972 [4]. Due to these findings efforts have been undertaken to analyse these compounds in environmental samples.

A considerable amount of data is available on the levels and composition of PBDE in the environment. The higher brominated compounds are less mobile in the environment, possibly due to their low volatility, low water solubility, and strong adsorption by sediments. Therefore, the higher brominated compounds tend to end up in sediments at high residue levels near their emission sources. The major congeners detected are PBDE-47, PBDE-99, PBDE-100, PBDE-153, and PBDE-209. The concentrations of these compounds are highly variable from location to location, but in general, the concentrations of PBDE are similar to those of the PCB and in some cases higher [5].

PBDE-209 constitutes >95% of the commercial deca-BDE formulation. Given the shift in production of PBDE towards deca-BDE, the development of analytical methods for PBDE-209 is required. Determination of PBDE-209 includes a number of analytical difficulties. The compound is not stable at high temperatures in the injector and on the GC column. Moreover, the compound is sensitive to degradation by UV light and its behaviour in the MS source is different from that of chlorinated and low-brominated compounds. Difficulties in clean-up procedures and in chromatographic systems are the most probable reasons for the paucity of determinations of PBDE-209 and also the low accuracy of determinations of this compound reported in the literature. Until now laboratories were not very experienced in this analysis. This is clearly reflected in results of inter-laboratory studies [6]. Methods for determination of PBDE-209 in environmental samples are based on extraction with organic solvents (hexane, toluene, hexane–acetone mixtures, or dichloromethane) or supercritical-fluid extraction (with CO₂ or CO₂ with modifiers such as methanol, acetone, and diethylamine) [7] and further clean-up by adsorption chromatography [8] or solid-phase extraction (SPE) [9]. Finally, qualitative and quantitative analysis were carried out using GC–NCI–MS, with care to avoid long exposures to elevated temperatures by using short chromatographic columns [10, 11]. Moreover, two injection systems were tested for PBDE-209 analysis – splitless and on-column injection [12]. For the former system a pressure-pulse injection should be used to reduce exposure to high injection

E. Eljarrat (✉) · A. de la Cal · D. Barceló
Department of Environmental Chemistry, IIQAB, CSIC,
Jordi Girona 18–26, 08034 Barcelona, Spain
e-mail: eeeqam@cid.csic.es

tor temperatures. Alternatively, on-column injection may be used, but this technique requires very clean extracts.

The aim of this study was to develop a rapid and simple method for determination of PBDE-209 in sediment samples. An analytical method based on selective pressurized liquid extraction (SPLE), without further clean-up, and analysis by GC–NCI–MS was optimized. In addition, the new method was applied to different river and marine sediment samples from Spain.

Methods and materials

Chemicals and materials

Polybrominated diphenyl ether analytical standard solution EO-5099 and PBDE-209 were purchased from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA). The components of EO-5099 solution were: three mono-BDE (PBDE-1, PBDE-2, and PBDE-3), seven di-BDE (PBDE-7, PBDE-8, PBDE-10, PBDE-11, PBDE-12, PBDE-13, and PBDE-15), eight tri-BDE (PBDE-17, PBDE-25, PBDE-28, PBDE-30, PBDE-32, PBDE-33, PBDE-35, and PBDE-37), six tetra-BDE (PBDE-47, PBDE-49, PBDE-66, PBDE-71, PBDE-75, and PBDE-77), seven penta-BDE (PBDE-85, PBDE-99, PBDE-100, PBDE-116, PBDE-118, PBDE-119, and PBDE-126), five hexa-BDE (PBDE-138, PBDE-153, PBDE-154, PBDE-155, and PBDE-166), and three hepta-BDE (PBDE-181, PBDE-183, and PBDE-190). The concentrations of each compound ranged from 100 $\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$ for the mono congeners to 250 $\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$ for the hepta congeners. Decachlorinated biphenyl (PCB-209) was purchased from the Laboratory of Dr Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Five different solutions were prepared in isooctane in order to check the linearity of the method. These solutions contained the PBDE-209 at different concentrations ranging between 25 $\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$ and 500 $\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$, and the PCB-209 always at 100 $\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$.

Solvents (dichloromethane and hexane) for organic trace analysis were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Neutral alumina (0.063–0.200 mm) and copper (<63 μm) were obtained from Merck, and Hydromatrix from Varian (Palo Alto, USA).

Sample collection

Samples analysed in this study were river (RS) and marine (MS) sediments collected during 2002. Five sediments from different rivers were selected. Special attention was paid to sample RS4 corresponding to sediment with high industrial input. Moreover, eight marine sediments were collected along the Catalanian coast. MS1 to MS4 corresponded to marine sediments collected on the Barcelona coast, near the Llobregat river mouth, and MS5 to MS8 were collected near different industrial plants on the Tarragona coast.

Samples were transferred to the laboratory at 4 °C, then, frozen at –20 °C before being freeze dried. The lyophilized samples were ground and homogenized, by sieving through a stainless steel 2-mm sieve, and stored in sealed containers at –20 °C until analysis.

Sample preparation

Sample preparation, including extraction and purification, was optimized using a PLE system (ASE 200, Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Extraction cells (22 mL) were loaded by inserting two cellulose filters into the cell outlet, followed by 6 g alumina. Samples of 1 g were weighed, and ground with alumina and copper (1:2:2). The mixture was loaded into the extraction cell on top of the alumina. The dead volume was filled with Hydromatrix and the cell was sealed with the top cell-cap. The extraction cell was heated to 100 °C and filled with hexane– CH_2Cl_2 (1:1) mixture until the pressure reached 1500 psig. After an oven heat-up time of 5 min under

these conditions two static extractions of 10 min at constant pressure and temperature were performed. After this static period, fresh solvent was introduced to flush the lines and cell, and the extract was collected in the vial. The flush volume amounted to 100% of the extraction cell. The extraction was cycled twice. The volume of the resulting extract was about 35 mL [13]. Samples were finally concentrated to incipient dryness and re-dissolved with 10 μL of the internal standard (PCB-209, 100 $\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$) and 40 μL of isooctane prior to analysis by GC–NCI–MS.

Gas chromatography–mass spectrometry

Analyses were performed on an Agilent 6890 gas chromatograph connected to an Agilent 5973 Network mass spectrometer (Agilent Technologies España, Madrid, Spain). A 15 m \times 0.25 mm i.d. capillary column coated with a 0.25 μm film of DB-5 ms (5% phenyl methylsiloxane) was used with helium as carrier gas at 10 psi. The temperature program was from 140 °C (held for 1 min) to 325 °C (held for 10 min) at 10 ° min^{-1} ; injection was in splitless mode for 1 min. Other chromatographic conditions were: injection volume 2 μL , injector temperature 275 °C, and interface temperature 250 °C.

Initial experiments were carried out to optimize the NCI parameters such as source temperature and system pressure. All optimization experiments were carried out using a standard solution of PBDE-209 at 500 $\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$ in SIM mode (m/z 79 and 81). Optimization of the source temperature was undertaken by studying its effect at 150, 200, and 250 °C. Optimization of the system pressure was carried out between 1.2×10^{-4} and 2.1×10^{-4} torr (1.2×10^{-4} , 1.4×10^{-4} , 1.6×10^{-4} , 1.9×10^{-4} , and 2.1×10^{-4} torr). These system pressures corresponded to reagent gas flows of 1.25, 1.5, 1.75, 2, and 2.25 mL min^{-1} , respectively.

Quantification

Although NCI–MS could be affected by coelution of brominated compounds [14], m/z 79 and 81 were unique fragment ions observed for PBDE-209 mass spectra. Confirmation criteria for the detection and quantification of PBDE-209 should include:

1. the two m/z monitored should maximize simultaneously ± 1 s, with signal-to-noise ratio ≥ 3 for each; and
2. the ratio between the two monitored ions should be within 15% of the theoretical value.

Two different methods for quantification were tested – external standard calibration and internal standard calibration using the PCB-209 as internal standard. PCB-209 is commonly the compound selected as internal standard for PBDE-209 determinations in different published works. Quantitative determinations were performed using calibration curves previously calculated from five standard solutions. These solutions contained the PBDE-209 at different concentrations (25, 50, 100, 250, and 500 $\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$, and the PCB-209 always at 100 $\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$).

Results and discussion

Optimization of SPLE conditions

The SPLE conditions were optimized for extraction and purification of PBDE-209 and for 39 different mono- through hepta-BDE congeners. Preliminary studies were carried out in order to select the adsorbent for the SPLE method. A standard mixture from mono- to deca-BDE congeners was loaded on alumina and Florisil SPE cartridges previously conditioned with hexane. The sample volume loaded was ~1 mL and the elution step was performed with 30 mL

hexane-CH₂Cl₂ (1:2) (fraction 1). An additional fraction (fraction 2) was collected with 20 mL hexane:CH₂Cl₂ (1:1).

Both sorbents gives acceptable recoveries for the mono- to hepta-BDE congeners in fraction 1. However, the PBDE-209 was completely lost with Florisil, whereas the use of alumina cartridges resulted in a good PBDE-209 recovery (59–73%). Moreover, PBDE-209 was not detected in either fraction 2, suspecting that Florisil retained this compound strongly, making its elution difficult. The differences between mono- to hepta-PBDE and PBDE-209 recoveries could be attributed to the lower polarity of this compound compared with lower brominated BDE congeners. For this reason, the use of Florisil was rejected and alumina was selected as the sorbent for the SPLE method.

The SPLE conditions optimised were temperature, pressure, and rinses. A more detailed description of the optimization is given elsewhere [13]. The optimum conditions for SPLE analysis of PBDE were: temperature 100 °C, pressure 1500 psi, and 100% flush volume. Using these conditions recovery of PBDE-209 ranged between 84 and 111%. Quality properties such as detection limits and reproducibility of the method are presented in subsequent sections.

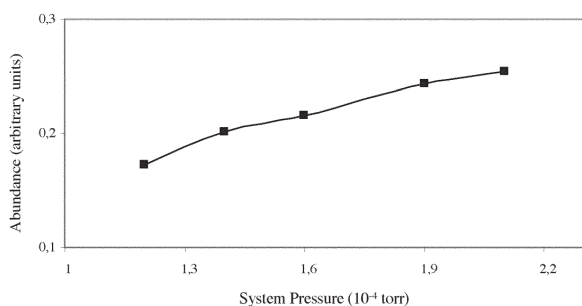
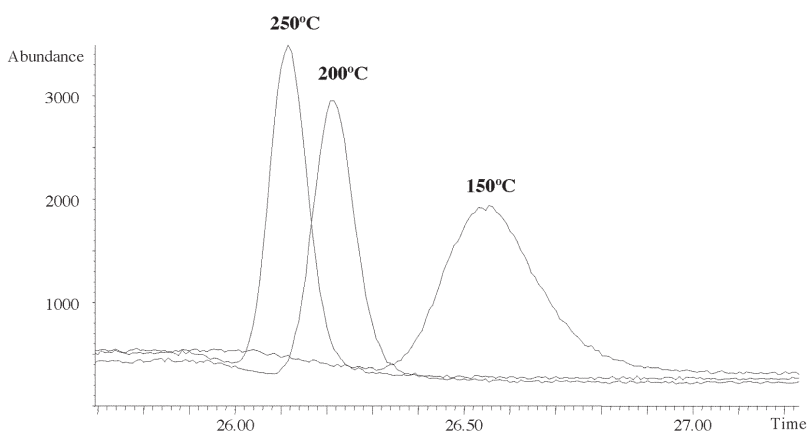


Fig. 1 Variation with system pressure of the abundance of *m/z* 79 for PBDE-209

Fig. 2 Variation with source temperature of the chromatographic peak of PBDE-209



Optimization of GC–NCI–MS conditions

Experiments were conducted to optimize NCI conditions such as source temperature and system pressure. The abundances of the monitored ion (*m/z* 79) vs. system pressure are given in Fig. 1. The abundances increased with increase in system pressure, with maximum abundances obtained at 2.1×10^{-4} torr. The abundance increase when working at 2.1×10^{-4} torr was 32% relative to 1.2×10^{-4} torr. Pressures higher than 2.1×10^{-4} torr were not tested due to the corrosive character of reagent gas (ammonia).

On the other hand, different chromatographic peak shapes were obtained working at different source temperatures (Fig. 2). The peak width increased when the source temperature decreased, with peak width around 30 s when working at 150 °C. The optimum working value was 250 °C, which resulted in a peak width of 10 s and 10% more response (compared with that obtained at 150 °C). Moreover, the reproducibility at 250 °C was better than that obtained at 200 or 150 °C – the coefficients of variation were 26%, 12%, and 7% for 150, 200, and 250 °C, respectively ($n=3$). These optimized analytical conditions were similar to those used for determination of mono- through hepta-brominated diphenylether [15].

Quantitative analysis

Different quality properties such as linearity, intraday and interday variation, and sensitivity were studied. Quantification was performed by external and internal standard methods. External standard quantification was performed by comparison of responses with calibration curves obtained from solutions of pure standards ranging from 25 to 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Acceptable linear correlation was obtained within the interval studied, with a regression coefficient of 0.9991. Slightly better results were obtained for the internal standard method, with a regression coefficient of 0.9994.

In order to evaluate the intraday variation of the method used, five consecutive injections were performed at the optimum conditions for NCI described in the previous sec-

tion. For the two quantitative methods proposed, the coefficients of variation (*CV*) between the five values were calculated. The *CV* values were always below 15% (10% and 13% for internal and external quantification, respectively) indicating good intraday variation. On the other hand, three injections were carried out on three different days to establish the inter-day variation of the method. The same quantitative analyses used for the intraday study were applied. As can be expected, the *CV* values obtained for inter-day were higher than those obtained for intraday study, with values below 20%.

The detection limit (*LOD*), defined as the minimum amount of analyte which produces a peak with an acceptable bromine isotope ratio and with a signal-to-noise ratio equal to 3, was calculated. The instrumental *LOD* obtained using our optimised GC–NCI–MS experiment was 2.4 pg injected. Similar detection limits were obtained by Boon et al. [16] (1.3 pg) and by Björklund et al. [17] (0.9 pg). Method *LOD*, for the entire SPLE–GC–NCI–MS procedure for sediment samples, was estimated to be in the range 30–110 pg g⁻¹ d.w.

Analysis of sediment samples

In order to evaluate the variation of the SPLE–GC–NCI–MS method used, four samples (one river and three marine sediments) were analysed in triplicate. The different results obtained, using both internal and external standard quantification, are presented in Table 1. As can be seen, the mean value obtained using the internal standard was lower than that obtained with the external standard approach. Moreover, the associated relative standard deviations were considerably higher for the internal standard method, with values ranging from 62 to 116%. Using external standard quantification the relative standard deviations decrease to 4–21%. These results showed that the normally used internal standard PCB-209 is not a good selection for

Table 1 Concentration levels (expressed in ng g⁻¹ dry weight) obtained using an internal and external standard method of quantification for one river and three marine sediment samples

	RS1	MS1	MS2	MS3
<i>External Standard</i>				
Replicate 1	5.55	2.70	23.91	143.43
Replicate 2	4.29	3.56	25.15	105.64
Replicate 3	6.58	2.59	23.50	147.24
Mean	5.47	2.95	24.19	132.11
<i>sd</i>	1.14	0.53	0.86	23.00
% <i>sd</i>	21	18	4	17
<i>Internal standard</i>				
Replicate 1	7.81	1.78	44.17	248.89
Replicate 2	1.19	0.90	9.35	37.97
Replicate 3	2.03	0.50	6.91	32.24
Mean	3.67	1.06	20.14	106.37
<i>sd</i>	3.60	0.66	20.85	123.46
% <i>sd</i>	98	62	103	116

PBDE-209 determination. For high molecular mass BDE, such as nona-BDE or PBDE-209, the choice of internal standards is not obvious. Some authors used PBB-209, but this is a known commercial flame retardant and may be present in the samples [18]. Another option is the use of labelled standards (¹³C-PBDE-209), however, the fragment ions obtained with NCI (*m/z* 79 and 81) did not enable differentiation between native and labelled PBDE-209. Recently, Björklund et al. [17] proposed the isotopic dilution quantification of PBDE-209 by NCI-MS, selecting [C₆Br₅O]⁻ instead the [Br]⁻ fragment for detection.

Our results using the external standard method were satisfactory when compared with variations normally obtained in PBDE-209 analyses. A first international inter-laboratory study on the analysis of PBDE was conducted in 1999–2000 [6]. The results showed that there were significant analytical difficulties for PBDE-209, with inter-laboratory relative standard deviations about 48% for a sediment sample.

In order to evaluate the extraction efficiency of our developed method (SPLE), the same river sediment (RS1) was analysed using conventional Soxhlet extraction, with a mixture of hexane:CH₂Cl₂ (1:1) as solvent extractor, and for 24 h. PBDE-209 was found at 5.08 ng g⁻¹ dry weight, matching reasonably well with SPLE data (mean value of 5.47 ng g⁻¹ dry weight).

Table 2 shows the results obtained for the 13 samples analysed. As can be seen, PBDE-209 was detected in all the samples studied, with values ranging from 2 to 132 ng g⁻¹ d.w. PBDE-209 concentrations in river sediments were below 6 ng g⁻¹ d.w., with the exception of sample RS4, in which the analyte was found at 40 ng g⁻¹ d.w. This value could be attributed to industrial activity near this sampling point. In general, our levels are similar to those found in river sediments in Japan, in the urban area of Osaka (between 33 and 390 ng g⁻¹ d.w.) [19]. Moreover, similar results were obtained on the river Viskan (Sweden), with contamination levels between 68 and 390 ng g⁻¹ d.w. [11]. Other studies reported higher PBDE-209 concentrations in sediment samples. De Boer et al. [10] found contamination levels between not detected and 4600 ng g⁻¹ d.w. in sediments collected in different rivers from the Netherlands. A study carried out with sediments from European estuaries and the Baltic Sea [20] revealed contamination

Table 2 Concentration levels (expressed in ng/g dry weight) obtained using an external standard method of quantification for samples selected in this study

River sediments	Concn	Marine sediments	Concn
RS1	5.47	MS1	2.95
RS2	2.06	MS2	24.19
RS3	2.14	MS3	132.11
RS4	39.89	MS4	72.89
RS5	5.72	MS5	23.65
		MS6	4.47
		MS7	3.63
		MS8	24.44

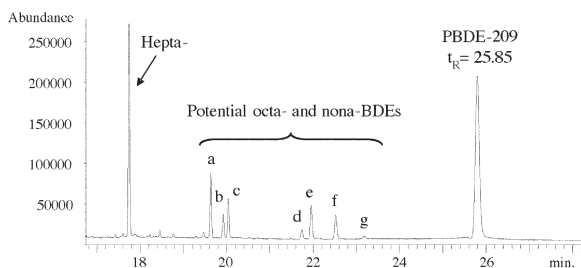


Fig. 3 GC-NCI-MS (m/z 79) chromatograms obtained for marine sediment (MS5) by use of a DB-5 ms (15 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m film thickness) chromatographic column. PBDE-209 (t_R =25.85 min.) and potential octa- and nona-BDE congeners were detected

levels of PBDE-209 between not detected and 1700 ng g⁻¹ d.w. However, of the 22 sediments analysed, 18 contained levels below 20 ng g⁻¹ d.w., matching those obtained in our study reasonably well.

Figure 3 shows the chromatograms obtained for marine sediment MS5. As can be seen, PBDE-209 was detected at t_R =25.85 min. Using the standard solution EO-5099, hepta-BDE-183 was also identified in this sample (t_R =17.72 min). Other chromatographic peaks were detected eluting between PBDE-183 and PBDE-209 (t_R between 19 and 23.5 min). These peaks, so-called a, b, c, d, e, f, and g, were identified as potential octa- and nona-BDE. However, since available standards do not contain octa- and nona-BDE, specific congeners could not be identified. The same peaks, with different relative intensities, were also detected in the other sediments analysed. The presence of potential octa- and nona-BDE could be attributed to the degradation or debromination of PBDE-209. Some researchers have postulated that debromination of PBDE-209 can result in the occurrence of lower brominated congeners in the environment [21, 22]. But, the detection of octa- and nona-BDE could also indicate the source of PBDE contamination:

1. the use of deca-BDE formulations, primarily composed of PBDE-209 but also containing a number of octa- and nona-BDE; or
2. the use of commercial formulations such as octa-BDE, primarily composed of octa-BDE isomers.

Conclusions

A simple, rapid and accurate method for the determination of PBDE-209 in sediment samples has been developed using SPLE and GC-NCI-MS. The detection limit of the procedure was in the range 30–110 pg g⁻¹ d.w., whereas the reproducibility was better than 20% relative standard deviation. Applying the developed methodology gives in-

creased possibilities of automation with no extra clean-up step needed, leading to substantial time savings compared with classical methods.

The developed method was applied to 13 sediment samples, in which PBDE-209 was detected in the range of 2–132 ng g⁻¹ d.w. Moreover, some potential octa- and nona-BDE were detected in some of the sediments analysed. These high-brominated congeners could not be eluted using GC temperature programs commonly applied for analysis of PBDE and therefore its presence remains undetected. The method here presented could be used for PBDE-209 determination and for analysis of other higher brominated BDE.

Acknowledgements This work was financially supported by the Ministerio de Ciencia y Tecnología (TRACOAL, PPQ2001–1805-C03–01). R. Chalor and D. Fangul are thanked for MS assistance.

References

1. WHO (1994) Environmental health criteria 162: brominated diphenyl ethers, WHO, Geneva
2. Helleday T, Tuominen KL, Bergman A, Jensson D (1999) *Mutat Res* 439:137–147
3. Norén K, Meironyté D (2000) *Chemosphere* 40:1111–1123
4. Meironyté D, Norén K, Bergman A (1999) *J Toxicol Environ Health* 58:101
5. de Boer J, Allchin CR (2001) *Organohalogen Compd* 52:13–17
6. de Boer J, Cofino WP (2002) *Chemosphere* 46:625–633
7. Hartonen K, Bowadt S, Hawthorne SB, Riekkola ML (1997) *J Chromatogr A* 774:229–242
8. de Boer J, de Boer K, Boon J (2000) In: *The handbook of environmental chemistry*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 61–95
9. Thompsen C, Lundanes E, Becher G (2001) *J Sep Sci* 24:282–290
10. de Boer J, van der Horst A, Wester PG (2000) *Organohalogen Compd* 47:85–88
11. Sellström U, Kierkegaard A, de Wit C, Jansson B (1998) *Environ Toxicol Chem* 17:1065
12. Covaci A, Voorspoels S, de Boer J (2003) *Environ Int* 29:735–756
13. de la Cal A, Eljarrat E, Barceló D (2003) *J Chromatogr A*, in press
14. Eljarrat E, de la Cal A, Barceló D (2003) *J Chromatogr A* 1008:181–192
15. Eljarrat E, Lacorte S, Barceló D (2002) *J Mass Spectrom* 37:76–84
16. Boon JP, Lewis EL, Tjoen-A-Choy MR, Allchin CR, Law RJ, de Boer J, Hallers-Tjabbes CT, Zegers BN (2002) *Environ Sci Technol* 36:4025
17. Björklund J, Tollbäck P, Östman C (2003) *J Mass Spectrom* 38:394–400
18. de Boer J, Allchin C, Law R, Zegers B, Boon JP (2001) *Trends Anal Chem* 20:591–599
19. Watanabe I, Kawano M, Tatsukawa R (1995) *Organohalogen Compd* 24:337
20. Sellström U, Kierkegaard A, Alsberg T, Jonsson P, Wahlberg C, de Wit C (1999) *Organohalogen Compd* 40:383
21. Renner R (2000) *Environ Sci Technol* 34:222A–226A
22. Watanabe I, Tatsukawa R (1987) *Bull Environ Contam Toxicol* 39:953–959

■ 2.5. Artículo científico #3

Occurrence and bioavailability of polybrominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecane in sediment and fish from the Cinca River, a tributary of the Ebro River (Spain)

E. Eljarrat, **A. de la Cal**, D. Raldúa, C. Durán, D. Barceló
Environ Sci Technol (2004) 38(9):2603-2608

Occurrence and Bioavailability of Polybrominated Diphenyl Ethers and Hexabromocyclododecane in Sediment and Fish from the Cinca River, a Tributary of the Ebro River (Spain)

ETHEL ELJARRAT,^{*,†}
AGUSTINA DE LA CAL,[†]
DEMETRIO RALDUA,[†]
CONCHA DURAN,[‡] AND DAMIA BARCELO[†]

Department of Environmental Chemistry, IIQAB, CSIC,
Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain, and
Confederación Hidrográfica del Ebro,
Paseo de Sagasta 24-26, 5007 Zaragoza, Spain

Fish and sediments from four places along the Spanish River Cinca were analyzed for polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and hexabromocyclododecane (HBCD). The samples were collected up- and downstream from Monzón, a heavily industrialized town draining to the river. PBDEs and HBCD were found in sediments at levels ranging from 2 to 42 ng/g dry weight and from not detected (nd) to 514 ng/g dry weight, respectively. Twenty-three fish samples (*Barbus graellsii*) collected at the same places were also analyzed, showing levels from nd to 446 ng/g wet weight for PBDEs and from nd to 1172 ng/g wet weight for HBCD. The lowest values for both sediment and fish samples were found upstream of the industry. Of 40 congeners (from mono- to deca-BDEs) included in the analytical work, 8 PBDE congeners were detected in river sediments, whereas 17 different PBDEs were found in fish samples. Large fish-to-sediment ratios for these brominated compounds indicate that they are highly bioavailable, with the exception of deca-BDE which was only detected in sediment samples. Concentrations of PBDEs and HBCD were slightly higher in muscle tissues than in liver samples obtained from the same specimen of fish. Moreover, PBDE and HBCD concentrations are correlated with fish length indicating the bioaccumulation of these contaminants.

Introduction

Brominated flame retardants (BFRs) are comprised of diverse classes or chemical compounds used in a variety of commercial applications. They are used in plastics, textiles, electronic circuitry, and other materials to prevent fires. The most used BFRs are polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), polybrominated biphenyls (PBBs), hexabromocyclododecane (HBCD), and tetrabromobisphenol A (TBBPA). The estimated global consumption of BFRs shows that their usage is on the rise: during the period from 1990 to 2000, there was more

than a doubling of usage from approximately 145 to 310 kilotons (1).

The studies performed in the last 15 years have mainly concerned PBDEs and in particular those congeners which derive from the penta-mix formulation (2, 3). PBDEs are typically produced at three different degrees of bromination, i.e., penta-BDE, octa-BDE, and deca-BDE. Penta-BDEs are in the list of hazardous substances in the Water Framework Directive, indicating that there is a need in Europe to perform environmental monitoring to comply with the regulation. The use of penta-BDE has been banned in Europe as of 2003 (4, 5). Recently, the EU announced an immediate ban on marketing of octa-BDE and expressed the European Parliament's wish to introduce the ban of octa-BDE into the ongoing legislative procedure (5). Moreover, the European Parliament also announced "a deferred ban on Deca-BDE applicable no later than 1 January 2006" (5). Consequently, a shift in production of PBDEs toward other BFRs such as HBCD took place. Recent reports suggest that usage of HBCD is increasing (6) and that because attention is now switching to this compound which is still widely used.

Similarly to other persistent organic pollutants (POPs), BFRs (except TBBPA) appear to be lipophilic and bioaccumulate in biota and humans (6). A considerable number of studies of PBDEs in wildlife have been undertaken since the mid-1980s, when Jansson et al. (7) first indicated that these compounds were present in samples collected remote from local sources and so may have become ubiquitous environmental contaminants (8, 9). However, only sparse data are available on other BFRs, like HBCD. There is currently a need for information on the distribution, fate, and effects of HBCD, to feed into risk assessments for this compound.

The objective of this study was to determine 40 PBDE congeners and HBCD levels in sediments from four places along the Cinca River, a tributary of the Ebro River (Spain). The work was based on samples collected up- and downstream from a heavily industrialized area. Moreover, 23 fish samples were collected along the same sampling points with the aim to obtain some information about the behavior of PBDEs and HBCD in biota, i.e., bioavailability and bioaccumulation. A rapid and simple method for PBDE and HBCD determinations in sediment and fish samples was used. The analytical method was based in selective pressurized liquid extraction (SPLE) without further cleanup step and analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), working with negative ion chemical ionization (NICI).

To the knowledge of the authors, this is the first time that HBCD is investigated in liver fish samples, and only two studies were previously performed in muscle fish samples from a Swedish river (10) and from lake Winnipeg (Canada) (11).

Experimental Section

Sample Collection. The study area is located in the east of Spain, along the Cinca River. Four different sampling stations were selected: sites 1 and 2, 20 and 12 km, respectively, upstream from Monzón; site 3, just downstream from Monzón, a heavily industrialized town with a very important chemical industry; and site 4, 30 km downstream of site 3 (Figure 1). Sites 3 and 4 were selected among the most polluted areas of the Cinca River (12, 13). Surficial sediments (0–2 cm) were collected at each different selected site. Attempts were made to collect several fishes from the same locations as the sediment samples. A total of 23 specimens of barbel (*Barbus graellsii*) were collected by DC electric pulse (Table 1). Fishes were killed and weighed, and the fork length

* Corresponding author phone: 34-93-4006100; fax: 34-93-2045904; e-mail: eeeqam@cid.csic.es.

[†] IIQAB, CSIC.

[‡] Confederación Hidrográfica del Ebro.

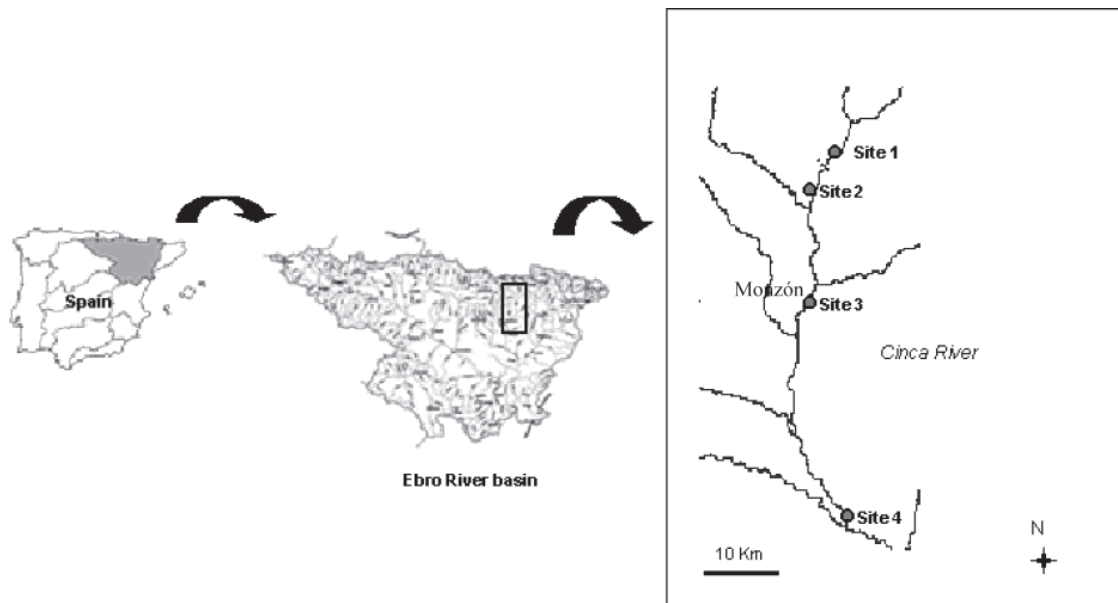


FIGURE 1. Geographical situation of the Cinca River and location of sampling stations.

TABLE 1. Sample Characteristics of Barbel Specimens Collected in This Study

sampling site	specimen	length (cm)	weight (g)	age ^a	sex ^b
1	1	25.0	222	A	M
	2	22.5	148	Y	M
	3	18.4	72	Y	M
	4	19.3	86	Y	F
2	5	23.3	166	A	M
	6	21.0	130	A	F
	7	46.0	1420	A	F
	8	13.8	38	Y	?
	9	16.0	62	Y	?
	10	15.6	58	Y	?
	11	11.5	22	Y	?
3	12	11.4	20	Y	?
	13	49.0	1610	A	F
	14	46.0	1132	A	F
	15	37.0	624	A	F
	16	14.2	36	Y	?
	17	11.8	20	Y	?
	18	6.9	4	Y	?
4	19	8.8	10	Y	?
	20	13.7	36	Y	?
	21	14.1	34	Y	?
	22	13.2	28	Y	?
	23	18.2	70	Y	?

^a A = adult (25–45 cm), Y = young (<25 cm). ^b M = male, F = female.

of each fish was measured. Muscle samples were collected from below the dorsal fin. The body cavity of each fish was opened, and the liver was removed and preserved frozen at -20°C with the muscle sample until analysis. All the samples (sediments and fishes) were collected in October 2002.

Extraction and Cleanup. The 40 PBDE congeners included in the analytical work were as follows: 3 monoBDEs (1,2,3), 7 diBDEs (7,8,10,11,12,13,15), 8 triBDEs (17,25,28,-30,32,33,35,37), 6 tetraBDEs (47,49,66,71,75,77), 7 pentaBDEs (85,99,100,116,118,119,126), 5 hexaBDEs (138,153,154,155,-166), 3 heptaBDEs (181,183,190), and the decaBDE (209). Sediments and muscle tissues were freeze-dried. Lyophilized sediment samples were ground and homogenized by sieving through a stainless steel 0.2-mm sieve and stored in sealed containers at -20°C until analysis. One gram dry weight

(dw) for sediment samples, 0.5 g dw for muscle samples, and 0.05–0.5 g wet weight (ww) for liver samples were spiked with PCB-209 (Lab. Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Germany). Spiked samples were kept overnight to equilibrate. To reduce the time of analysis, a selective pressurized liquid extraction (SPLE) method that automatically and rapidly achieves quantitative and selective extraction of PBDE congeners was used (14). SPLE was carried out using a fully automated ASE 200 system (Dionex, Sunnyvale, CA). A 22 mL extraction cell was loaded by inserting two cellulose filters into the cell outlet, followed by 6 g of alumina (0.063–0.200 mm, from Merck, Darmstadt, Germany). Spiked sediment samples were ground with alumina and cooper (<63 μm , from Merck, Darmstadt, Germany) (1:2:2), muscle samples with alumina (1:2), and liver samples with Na_2SO_4 and alumina (1:2:2). Mixtures were loaded into the extraction cell on top of alumina. The dead volume was filled with Hydromatrix (Varian Inc., Palo Alto, U.S.A.), and the cell was sealed with the top cell cap. The extraction cell was heated to 100°C and filled with hexane: CH_2Cl_2 (1:1) mixture until the pressure reached 1500 psi. After an oven heat-up time of 5 min under these conditions, two static extractions of 10 min at constant pressure and temperature were developed. After this static period, fresh solvent was introduced to flush the lines and cell, and the extract was collected in the vial. The flush volume amounted to 80–100% of the extraction cell. The extraction was cycled twice. The volume of the resulting extract was about 35 mL. Extracts were finally concentrated to incipient dryness and redissolved with 250 μL of CH_2Cl_2 prior to the analysis by GC–NICI–MS.

Instrumental Analysis. Gas chromatography coupled to mass spectrometry using negative ION chemical ionization (GC–NICI–MS) analyses were performed on a gas chromatograph Agilent 6890 connected to a mass spectrometer Agilent 5973 Network (Agilent Technologies España, Madrid, Spain). A HP-5ms (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness) containing 5% phenyl methyl siloxane (model HP 19091S-433) capillary column was used for the determination of congeners from mono- to hepta-BDEs. The temperature program was from 110°C (held for 1 min) to 180°C (held for 1 min) at $8^{\circ}\text{C}/\text{min}$, then from 180°C to 240°C (held for 5 min) at $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$, and then from 240°C to 265°C (held for 6 min) at $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$, using the splitless injection mode during

1 min and injecting 2 μL . The operating conditions were as follow: ion source temperature = 250 $^{\circ}\text{C}$, ammonia as chemical ionization moderating gas at an ion source pressure of $1.9 \cdot 10^{-4}$ Torr (15). For the determination of BDE-209, a DB-5ms (15 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness) containing 5% phenyl methyl siloxane capillary column was used with helium as the carrier gas at 10 psi. The temperature program was from 140 $^{\circ}\text{C}$ (held for 1 min) to 325 $^{\circ}\text{C}$ (held for 1 min) at 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (held for 10 min), using the splitless injection mode during 1 min (16). Both experiments were carried out monitoring the two most abundant isotope peaks from the mass spectra corresponding to $m/z = 79$ and 81 ($[\text{Br}]^{-}$). Confirmation criteria for the detection and quantification of PBDEs should include the following: (a) all m/z monitored for a given analyte should maximize simultaneously ± 1 s, with signal-to-noise ratio ≥ 3 for each, and (b) the ratio between the two monitored ions should be within 15% of the theoretical. Quantification of mono- to hepta-BDEs was carried out by an internal standard procedure with the PCB-209 as the internal standard, whereas BDE-209 was quantified using the external standard method. For high molecular mass BDE congeners, such as BDE-209, the choice of the surrogate standard is not obvious. PBB-209 has been used, but it may be present in the samples. A previous study (16) indicated that the use of PCB-209, commonly selected as the internal standard for PBDEs determination by NICI, resulted in higher relative standard deviations than those obtained using the external standard calibration.

HBCD determinations were carried out simultaneously with mono- to hepta-BDEs. Technical HBCD consists of three diastereomers: α , β , and γ -HBCD. HBCD can be determined by GC-MS, but, until now, the three diastereomers have not been separated by this technique. However, as apparently the response factors of the three diastereomers do not differ very much (17), HBCD can be quantified as total HBCD by GC-MS. Quantification was carried out by an external standard.

Using the described methodology, recoveries ranged from 53 to 84% for sediment and between 52 and 103% for fish samples. Detection limits were in the range of 6–50 pg/g dw for sediments and in the range of 2–19 pg/g ww for fish samples. Relative standard deviations of the method were in the range of 1–13%.

Results and Discussion

Sediment Samples. PBDEs were detected in all the sediment samples at concentrations ranging from 2 to 42 ng/g dw. HBCD was detected only in two samples, corresponding to the site near the chemical industry (514 ng/g dw) and downstream (90 ng/g dw). In these samples, HBCD contamination was greater than that observed for PBDEs. This is the first time HBCD has been found in environmental samples in Spain, and only one previous study reported HBCD levels in sediments from other countries (10). Table 2 show the concentrations of BDE congeners as well as of HBCD in the 4 sites selected in this study. Site 3 was found to be the most contaminated zone followed by site 4 > site 1 = site 2. As expected, PBDE and HBCD levels were greater near the site of industrial impact.

Our PBDE results were consistent with reported data for river sediments. PBDEs were determined in Swedish river sediments at 8–50 ng/g dw (10). Similar values were found in Japanese river sediments, with concentration levels between 21 and 59 ng/g dw (18). Higher levels up to 1400 ng/g dw were found in a downstream area of a manufacturing plant in United Kingdom (19) and at 120 ng/g dw downstream of an area with textile industries (10). Only one study was found regarding data for HBCD in sediments. Sellström et al. (10) reported concentration levels between nd and 1600

TABLE 2. Concentrations of PBDEs and HBCD^a in the River Sediment Samples of the 4 Sites Studied

	site 1	site 2	site 3	site 4
BDE-47	0.1	0.1	0.1	0.2
BDE-100	0.1	0.1	0.1	0.1
BDE-118	nd ^b	nd ^b	0.2	0.3
BDE-154	nd ^b	0.1	0.3	2.9
BDE-153	0.1	0.1	0.5	7.8
BDE-183	0.1	0.1	0.6	22.8
BDE-209	2.1	2.1	39.9	5.7
Total BDEs	2.4	2.6	41.7	39.8
HBCD	nd ^b	nd ^b	513.6	89.7

^a Expressed in ng/g dry weight. ^b nd = not detected.

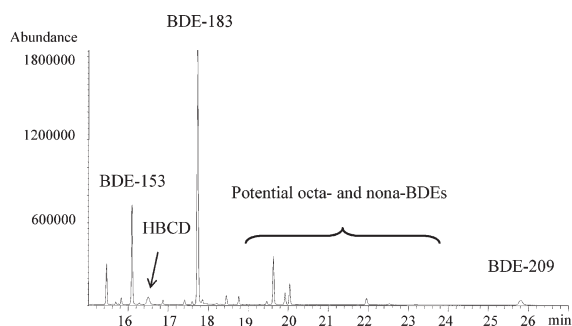


FIGURE 2. GC-NICI-MS (m/z 79) chromatogram obtained for sediment sample (site 4) in a DB-5ms (15 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness) chromatographic column.

ng/g dw in river sediments from a Swedish river with numerous textile industries.

Of 40 congeners included in the analytical work, 8 different PBDEs were detected, ranging from tetra- to deca-brominated compounds: tetra-BDE-47, penta-BDE-99, penta-BDE-100, penta-BDE-118, hexa-BDE-153, hexa-BDE-154, hepta-BDE-183, and deca-BDE-209. However, BDE-99 could not be quantified do to coelutions with breakdown products of HBCD. This coelution has been previously described by Covaci et al. (20). Literature indicates that the major congeners detected in sediment samples were BDE-47, 99, 100, and 209 (21). These findings were attributed to the use of penta- and deca-BDE formulations. Penta-BDE formulation consists of 41–42% tetra-BDEs (mainly BDE-47) and 44–45% penta-BDEs (predominantly BDE-99 and BDE-100), whereas deca-BDE formulation consists mainly of BDE-209 (97–98%), with a small amount of nona-BDEs (0.3–3%) (22). In our study, three sediments showed a congener pattern dominated by the deca-BDE-209, which was present at concentrations varying from 2 to 40 ng/g dw, followed by BDE-183 and BDE-153. In these samples, the deca-brominated congener constituted between 84 and 96% of the total PBDE contamination. However, a sediment sample collected at site 4 showed a principal contribution from BDE-183 (57%), followed by BDE-153 (20%) and by BDE-209 (14%). Figure 2 shows the chromatogram obtained for the sediment at site 4. As can be seen, BDE-153, -183, and -209 were detected as well as other chromatographic peaks eluting between hepta-BDE-183 and deca-BDE-209. These peaks were identified as potential octa- and nona-BDE congeners. The same peaks, with different relative intensities, were also detected in the rest of sediments analyzed. BDE-183 is often taken as indicative of the presence of the octa-BDE formulations (23). The presence of BDE-183 as well as of potential octa and nona-BDEs and BDE-209 could indicate the use of commercial formulations such as octa-BDE and deca-BDE in this area.

TABLE 3. Mean Concentrations of PBDEs and HBCD^a in the Muscle Tissue and Liver Samples of the 4 Sites Studied

	site 1		site 2		site 3						site 4	
	muscle mean ₁ (n = 4)	liver mean ₁ (n = 4)	muscle mean ₂ (n = 8)	liver mean ₂ (n = 8)	muscle mean _{young} (n = 3)	muscle mean _{adult} (n = 3)	muscle mean ₃ (n = 6)	liver mean _{young} (n = 3)	liver mean _{adult} (n = 3)	liver mean ₃ (n = 6)	muscle mean ₄ (n = 5)	liver mean ₄ (n = 5)
BDE 15	nd ^b	nd ^b	nd ^b	nd ^b	0.3	1.1	0.7	3.6	0.7	1.8	0.2	nd ^b
BDE 17	nd ^b	nd ^b	nd ^b	nd ^b	0.1	0.4	0.3	0.5	0.2	0.3	nd ^b	nd ^b
BDE 25	nd ^{bb}	nd ^b	nd ^b	nd ^b	0.1	0.3	0.2	0.2	0.1	0.1	nd ^b	nd ^b
BDE 28+33	nd ^b	nd ^b	0.1	nd ^b	1.0	3.3	2.2	1.2	2.0	1.6	0.2	0.8
BDE 35	nd ^b	nd ^b	nd ^b	nd ^b	0.1	0.2	0.1	0.5	0.2	0.3	nq ^c	nd ^b
BDE 37	nd ^b	nd ^b	nd ^b	nd ^b	0.2	0.6	0.4	2.1	0.4	1.1	0.2	nd ^b
BDE 71	nd ^b	nd ^b	0.6	0.3	0.1	8.2	4.5	5.1	3.5	4.3	1.0	4.4
BDE 47	nq ^c	0.1	0.8	0.8	11.5	32.8	22.1	12.8	18.5	15.6	8.7	9.7
BDE 66	nd ^b	nd ^b	nd ^b	nd ^b	1.3	1.6	1.3	2.5	1.7	2.1	0.7	1.9
BDE 100	nd ^b	nd ^b	nq ^c	nq ^c	0.7	4.2	2.1	nq ^c	12.4	12.4	0.8	nq ^c
BDE 119	nd ^b	nd ^b	0.1	nd ^b	1.0	6.8	3.3	nq ^c	4.4	4.4	0.7	nq ^c
BDE 118	nd ^b	nd ^b	0.3	nd ^b	3.2	1.1	2.1	1.5	nd ^b	1.5	0.7	nq ^c
BDE 154	nq ^c	nq ^c	0.8	nq ^c	76.5	96.9	86.7	56.5	85.2	70.9	30.4	20.0
BDE 153	0.3	0.2	0.3	0.2	110.0	141.0	125.5	106.5	147.5	127.0	40.9	37.8
BDE 183	1.0	nd ^b	1.4	nd ^b	58.9	9.8	34.4	70.1	4.0	30.4	12.9	0.9
BDE 209	nd ^b	nd ^b	nd ^b	nd ^b	nd ^b	nd ^b	nd ^b	nd ^b	nd ^b	nd ^b	nd ^b	nd ^b
total BDEs	1.3	0.2	4.5	0.4	263.4	297.9	280.6	236.5	279.2	257.8	96.3	74.5
HBCD	nd ^b	nd ^b	nd ^b	nd ^b	309.0	750.4	529.7	483.9	624.8	554.4	89.5	432.3

^a Expressed in ng/g wet weight. ^b nd = not detected. ^c nq = not quantifiable.

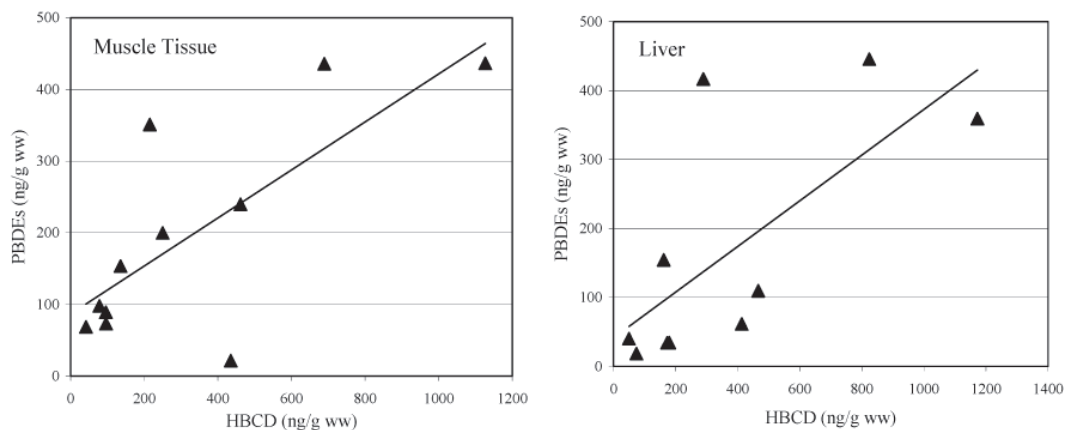


FIGURE 3. Plot of the concentration of total PBDEs in Cinca River fishes (sites 3 and 4) versus the concentration of HBCD in the same fish. The lines are linear regression on the data.

Fish Samples. PBDEs were detected in all the muscle and liver samples at concentrations ranging from 0.2 to 436 and 0.1 to 446 ng/g ww, respectively. HBCD was detected only in samples corresponding to sites 3 (215–1127 ng/g ww for muscles, and 161–1172 ng/g ww for livers) and 4 (42–135 ng/g ww for muscles, and 49–180 ng/g ww for livers). In these samples, HBCD contamination was similar or greater than that observed for PBDEs. Table 3 shows the mean concentrations of BDE congeners as well as of HBCD in the 4 sites selected in this study. Similar to our findings in sediment samples, site 3 was found to be the most contaminated zone followed by site 4 > site 1 = site 2.

The majority of published data in fish samples expressed PBDE levels in ng/g lipid weight (lw), making difficult the comparison with our results expressed in ng/g wet weight (ww). However, some works also used the same unities of this study. Zennegg et al. (24) analyzed whitefish from different Swiss lakes and reported PBDE levels between 1.6 and 7.4 ng/g ww. Carps from the Detroit river and the Des Plaines river (25) presented PBDE concentration levels around 5 ng/g ww and 12 ng/g ww, respectively. All these values were in accordance with our results in sites out of industrial impact (sites 1 and 2).

The literature on HBCD levels in fish samples is very scarce. Budakowski et al. (11) analyzed muscle fish samples from Lake Winnipeg (Manitoba, Canada) and found contamination levels in the range of 0.2–1.1 ng/g lw. Sellström et al. (10) reported concentration levels between nd and 8000 ng/g lw in muscle fish samples from a Swedish river with numerous textile industries. The reported data were expressed in lw, whereas our results were calculated on ww basis. However, HBCD contamination in the Swedish work as well as in our study was similar or higher than that found for PBDEs. In our work, concentrations of HBCD and total PBDEs were correlated in individual fish ($R^2 = 0.6$ and $R^2 = 0.5$ for muscle and liver samples respectively, $n = 11$) (Figure 3). These results could be indicative that the environmental fate of the two classes of compounds is analogous and that HBCD could be as prevalent as PBDEs in Cinca River.

Of 40 congeners included in the analytical work, 17 different PBDEs were detected, ranging from di- to heptabrominated compounds. However, BDE-209, the dominant congener of the total PBDE contamination in sediments, was not detected in biota samples. Luross et al. (26) found a BDE congener distribution in aquatic biological matrices dominated by BDE-47 and followed by BDE-99, BDE-100, BDE-

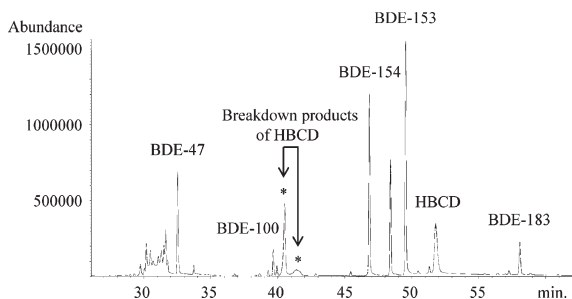


FIGURE 4. GC-NICI-MS (m/z 79) chromatograms obtained for muscle tissue sample from site 3 in a DB-5ms (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m film thickness) chromatographic column.

TABLE 4. Ratios between the Concentrations of PBDEs and HBCD Found in Fish (ng/g dry weight) and the Concentrations Found in Sediment (ng/g organic carbon) from Site 3

ratio	muscle to sediment	liver to sediment	muscle to sediment, from ref 10
BDE-47	16.6	13.4	6.6–19
BDE-100	1.2	5.7	4.6–36
BDE-118	0.6		nr ^a
BDE-153	16.7	18.9	nr ^a
BDE-154	20.7	20.0	nr ^a
BDE-183	4.3	0.5	nr ^a
BDE-209			
HBCD	0.1	0.1	0.6–15

^a nr = not reported.

153, BDE-154, BDE-28, and BDE-183. However, the distribution found in our study showed a clear predominance of hexa-BDE congeners 153 and 154 as well as of hepta-BDE-183 (Figure 4). These data correlate well with the distribution observed in the sediment samples. The same findings were reported by Rice et al. (25), who analyzed carps from the Des Plaines River (U.S.A.). The dominant isomers were two hepta-BDE congeners (BDE-181 and BDE-183) as well as two hexabromo congeners (BDE-153 and BDE-154).

Comparison between levels found in muscle tissues and livers showed that similar contamination was detected in both matrices. However, slightly higher BFR levels were found in muscle tissues. Ratios between total PBDE levels in muscle and in liver corresponding to the same individual fish ($R_{M/L}$) were calculated for samples collected at the most contaminated site (site 3). The mean value of these $R_{M/L}$ s was 1.1. The same $R_{M/L}$ s were calculated for HBCD contamination, with a similar mean value ($R_{M/L} = 1.3$). In a previous study on cod and whiting fishes, PBDE concentrations have been found

TABLE 5. Regression Parameters for PBDE and HBCD Concentration Measurements in Sites 3 and 4

variable		slope	R^2
length vs	Muscle Tissues		
	BDE-47	1.3	0.8
	BDE-153	4.4	0.6
	BDE-154	2.8	0.6
	total PBDEs	8.6	0.6
	HBCD	21.8	0.6
length vs	Liver		
	BDE-47	0.6	0.6
	BDE-153	4.8	0.5
	BDE-154	2.6	0.5
	total PBDEs	8.6	0.6
	HBCD	9.4	0.1

to be lower in muscle tissue than in liver, whereas higher values were detected in the muscle of herring (27).

Bioavailability and Bioaccumulation. When sediment concentrations were compared to those in barbel collected at the same sites along the Cinca River, high fish-to-sediment ratios were seen. Such comparisons are best made using lipid weight concentrations in the fish compared to the concentrations in sediment normalized to organic carbon (28). However, all the muscle and liver material was used for BFR determinations, and no extra sample was available for the determination of lipid content. For this reason, tentative fish-to-sediment ratios were calculated using dry weight concentrations in fish compared to the concentration in sediment normalized to organic carbon. Table 4 show the muscle-to-sediment ratios as well as the liver-to-sediment ratios for BFRs determined at site 3. Specially, levels of BDE-47, BDE-153, and BDE-154 in fish were high compared with levels in sediment (13–21-fold) indicating the high bioavailability of these congeners. Moreover, our calculated fish-to-sediment ratios correlated well with those reported by Sellström et al. (10). These large fish-to-sediment ratios indicate that these contaminants are bioavailable and are taken up readily by the fish. This is also supported by the fact that for some BDE congeners detectable levels were found in fish but not in corresponding sediments: 17 different PBDEs were detected in fish samples, whereas only 8 PBDE congeners were found in sediments. Solely BDE-209, the main BDE congener found in sediments from the area, was not found in biota samples. The main reason for their absence in biota seems to be its relatively low bioaccumulation potential. This may be due either to a low uptake rate for this very large molecule or a relatively rapid excretion after biotransformation. The low bioconcentration hazard of BDE-209 was also reported by other authors (29).

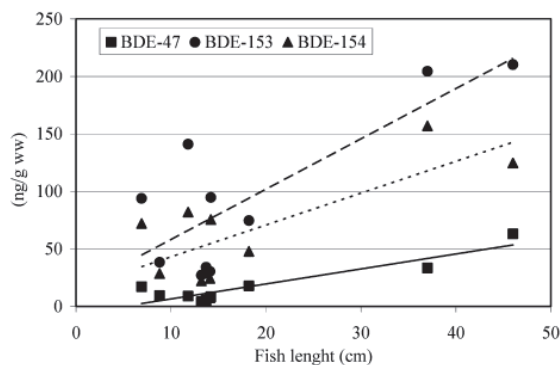
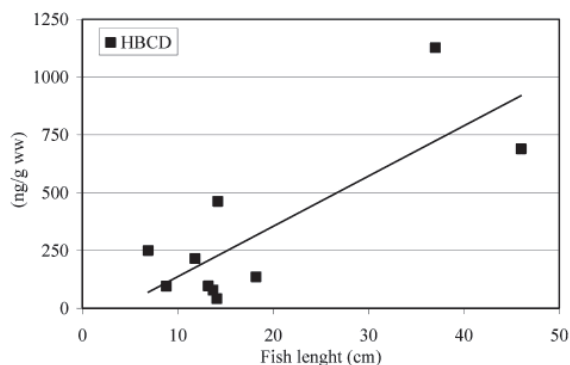


FIGURE 5. Length of Cinca River barbel (sites 3 and 4) versus concentrations of HBCD, BDE-47, BDE-153, and BDE-154 in the muscle. The lines are linear regression on the data.

The fact that HBCD is found in fish indicates that it is also bioavailable. However, the low fish-to-sediment ratio at site 3 (below 1) does not agree with the high ratios reported by Sellström et al. (10) for pikes from a Swedish River. Pike is a predator at the top of the food chain and the higher fish-to-sediment ratio in this species could indicate the biomagnification of this compound through the aquatic trophic chain.

Previous studies showed that PBDE levels increased with the age of the fish, indicating bioaccumulation (30, 31). Fish length is directly related to fish age. Figure 5 shows the measured concentrations of PBDEs and HBCD as a function of fish length at sites 3 and 4. Regression parameters are listed in Table 4. The correlation coefficients (R^2) indicate acceptable correlations. Moreover, these correlations are very similar for each contaminant studied, with higher R^2 for BDE-47, followed by BDE-153 and -154, and by HBCD. These data showed that PBDEs and HBCD are bioaccumulated in barbels from Cinca River.

Acknowledgments

This research project was partly funded by the Confederación Hidrográfica del Ebro and by the European Union under the Global Change and Ecosystems (FP6) Water Cycle and Soil Related Aspects (AQUATERRA, Project 505428). R. Chaler and D. Fanjul are thanked for their assistance with the MS work. A.d.l.C. acknowledges a grant from Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya (2003FI 00092).

Literature Cited

- (1) Arias, P. A. *Proceedings of the 2nd International Workshop on Brominated Flame Retardants*, Stockholm, Sweden, 2001; pp 17–19.
- (2) Strandberg, B.; Dodder, N. G.; Basu, I.; Hites R. A. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, *35*, 1078–1083.
- (3) Hale, R. C.; Alae, M.; Manchester-Neesvig, J. B.; Stapleton, H. M.; Ikonomou, M. G. *Environ. Int.* **2003**, *29*, 771–779.
- (4) EU. European Union press release, January 30; 2001.
- (5) EP. European Parliament Report A5-0437/2002; 2002.
- (6) de Wit, C. *Chemosphere* **2002**, *46*, 583–624.
- (7) Jansson, B.; Asplund, L.; Olsson, M. *Chemosphere* **1987**, *16*, 2343–2349.
- (8) Manchester-Neesvig, J. B.; Valters, K.; Sonzogni, W. C. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, *35*, 1072–1077.
- (9) Voorspoels, S.; Covaci, A.; Schepens, P. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 4348–4357.
- (10) Sellström, U.; Kierkegaard, A.; de Wit, C.; Jansson, B. *Environ. Toxicol. Chem.* **1998**, *17*, 1065–1072.
- (11) Budakowski, W.; Tomy, G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 1399–1404.
- (12) Raldúa, D.; Ferrando, P.; Durán, C.; Pedrocchi, R. *Chemosphere* **1997**, *35*, 2245–2254.
- (13) Raldúa, D.; Pedrocchi, R. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1996**, *57*, 597–602.
- (14) de la Cal, A.; Eljarrat, E.; Barceló, D. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1021*, 165–173.
- (15) Eljarrat, E.; Lacorte, S.; Barceló, D. *J. Mass Spectrom.* **2002**, *37*, 76–84.
- (16) Eljarrat, E.; de la Cal, A.; Barceló, D. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 610–614.
- (17) QUASIMEME. Report Workshop Analysis Brominated Flame Retardants, Barcelona, Spain, 21–23 October. Aberdeen, UK: FRS Marine Laboratory; 2002.
- (18) Watanabe, I.; Kawano, M.; Tatsukawa, R. *Organohalogen Compd.* **1995**, *24*, 337–340.
- (19) Allchin, C. R.; Law, R. J.; Morris, S. *Environ. Pollut.* **1999**, *105*, 197–207.
- (20) Covaci, A.; Voorspoels, S.; de Boer, J. *Environ. Int.* **2003**, *29*, 735–756.
- (21) Palm, A.; Cousins, I. T.; Mackay, D.; Tysklind, M.; Metcalfe, C.; Alae, M. *Environ. Pollut.* **2002**, *117*, 195–213.
- (22) Alae, M.; Arias, P.; Sjödin, A.; Bergman, A. *Environ. Int.* **2003**, *29*, 683–689.
- (23) Law, R. J.; Alae, M.; Allchin, C. R.; Boon, J. P.; Lebeuf, M.; Lepom, P.; Stern, G. A. *Environ. Int.* **2003**, *29*, 757–770.
- (24) Zennegg, M.; Kohler, M.; Gerecke, A. C.; Schmid, P. *Chemosphere* **2003**, *51*, 545–553.
- (25) Rice, C. P.; Chernyak, S. M.; Begnoche, L.; Quintal, R.; Hickey, J. *Chemosphere* **2002**, *49*, 731–737.
- (26) Luross, J. M.; Alae, M.; Sergeant, D. B.; Cannon, C. M.; Whittle, D. M.; Solomon, K. R. *Chemosphere* **2002**, *46*, 665–672.
- (27) Boon, J.; Lewis, W.; Tjoen-A-Choy, M.; Allchin, C.; Law, R.; de Boer, J.; Ten Hallers-Tjabbes, C.; Zegers, B. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 4025–4032.
- (28) Bierman, V. J. J. *Environ. Sci. Technol.* **1990**, *24*, 1407–1412.
- (29) Andersson, Ö.; Blomkvist, G. *Chemosphere* **1981**, *10*, 1051–1060.
- (30) de Boer, J.; Wester, P. G.; Rodríguez, D. P.; Lewis, W. E.; Boon, J. P. *Organohalogen Compd.* **1998**, *35*, 383.
- (31) Haglund, P. S.; Soc, D. R.; Buser, H. R.; Hu, J. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31*, 3281–3287.

Received for review October 20, 2003. Revised manuscript received January 15, 2004. Accepted January 16, 2004.

ES0301424

■ 2.6. Artículo científico #4

Spatial variation of DDT and its metabolites in fish and sediment from Cinca River, a tributary of Ebro River (Spain)

A. de la Cal, E. Eljarrat, D. Raldúa, C. Durán, D. Barceló
Chemosphere (2008) 70(7):1182-1189

Spatial variation of DDT and its metabolites in fish and sediment from Cinca River, a tributary of Ebro River (Spain)

Agustina de la Cal ^a, Ethel Eljarrat ^{a,*}, Demetrio Raldúa ^b, Concha Durán ^c, Damià Barceló ^a

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

^b Laboratory of Environmental Toxicology, UPC, CN 150, Km 14.5, 080227 Terrasa, Spain

^c Confederación Hidrográfica del Ebro, Paseo de Sagasta 24-26, 5007 Zaragoza, Spain

Received 10 April 2007; received in revised form 16 August 2007; accepted 17 August 2007

Available online 29 October 2007

Abstract

The Cinca River is a tributary of Ebro River in the NE of Spain which receives input from different activities. One of the most important is related to an industry where DDT is used as an intermediate in the production of dicofol. This study evaluated the DDT contamination along the Cinca River. Sampling sites were selected up- and downstream from this industry. Sediments and fishes (59 bleaks (*Alburnus alburnus*) and 23 barbels (*Barbus graellsii*)) were collected in 2002 and analyzed using a new and rapid selective pressurized liquid extraction (SPL) method. DDT and its metabolites were found in sediments and fishes at levels ranging from 9 to 94 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dry weight (d.w.) and from not detected to 2098 $\mu\text{g kg}^{-1}$ wet weight (w.w.), respectively. The highest values corresponded to samples collected just downstream the industry. Thirty kilometers downstream from the factory, levels were clearly lower, showing a weakening of the impact. p,p'-DDE isomer comprised up to 50% and 70% of total DDT measured in sediment and fish, respectively. When compared with values obtained in a previous study in 1999, a generalized drop of the levels in all matrixes (77–97%), was observed. No meaningful differences were found between the two fish species studied neither between the two tissues (muscle and liver) analyzed.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: DDE; DDT; Dicofol; Bioaccumulation; Barbel; Bleak

1. Introduction

Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), one of the most widely used pesticide in Western countries until the 1970s, is probably the best known and most useful one in the world, not only for the control of plagues in agricultural crops but also for control of disease carrying insects such as malaria vector mosquitoes. The high persistence and bioaccumulation/bioconcentration properties of this compound and its two main metabolites, dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) and dichlorodiphenyldichloroethane (DDD), are known since long (WHO/ICPS, 1979; D'Amato et al., 2002). Its global presence, resulting from its widespread, uncontrolled and intensive use for years, is still a problem

of great relevance to public health. In Spain, restrictions in DDT use were established in 1977, and it was one of the countries signing the Stockholm Convention in 2001, where this compound was included in the list of persistent pollutants to be eliminated (www.pops.int/documents/signature/signstatus.htm). However, this is one of the few countries in the world (together with China, Brazil and India) where its use is still allowed as an intermediate in the production of dicofol (Rasenberg and van de Plassche, 2002). Such use in Spain is known to exist in Monzón, in the North-East, where the industry Montecinca SA produces dicofol since 1987 (van de Plassche et al., 2002). That factory drains to the Cinca River, a tributary of the Ebro River, the largest and most plentiful river in Spain. This company attracted the attention of the ecologist groups and the local authority in charge of the control of the basin in 1999, after a high mortality of fishes took place in the

* Corresponding author. Tel.: +34 934006100; fax: +34 932045904.
E-mail address: eeeqam@cid.csic.es (E. Eljarrat).

river. Judicial proceedings were opened then against this company, being accused of exceeding the authorized drain of DDT to the river.

The objectives of the present study were to investigate the spatial variation of DDT and its metabolites in sediment and fish from the area of Cinca River up- and downstream the industrial estate in Monzón, so that the source of contamination area is located. A previous study was carried out in this area just after the incident in 1999 (Interlab, 1999).

2. Experimental

2.1. Sample collection

The study was carried out along the Cinca River, a tributary of Ebro River, in the North-East of Spain (Fig. 1). Samples were collected in October 2002, up- and downstream from a dicofol producing industry in Monzón suspected of draining to the river. Four different sampling stations were selected. Sites 1 and 2 were located upstream from Monzón, 20 and 12 km, respectively. Site 1 was chosen upstream of a dam that constitutes a physical barrier for the fishes so that their concentrations can be understood as the baseline/background levels, whereas site 2 serves as a control of any possible impact upstream from the inflicted area. Site 3 was situated immediately downstream the industrial zone. Finally, site 4, 30 km downstream from site 3, allowed checking the spatial extension of the impact. DC electric pulse was used to capture fishes from selected sampling points. Two species of fish with different ecological niches, 23 barbel (*Barbus graellsii*) and 59 bleak (*Alburnus alburnus*) were collected. It was not possible to catch any bleak in site 1. Specimens were killed, weighted and their fork length was measured. Bleak were

kept as whole pieces, whereas only liver and muscle tissues were kept from barbel. Muscle samples were collected from above the lateral line and liver was removed by opening the body cavity. All matrixes were wrapped with aluminium foil and preserved frozen at -20°C until analysis. Additionally, a surface (0–2 cm) sediment sample was collected from the river middle bed at each site.

2.2. Extraction and cleanup

The method used for drying the matrixes was chosen depending on the available quantity of each one. This way, sediments and muscle tissues were freeze dried (10^{-2} mbar vacuum), whereas water from liver was removed by adding sodium sulfate in the extraction cell. Lyophilized fish was ground and homogenized with a mortar and scissors in some cases. In case of sediment samples a stainless steel $120\ \mu\text{m}$ sieve was used after grounding. All samples were stored in sealed glass containers at -20°C until analysis. Analyzed quantity was 1 g dry weight (d.w.) for sediment and whole fish samples, 0.5 g d.w. for muscle samples and 0.05–0.5 g wet weight (w.w.) for liver samples. Analysis of sediments was carried out by a method developed in our laboratory and described elsewhere (Lacorte et al., 2006). For the analysis of fish a new method based in selective pressurized liquid extraction (SPLE) developed for PBDEs (De la Cal et al., 2003) was used. It consists of pressurized liquid extraction (PLE) with on-line cleanup, which is achieved by inclusion of a sorbent in the extraction cell (Gomez-Ariza et al., 2002). For this purpose, we used an ASE 200 system (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) with 22 ml cells. After placing two cellulose filters into the cell bottom, body cell was loaded with 6 g of neutral alumina (0.063–0.200 mm, from Merck, Darmstadt, Germany) previously activated at 150°C during

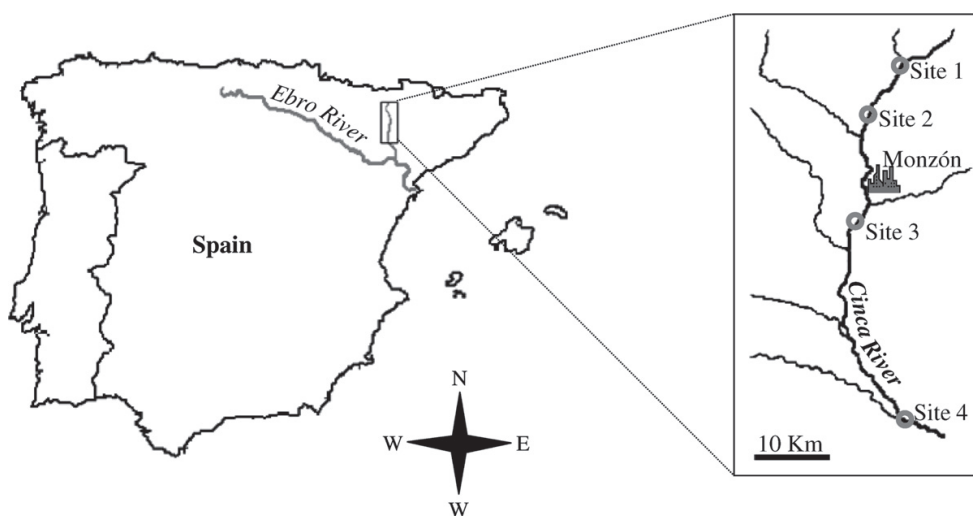


Fig. 1. Geographical location of the study area and sampling sites.

24 h. Sub-samples were ground with alumina (1:2, w/w) and, in case of liver samples, with Na₂SO₄ besides (1:2:2). Finally, mixtures were loaded into the extraction cell on top of alumina and the cell was fulfilled with Hydromatrix (Varian Inc., Palo Alto, USA). Extraction was carried on with hexane:dichloromethane (1:1) mixture at 100 °C (heat-up time 5 min) and 1.03 × 10⁷ Pa during two static extractions of 10 min with flush volume 80% of the extraction cell. The volume of the resulting extract was about 35 ml. Extracts were finally concentrated to incipient dryness and re-dissolved with 250 µl of hexane prior to the analysis by GC/EI-MS.

2.3. Instrumental analysis

GC/MS analyses were performed with a gas chromatograph GC 8000 series 8060 (Fisons Instruments, Spain) coupled with a mass spectrometer with quadrupole detector MD 800 (Fisons Instruments, Spain). The separation of analytes was achieved using a DB-5 (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm) capillary column. The temperature program was from 60 °C (held during 1 min) to 200 °C at 5 °C min⁻¹, then from 200 to 220 °C at 1 °C min⁻¹ and finally at 8 °C min⁻¹ from 220 to 300 °C (held during 5 min). Injection was carried out by splitless mode during 48 s with an injector temperature of 250 °C. It was used EI as ionization mode with ionization energy of 70 eV, source temperature of 200 °C. Detection was performed monitoring the three most abundant isotope peaks from the mass spectra of each compound: *m/z* 246, 248 and 176 for *o,p'*-DDE; 246, 248 and 318 for *p,p'*-DDE; 235, 237 and 165 for *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDT and *p,p'*-DDT. Quantification was carried out from the highest *m/z* by external standard.

2.4. Quality control

Fish tissues were spiked with target compounds at 100 µg kg⁻¹ d.w. in triplicate and analyzed with the methodology described above. Recoveries obtained ranged from 60% to 114% in the whole fish, from 78% to 123% in muscle tissue and from 56% to 69% in liver. Standard deviation was below 23% in all cases. Detection limits were between 0.12 and 1.13 µg kg⁻¹ w.w. in the whole fish, between 0.22 and 2.04 µg kg⁻¹ w.w. in muscle, and from 0.09 to 1.74 µg kg⁻¹ w.w. in liver.

2.5. Determination of fish lipid content

Muscle and liver samples were completely used for the determination of the analytes and no extra material was available for the determination of the lipid percentage. Only for four bleak samples this analysis was possible. For this purpose, fish sub-samples were extracted by pressurized liquid extraction (PLE). Lipid weight (l.w.) was calculated by evaporation of the extracts under nitrogen flow and further heating until constant weight.

2.6. Determination of total organic carbon content in sediment

Total organic carbon (TOC) of sediment samples was determined by carbon microelemental analysis after consecutives (until there was no reaction) acidic attacks of the lyophilized sample.

3. Results and discussion

3.1. Concentration levels

Levels found in each station for the sum of the six analogs (\sum DDXs) are shown in Table 1. In both matrixes, fish and sediment, values were found clearly higher downstream from Monzón, indicating the impact of the draining (Fig. 2). In bleak samples, values were more than 100 times higher in site 3 (mean value of 840 µg kg⁻¹ w.w.) than upstream (site 2, mean value of 5 µg kg⁻¹ w.w.). In muscle of barbel, the values in site 3 were 91 times higher (mean value of 997 µg kg⁻¹ w.w.) than in site 2 (11 µg kg⁻¹ w.w.). As regards liver of barbel, \sum DDXs were detected in the range of 167–1529 µg kg⁻¹ w.w. in site 3, whereas they could not be detected in the sites upstream. In sediment samples, level in site 3 accounted for 10 times the values in site 2. As it could be expected the levels for all matrixes in site 4 – 30 km downstream from the factory – were lower than those of site 3, with 32–85% of decrease in fish and 78% in sediment. However, they are still much higher than those obtained upstream the factory (sites 1 and 2).

A previous study was carried out in this area just after the high mortality of fishes in 1999 (Interlab, 1999). That study included the same sampling points for fish as here except the site 1, which was not sampled then. Ranges of levels were 29–104 µg kg⁻¹ w.w. in site 2, 3681–9790 µg kg⁻¹ w.w. in site 3 and 1188–10431 µg kg⁻¹ w.w. in site 4. For sediment, only just downstream Monzón (site 3) was sampled, reporting 914 µg kg⁻¹ d.w. Comparison with values obtained here in the most contaminated point (site 3), shown a general drop of the levels: 77–97% in fish and 90% in sediment (Fig. 3).

Residue data in sites 1 and 2 are in line with the obtained in other sites of the Ebro basin (Lacorte et al., 2006). That

Table 1
Average and range (in brackets) of levels of \sum DDXs in the different matrixes along Cinca River

	Upstream Monzón		Downstream Monzón	
	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4
<i>Fish</i>				
<i>Barbel</i>				
Muscle	51 (46–64)	11 (8–15)	997 (326–2098)	562 (211–1692)
Liver	n.d.	n.d.	718 (167–1529)	409 (101–1529)
Bleak	n.a.	5 (2–6)	840 (328–1527)	176 (40–303)
Sediment	10.5	9.0	93.9	21.3

Data are expressed in µg kg⁻¹ w.w. (fish) or µg kg⁻¹ w.w. (sediment).

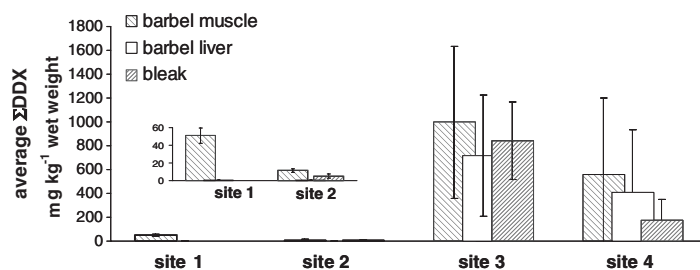


Fig. 2. Comparison between average levels of Σ DDXs in fish ($\mu\text{g kg}^{-1}$ w.w.). Error bars represent one standard deviation over and below the average.

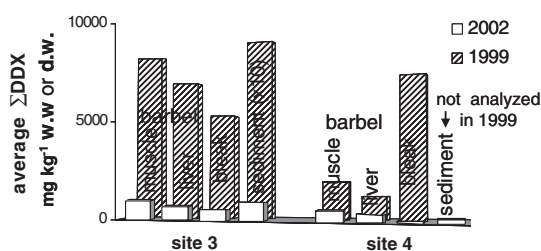


Fig. 3. Levels of Σ DDXs in the different matrices analyzed. Comparison between this study (2002) and 1999 (Interlab, 1999). Data are expressed in $\mu\text{g kg}^{-1}$ w.w. in fish and $10\times \mu\text{g kg}^{-1}$ d.w. in sediment.

study reported levels between n.d. to $72 \mu\text{g kg}^{-1}$ d.w. in fish and from n.d. to $37.8 \mu\text{g kg}^{-1}$ d.w. in sediment in the major part of the basin, with the exception of three stations where values reached $983 \mu\text{g kg}^{-1}$ d.w. in fish and $241 \mu\text{g kg}^{-1}$ d.w. in sediment. Our values for fish (sites 1 and 2) are also in the range of those reported recently worldwide, even in remote areas as a high mountain lake ($19 \mu\text{g kg}^{-1}$ w.w.; Vives et al., 2005), and they seem to represent the baseline level nowadays (Table 2). Higher levels were found for example in liver of smallmouth bass of an industrialized and with maritime traffic area in the Willamette River, in USA ($40\text{--}320 \mu\text{g kg}^{-1}$ w.w.; Sethajintanin et al., 2004), although they are lower than the obtained here for our most contaminated site (site 3). Higher values than those of site 3 were obtained in liver of burbot (a predator in the top of the trophic chain) in Yukon Lakes, Canada ($2453 \mu\text{g kg}^{-1}$ w.w.; Ryan et al., 2005). For sediment, higher levels than ours are more frequently reported in the recent literature (see Table 2). Values much higher were obtained in sediment from farm ditches in Canada (n.d.– $5800 \mu\text{g kg}^{-1}$ d.w.; Wan et al., 2006) and especially in a Norwegian lake receiving the draining of a forest nursery ($1343000 \mu\text{g kg}^{-1}$ d.w.; Eggen and Majcherczyk, 2006).

Levels were similar for both species, barbel and bleak. As regards the two different barbel tissues studied, and although commonly organic pollutants tend to accumulate better in liver than in muscle, as this organ has more fat (see example in Table 2; Svobodova et al., 2003; Sapozhnikova et al., 2005b), no differences were noticed.

The usual correlation between levels of the fishes and their length or weight (Larsson et al., 1991; Madenjian et al., 1994) was not found here. This could be due to a lack of correlation between the lipid content and the size of the fishes, as fat content is one of the major factors influencing the levels of lipophilic organic contaminants as DDT in fish.

3.2. Tolerance limits

The values found in fish tissue in site 3 are below the FDA limit of $5000 \mu\text{g kg}^{-1}$ w.w. for consumption (FDA/CFSAN, 2001). However, they are above concentrations associated with reproductive toxicity in several species of fish ($500 \mu\text{g kg}^{-1}$ w.w.; Jarvinen and Ankley, 1999) and different local tolerance limits as the Canadian wildlife protective criterion ($14 \mu\text{g kg}^{-1}$ w.w.; CCME, 2003). They exceed also the maximum acceptable limit for human consumption established by the FAO/WHO ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$ w.w.; FAO/WHO, 1986).

3.3. Profile of analogs

The profile of distribution of the six compounds studied was similar in all fish samples and did not vary significantly from 1999 (Fig. 4). p,p'-DDE was the major one, accounting for 55–62% of the total DDXs, followed by o,p'-DDE (7–12%). In sediment, some differences were observed, although p,p'-DDE was also the most abundant (32%). p,p'-DDT accounted for a 20% of the total in front of the 1–6% in fish. o,p'-DDT was 2–6% of the total DDXs in fish, whereas in sediment it was not detected.

In the environment, DDT degrades to DDE and DDD in aerobic and anaerobic conditions, respectively (Metcalf, 1973). The half life of p,p'-DDT in fish is approximately 8 months, whereas the half life of p,p'-DDD and p,p'-DDE is about 7 years (Binelli and Provini, 2003). On this basis, the DDT/(DDE + DDD) ratio is often used as indicator of the age (recent or historic) of the source of DDT (Sapozhnikova et al., 2004; Qian et al., 2006). According to this, both in 2002 and in 1999, the source of DDT pollution in Cinca River was old, as the aforementioned relationship is below 1 in all cases (Table 3). However, it has been suggested that this relationship is not valid in areas where contamination of dicofol is possible, as this case is. The reason

Table 2
Recent reported world-wide levels of DDXs in sediment and fish from other freshwater bodies

Location	Sampling date	Sediment \sum DDXs ($\mu\text{g kg}^{-1}$ d.w.)	Biota		Reference
			Species, tissue	\sum DDXs ($\mu\text{g kg}^{-1}$ w.w.)	
Dniester River, Moldova	2001	8.2–34.7	<i>Abramios brama</i> , <i>Rutilus rutilus heckeli</i> , <i>Perca fluviatilis</i> , <i>Chondrostomomasus</i> , <i>Carasius auratus gibelio</i> , <i>Cyprinus Carpio</i> , muscle	3.1–34.8	Sapozhnikova et al. (2005a,b)
Ponds in Bohemia, Czech Republic	1999–2001	0.69–143	Carp, muscle Carp, liver	7.9–86.5 12.1–200	Svobodova et al. (2003)
Lower Willamette River, Oregon, USA	2000	n.a.	Smallmouth bass Black crappie Common carp	40–320 46–72 66–97	Sethajintanin et al. (2004)
River Turia, Spain	2000	n.a.	Common trout	2.4–8.4	Bordajandi et al. (2003)
Lake Ontario, Canada	2001	n.a.	Adult female Chinook salmon, muscle	170	O'Toole et al. (2006)
Laberge, Yukon lakes, Canada	2001 2003	n.a. n.a.	Burbot, liver Lake trout, muscle	2453 61.5	Ryan et al. (2005)
Yukon River Basin, Alaska Sir dam Lake, Turkey	2002 2003	n.a. n.a.	Pike, sucker, burbot Kalashpa, carp, silurus, muscle	2.2–16.9 14.4–77.4	Hinck et al. (2006) Erdogru et al. (2005)
Calicut region, Kerala, India	2003	n.a.	Different freshwater species	0.09–8	Sankar et al. (2006)
Redó Lake, Pyrenees, Spain	2003	n.a.	Brown trout, muscle	19	Vives et al. (2005)
Minjiang River Estuary, Southeast China	1999	1.6–13.1	n.a.	n.a.	Zhang et al. (2003)
Lakes in Danube delta, Romania	2001	0.9–17	n.a.	n.a.	Covaci et al. (2006)
Ditch tributaries to Fraser River, British Columbia, Canada	2002–2003	n.d.–5800	n.a.	n.a.	Wan et al. (2006)
Various rivers in Eastern Cape, South Africa	2002	n.d.–305	n.a.	n.a.	Awofolu and Fatoki (2003)
Haihe River, China	2003	0.3–80	n.a.	n.a.	Yang et al. (2005)
Lake Ørnsjøen, Norway	–	1343000	n.a.	n.a.	Eggen and Májcherzyk (2006)
Beijing Guanting reservoir, China	2003–2004	3.25–17.3	n.a.	n.a.	Xue et al. (2006)
Lake Dongting, China	2004	n.d.–10.1	n.a.	n.a.	Qian et al. (2006)
Qiantang river, China	2005	6.1–95.8	Saury, mollet, white fish, perch, carp, gurnet, bulltrout	2.6–133.5	Zhou et al. (2007)
Cinca River, upstream Monzón	2002	9.0–10.5	Bleak, barbel	n.d.–64	This study
Cinca River, downstream Monzón	–	21.3–94	–	40–2098	–

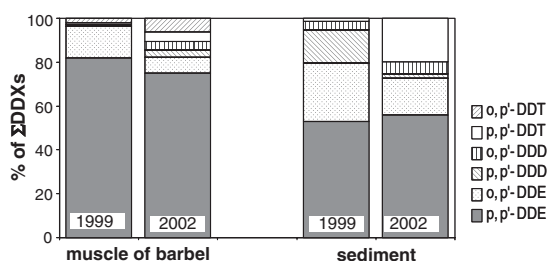


Fig. 4. Percentage of the different compounds in muscle of barbel and sediment in site 3. Comparison between 2002 and 1999.

is the presence in these environments of *p,p'*-Cl-DDT, an intermediate in the synthesis of dicofol from DDT (Qiu et al., 2005). This compound has been proved to convert to *p,p'*-DDE because of high temperatures used in GC analysis, resulting in an overestimation of DDE in the samples (Risebrough et al., 1986). Thus, for determining the real contribution of the historic pollution an extra analysis for *p,p'*-Cl-DDT would have been necessary, as our determined quantity of *p,p'*-DDE could include actually the *p,p'*-Cl-DDT possibly present in this environment. Qiu et al. (2005) have proposed the *o,p'*-DDT/*p,p'*-DDT ratio as indicator of what they call “dicofol-type DDT pollution”. This ratio is expected to be higher in regions with dicofol-type DDT, as it is much higher in technical dicofol (from 1.3 to 9.3; Dimuccio et al., 1988; Gillespie et al., 1994; Qiu et al., 2005) than in technical DDT (≤ 0.3 ; Metcalf, 1955; Redner, 1971; Anderson et al., 1982). Furthermore, *o,p'*-DDT degrades more easily than *p,p'*-DDT in the environment (Macgregor, 1976; Martijn et al., 1993). This makes unlikely that a high *o,p'*-DDT/*p,p'*-DDT ratio arises from only technical DDT pollution but would be indicative of dicofol-type pollution. High ratios of *o,p'*-DDXs/*p,p'*-DDXs were found also near a dicofol producing factory in Yongdin River in China (Tao et al., 2007). However, this is a one-way rule, so that a low ratio does not indicate technical DDT pollution necessarily. Our sediment samples, whose ratio was low, did not reflect a clear

dicofol pollution. *o,p'*-DDT was below the detection limit, so that the value for *o,p'*-DDT/*p,p'*-DDT ratio is in the range that could result from technical DDT pollution (but it also could come from a dicofol-type pollution). The data reported in 1999 did not give a (high) ratio that would suggest an unequivocal contamination by dicofol either in that year. This could be explained by the age of the source, as *o,p'*-DDT degrades more readily than *p,p'*-DDT, so that the pollution by DDT in the area would be chronic or historic rather than recent. On the other hand, neither of these relationships has changed meaningfully from the reported in 1999 so that we could infer a difference of inputs to the river between those dates.

In all fish samples in site 3, the *o,p'*-DDT/*p,p'*-DDT ratio is higher than that of technical DDT. However, when talking about accumulation in living beings, other factors than above have to be taken in account. Thus, such ratios could be due to *p,p'*-DDT faster metabolism in fish (Konwick et al., 2006) or to *o,p'*-DDT higher bioaccumulation factor compared to *p,p'*-DDT. Little attention has been put on *o,p'*-DDT in the literature and bioaccumulation factor for this isomer is not available.

The isomer's distribution in sediment obtained here shows a predominance of *p,p'*-DDE compared with other locations of the Ebro basin reported for fish and sediment (Lacorte et al., 2006) and also water (Gomez-Gutierrez et al., 2006). In these other sampling sites *p,p'*-DDT is the predominant analogue in front of *p,p'*-DDE. This could indicate a different source of the DDXs contamination in this location of the basin.

3.4. Biota-sediment accumulation factors

Biota-sediment accumulation factors (BSAF) give an idea of the bioaccumulation potential of pollutants in living organisms. This factor is defined as the ratio between the lipid-normalized concentration in the organism and the organic carbon-normalized concentration in the sediment, as non-polar organic pollutants are assumed to distribute between the carbon pools of biotic tissue lipids and the sediment organic carbon. Usually this factor is calculated for organisms that live in contact with the sediment, for which a direct partitioning occurs between sediment and organism. This is the case of *B. graellsii*, whose diet is dominated by zoobenthos and benthic algae (Doadrio et al., 1991). However, as stated above, only for four bleaks of site 3 the fat content could be calculated here. Bleak, *A. alburnus*, is a pelagic zooplanktivore specie (Pehlivanov, 2000). Anyway, BSAF can be calculated for these four samples in order to measure of its bioaccumulation/biomagnifications potential for DDXs.

The BSAF yielded for them ranged from not available for *o,p'*-DDT (because this compound could not be detected in sediment) to 2.63 in the following order: *p,p'*-DDT (0.10 ± 0.06) < *o,p'*-DDD (0.24 ± 0.06) < *p,p'*-DDD (0.90 ± 0.24) < *o,p'*-DDE (1.41 ± 0.05) < *p,p'*-DDE (2.63 ± 0.46). In brackets is shown the average \pm standard deviation.

Table 3
Ratios between isomers and metabolites

	Site 3		Site 4	
	2002	1999*	2002	1999*
<i>o,p'</i> -DDT/ <i>p,p'</i> -DDT				
Muscle of barbel	1.56	3.02	1.13	0.76
Liver of barbel	0.69	5.52	0.14	0.30
Bleak	2.65	1.92	0.80	10.58
Sediment	≤ 0.11	≤ 0.07	≤ 0.26	–
<i>p,p'</i> -DDT/(<i>p,p'</i> -DDE + <i>p,p'</i> -DDD)				
Muscle of barbel	0.08	0.00	0.13	0.01
Liver of barbel	0.05	0.00	0.23	0.01
Bleak	0.02	0.01	0.05	0.00
Sediment	0.34	0.03	0.71	–

* Calculated upon data Interlab, 1999.

To our knowledge, there is no data of BSAFs of DDXs for fish available in the literature. Our data are not far (nor the absolute values neither the profile for the six analogues) from the data reported by Boese et al., (1997) for a marine deposit-feeding clam (0.02–1.83). The BSAF here calculated for p,p'-DDE is only a bit lower than the data reported by Ozkoc et al. (2007) for DDXs (2.9). The BSAFs were calculated for the same fishes for brominated compounds elsewhere (Eljarrat et al., 2005). Comparison with the values obtained there shows that DDXs have BSAFs in the order of those of hexabromocyclododecane, but are one or two orders of magnitude lower than the BSAFs calculated for some polybrominated diphenyl ethers (12.4–200.8).

4. Conclusions

In summary, DDT pollution was detected in the sampling sites downstream a factory manufacturing dicofol in Cinca River in a much higher quantity than upstream. The isomer and metabolites' distribution obtained there does not reflect the typical one for areas with dicofol-type DDT pollution, as this is. This could be explained by an historic or chronic source of the contamination. Although levels of these contaminants downstream the factory have dropped generally since a previous study in 1999, their magnitude – still 10 (sediments) or about 100 (fish) times higher than background ones – makes necessary their regular checking in the area.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Confederación Hidrográfica del Ebro (Asistencia Técnica para la Actualización de la situación piscícola en el Río Cinca), the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (Acción Complementaria CTM2005-25168E and CEMAGUA (CGL2007-64551/HID)) by the European Union (AQUA-TERRA, Project No. 505428). This work reflects only the author's views and the European Community is not liable for any use that may be made of the information contained therein. Agustina de la Cal acknowledges grant from Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya (2003FI 00092). R. Chaler and D. Fanjul are thanked for assistance with the MS work.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.chemosphere.2007.08.036.

References

- Anderson, D.W., Castle, W.T., Woods, L.A., Ayres, L.A., 1982. Residues of *ortho,para*'-DDT in Southern-California coastal sediments in 1971. *B. Environ. Contam. Toxicol.* 29, 429–433.
- Awofolu, R.O., Fatoki, O.S., 2003. Persistent organochlorine pesticide residues in freshwater systems and sediments from the Eastern Cape, South Africa. *Water SA* 29, 323–330.
- Binelli, A., Proveni, A., 2003. DDT is still a problem in developed countries: the heavy pollution of Lake Maggiore. *Chemosphere* 52, 717–723.
- Boese, B.L., Lee, H., Echols, S., 1997. Evaluation of a first-order model for the prediction of the bioaccumulation of PCBs and DDT from sediment into the marine deposit-feeding clam *Macomanasuta*. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1545–1553.
- Bordajandi, L.R., Gomez, G., Fernandez, M.A., Abad, E., Rivera, J., Gonzalez, M.J., 2003. Study on PCBs, PCDD/Fs, organochlorine pesticides, heavy metals and arsenic content in freshwater fish species from the River Turia (Spain). *Chemosphere* 53, 163–171.
- CCME, 2003. Canadian Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life. Canadian Council of Minister of the Environment, Winnipeg, MB, Canada.
- Covaci, A., Gheorghe, A., Hulea, O., Schepens, P., 2006. Levels and distribution of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in sediments and biota from the Danube Delta, Romania. *Environ. Pollut.* 140, 136–149.
- D'Amato, C., Torres, J.P.M., Malm, O., 2002. DDT (dichlorodiphenyl-trichloroethane): toxicity and environmental contamination – a review. *Quim. Nova* 25, 995–1002.
- De la Cal, A., Eljarrat, E., Barceló, D., 2003. Determination of 39 polybrominated diphenyl ether congeners in sediment samples using fast selective pressurized liquid extraction and purification. *J. Chromatogr. A* 1021, 165–173.
- Dimuccio, A., Camoni, I., Citti, P., Pontecorvo, D., 1988. Survey of DDT-like compounds in dicofol formulations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 16, 129–132.
- Doadrio, I., Elvira, B., Bernat, Y., 1991. Peces continentales españoles. Colección Técnica. ICONA-CSIC, Madrid.
- Eggen, T., Majcherczyk, A., 2006. Effects of zero-valent iron (Fe-0) and temperature on the transformation of DDT and its metabolites in lake sediment. *Chemosphere* 62, 1116–1125.
- Eljarrat, E., de la Cal, A., Raldua, D., Duran, C., Barcelo, D., 2005. Brominated flame retardants in *Alburnus alburnus* from Cinca River Basin (Spain). *Environ. Pollut.* 133, 501–508.
- Erdogru, O., Covaci, A., Schepens, P., 2005. Levels of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in fish species from Kahramanmaraş, Turkey. *Environ. Int.* 31, 703–711.
- FAO/WHO, 1986. Maximum Limits for Pesticide Residues, vol. XIII, second ed. Codex Alimentarius, Rome.
- FDA/CFSAN, 2001. Fish and Fisheries Products Hazards and Controls Guidance, third ed.
- Gillespie, M.J., Lythgo, C.M., Plumb, A.D., Wilkins, J.P.G., 1994. A survey comparing the chemical-composition of dicofol formulations sold in the UK before and after the introduction of the EC Prohibition Directive-79/117/EEC. *Pest. Sci.* 42, 305–314.
- Gomez-Ariza, J.L., Bujalance, M., Giraldez, I., Velasco, A., Morales, E., 2002. Determination of polychlorinated biphenyls in biota samples using simultaneous pressurized liquid extraction and purification. *J. Chromatogr. A* 946, 209–219.
- Gomez-Gutierrez, A.I., Jover, E., Bodineau, L., Albanies, J., Bayona, J.M., 2006. Organic contaminant loads into the Western Mediterranean Sea: Estimate of Ebro river inputs. *Chemosphere* 65, 224–236.
- Hinck, J.E., Schmitt, C.J., Echols, K.R., May, T.W., Orazio, C.E., Tillitt, D.E., 2006. Environmental contaminants in fish and their associated risk to piscivorous wildlife in the Yukon River Basin, Alaska. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 661–672.
- Interlab, 1999. Estudio de la situación piscícola en el río Cinca a su paso por la localidad de Monzón (Huesca), Ministerio de Medio Ambiente. Confederación Hidrográfica del Ebro.
- Jarvinen, A.W., Ankley, G.T., 1999. Linkage of effects to tissue residues: development of a comprehensive database for aquatic organisms

- exposed to inorganic and organic chemicals. Society of Environmental Toxicology & Chemistry, Pensacola, FL.
- Konwick, B.J., Garrison, A.W., Black, M.C., Avants, J.K., Fisk, A.T., 2006. Bioaccumulation, biotransformation, and metabolite formation of fipronil and chiral legacy pesticides in rainbow trout. *Environ. Sci. Technol.* 40, 2930–2936.
- Lacorte, S., Raldua, D., Martinez, E., Navarro, A., Diez, S., Bayona, J.M., Barcelo, D., 2006. Pilot survey of a broad range of priority pollutants in sediment and fish from the Ebro river basin (NE Spain). *Environ. Pollut.* 140, 471–482.
- Larsson, P., Hamrin, S., Okla, L., 1991. Factors determining the uptake of persistent pollutants in an eel population (*Anguilla Anguilla* L.). *Environ. Pollut.* 69, 39–50.
- Macgregor, J.S., 1976. DDT and its metabolites in sediments off Southern-California. *Fish. B. – NOAA* 74, 27–35.
- Madenjian, C.P., Carpenter, S.R., Rand, P.S., 1994. Why are the PCB concentrations of Salmonine individuals from the same lake so highly variable. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51, 800–807.
- Martijn, A., Bakker, H., Schreuder, R.H., 1993. Soil persistence of DDT, dieldrin, and lindane over a long-period. *B. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 178–184.
- Metcalf, R.L., 1955. *Organic Insecticides. Their Chemistry and Mode of Action.* Interscience, New York.
- Metcalf, R.L., 1973. Century of DDT. *J. Agr. Food Chem.* 21, 511–519.
- O'Toole, S., Metcalfe, C., Craine, I., Gross, M., 2006. Release of persistent organic contaminants from carcasses of Lake Ontario Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Environ. Pollut.* 140, 102–113.
- Ozkoc, H.B., Bakan, G., Ariman, S., 2007. Distribution and bioaccumulation of organochlorine pesticides along the Black Sea coast. *Environ. Geochem. Health* 29, 59–68.
- Pehlivanov, L., 2000. Water outflow as a cause of changes in trophic conditions for zooplanktivorous fish in reservoirs. *Fisheries Manag. Ecol.* 7, 115–125.
- Qian, Y., Zheng, M.H., Zhang, B., Gao, L.R., Liu, W.B., 2006. Determination and assessment of HCHs and DDTs residues in sediments from Lake Dongting, China. *Environ. Monit. Assess.* 116, 157–167.
- Qiu, X.H., Zhu, T., Yao, B., Hu, J.X., Hu, S.W., 2005. Contribution of dicofol to the current DDT pollution in China. *Environ. Sci. Technol.* 39, 4385–4390.
- Rasenberg, M., van de Plassche, E.J., 2002. Information dossier on DDT used for the production of Dicofol. Ministerie van VROM. Final Report.
- Redner, J.A., 1971. Chlorinated hydrocarbons: Progress Report. County Sanitation Districts of Los Angeles County, 2020 Beverly Boulevard, Los Angeles, CA.
- Risebrough, R.W., Jarman, W.M., Springer, A.M., Walker, W., Hunt, W.G., 1986. A metabolic derivation of DDE from Kelthane. *Environ. Toxicol. Chem.* 5, 13–19.
- Ryan, M.J., Stern, G.A., Diamond, M., Croft, M.V., Roach, P., Kidd, K., 2005. Temporal trends of organochlorine contaminants in burbot and lake trout from three selected Yukon lakes. *Sci. Total Environ.* 351, 501–522.
- Sankar, T.V., Zynudheen, A.A., Anandan, R., Fair, P.G.V., 2006. Distribution of organochlorine pesticides and heavy metal residues in fish and shellfish from Calicut region, Kerala, India. *Chemosphere* 65, 583–590.
- Sapozhnikova, Y., Bawardi, O., Schlenk, D., 2004. Pesticides and PCBs in sediments and fish from the Salton Sea, California, USA. *Chemosphere* 55, 797–809.
- Sapozhnikova, Y., Zubcov, E., Zubcov, N., Schlenk, D., 2005a. Occurrence of pesticides, polychlorinated biphenyls (PCBs), and heavy metals in sediments from the Dniester River, Moldova. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 49, 439–448.
- Sapozhnikova, Y., Zubcov, N., Hungerford, S., Roy, L.A., Boicenco, N., Zubcov, E., Schlenk, D., 2005b. Evaluation of pesticides and metals in fish of the Dniester River, Moldova. *Chemosphere* 60, 196–205.
- Sethajintanin, D., Johnson, E.R., Loper, B.R., Anderson, K.A., 2004. Bioaccumulation profiles of chemical contaminants in fish from the lower Willamette River, Portland Harbor, Oregon. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 114–123.
- Svobodova, Z., Zlabek, V., Randak, T., Machova, J., Kolarova, J., Hajslova, J., Suchan, P., 2003. Profiles of persistent organochlorine pollutants (POPs) in tissues of marketable common carp and in bottom sediments of selected ponds of South and West Bohemia. *Acta Vet. BRNO* 72, 295–309.
- Tao, S., Li, B.G., He, X.C., Liu, W.X., Shi, Z., 2007. Spatial and temporal variations and possible sources of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and its metabolites in rivers in Tianjin, China. *Chemosphere* 68, 10–16.
- van de Plassche, E.J., Schwegler, A.M.G.R., Rasenberg, M., Schouten, G., 2002. DDT in Dicofol. Further Assessment of Persistent Organic Pollutants (POPs). Compendium of Substance-Related Information. Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution. UNECE.
- Vives, I., Grimalt, J.O., Ventura, M., Catalan, J., Rosseland, B.O., 2005. Age dependence of the accumulation of organochlorine pollutants in brown trout (*Salmo trutta*) from a remote high mountain lake (Redo, Pyrenees). *Environ. Pollut.* 133, 343–350.
- Wan, M.T., Kuo, J.N., McPherson, B., Pasternak, J., 2006. Agricultural pesticide residues in farm ditches of the Lower Fraser Valley, British Columbia, Canada. *J. Environ. Sci. Health, Part B* 41, 647–669.
- WHO/ICPS, 1979. *Environmental Health Criteria 9: DDT and its Derivatives.* World Health Organization, Geneva.
- Xue, N.D., Zhang, D., Xu, X.B., 2006. Organochlorinated pesticide multiresidues in surface sediments from Beijing Guanting reservoir. *Water Res.* 40, 183–194.
- Yang, R.Q., Lv, A.H., Shi, J.B., Jiang, G.B., 2005. The levels and distribution of organochlorine pesticides (OCPs) in sediments from the Haihe River, China. *Chemosphere* 61, 347–354.
- Zhang, Z.L., Hong, H.S., Zhou, J.L., Huang, J., Yu, G., 2003. Fate and assessment of persistent organic pollutants in water and sediment from Minjiang River Estuary, Southeast China. *Chemosphere* 52, 1423–1430.
- Zhou, R.B., Zhu, L.Z., Kong, Q.X., 2007. Persistent chlorinated pesticides in fish species from Qiantang river in east China. *Chemosphere* 68, 838–847.

■ 2.7. Discusión de resultados

2.7.1. Bondad de la metodología

El resultado más importante del trabajo dedicado a la determinación “convencional” de POP en el medio acuático, detallado en los artículos precedentes, fue el desarrollo de una metodología que permitió el análisis de 40 congéneres de PBDE de diferente grado de bromación (desde mono- hasta decaBDE) en muestras ambientales con una técnica novedosa, como era la SPLE en ese momento. Los artículos #1 y #2 se encuentran entre las primeras publicaciones sobre esta técnica y, en concreto, son las primeras publicaciones en la que es aplicada a la extracción de PBDE de matrices sólidas. Este método no solo respondía a la necesidad que había en aquel momento de disponer de protocolos analíticos para el mayor número de congéneres posible, que permitiesen el estudio del comportamiento ambiental de estos compuestos, sino que lo hacía de manera rápida, eficiente y con un consumo pequeño de disolvente.

Además, la metodología desarrollada pudo ser aplicada al análisis de otro retardante de llama: el HBCD, cuya producción y uso era cada vez mayor, en parte como consecuencia de la intención de cesar el uso de los PBDE (De Wit, 2002). Aunque ya había algún indicio de que era capaz de bioacumularse (Sellström *et al.*, 1998; Sellström *et al.*, 2003) y de una tendencia creciente en el ambiente (Kierkegaard *et al.*, 1999), apenas existían datos de concentraciones en el ambiente para este compuesto. De hecho, el artículo #3 es el segundo trabajo que muestra la acumulación de HBCD en organismos vivos, y el primero en que es cuantificado en hígado de peces. Por otra parte, las condiciones optimizadas para PBDE también demostraron ser adecuadas para la determinación de los niveles de otros POP, como son el DDT y sus metabolitos. La SPLE, que se había aplicado a su análisis en suelos (Hubert *et al.*, 2000; Concha-Graña *et al.*, 2004; Hussien *et al.*, 2007) pero no en sedimentos ni biota, permitió reducir el tiempo de preparación de muestra y el consumo de disolvente frente a otros métodos consolidados para la extracción de estos compuestos a partir de muestras sólidas, sin perder por ello eficiencia y precisión.

La Tabla 11 recoge las recuperaciones, reproducibilidades y LOD medios alcanzados en cada una de las matrices estudiadas. Uno de los primeros inconvenientes encontrados durante el desarrollo del método fue la pérdida de los congéneres más volátiles (mono- y diBDE). Aunque reproducibles, las recuperaciones de estos compuestos fueron de entre 22 y 41% en sedimento en el Art #1. En trabajos posteriores al artículo #1 se consiguieron recuperaciones algo mejores aplicando condiciones de secado más suaves, por encima del 53% (Artículo #3). La pérdida de estos congéneres es habitual (Christensen *et al.*, 2005), aunque, a pesar de la mayor disponibilidad actual de patrones, estos compuestos no son incluidos habitualmente en los métodos de análisis de muestras ambientales, que suelen limitarse a los congéneres mayoritarios, y apenas se han desarrollado métodos para ellos, excepto cuando se hacen estudios de degradación.

No obstante, probablemente la mayor dificultad a abordar fue el análisis del BDE-209 (Artículo #2), tanto en el análisis GC-MS, que hubo de realizarse por separado en condiciones especiales, como en la preparación de muestra, ya que condicionó la optimización del método, al no poder ser eluido del florisil. La problemática que implica el análisis de este compuesto se ha puesto de manifiesto en muchos estudios de laboratorio, donde aún en la actualidad la variabilidad en sus resultados suele ser mayor que la de otros congéneres de PBDE y otros grupos de compuestos (De Boer & Wells, 2006; Stapleton *et al.*, 2007; Alcock *et al.*, 2011). La extracción

exhaustiva del BDE-209, de hidrofobicidad muy alta y que tiende a estar fuertemente unido a la muestra, es en general más difícil que la de los análogos menos bromados, por lo que se necesitan tiempos de extracción más largos (De Boer *et al.*, 2001) o energías mayores (Stapleton *et al.*, 2007). Por otra parte, el uso de altas temperaturas, especialmente en el puerto de inyección y en la columna cromatográfica, puede provocar su degradación y la formación de congéneres de menor grado de bromación, lo que puede llevar a interpretaciones erróneas (Björklund *et al.*, 2004; Dirtu *et al.*, 2008); Blanco & Vieites, 2010). Además se ha de tener en cuenta su degradación en presencia de un donador de hidrógeno orgánico o en presencia de luz UV (Söderström *et al.*, 2004; Stapleton & Dodder, 2008; Christiansson *et al.*, 2009), y su tendencia a adsorberse al material de vidrio utilizado durante el análisis debido a su baja solubilidad en la mayoría de los disolventes orgánicos (Covaci *et al.*, 2003; De Boer & Wells, 2006).

El uso de un patrón de recuperación que resuelva estos inconvenientes es especialmente importante en el análisis de BDE-209. En nuestro caso, sin embargo, no pudo aplicarse, ya que se vio que el patrón interno de que disponíamos (PCB-209) no era adecuado para la corrección de la variabilidad del análisis, antes bien, su inclusión en los cálculos empeoraba considerablemente la reproducibilidad del método. A pesar de ello, con el método aquí desarrollado se consiguió analizar este compuesto de una manera rápida y simple con unas recuperaciones superiores al 70% y variabilidad menor del 30% (Tabla 11). En estas condiciones, no pudo detectarse degradación del BDE-209, que fue monitorizada con inyecciones del patrón puro intercaladas en las secuencias. Posteriormente a estas publicaciones, se incluyó el ¹³C-BDE-209 como patrón interno monitorizando la masa 487 (Eljarrat *et al.*, 2007), lo que mejoró la fiabilidad de este análisis.

Tabla 11. Resumen de los parámetros de calidad medios obtenidos con la metodología optimizada.

Compuesto	REC (%)		RSD (%)		LOD (sed-PBDE : pg/g dw) (peces: pg/g ww)	
	Sedimento	Peces	Sedimento	Peces	Sedimento	Peces
Mono- a heptaBDE	53-84	52-103	1-14	1-13	6-50	2-19
BDE-209	82	71	19	27	75	196
HBCD	83	88	21	23	465	570
DDX	73-102	56-123	8-15	2-23	12-54	9-204

2.7.2. Evolución de la SPLE

La inclusión de adsorbentes en la celda, con la consiguiente eliminación de los pasos de purificación post-extracción, supone un paso más allá en la tendencia a utilizar técnicas que reduzcan la duración del análisis, la manipulación de la muestra y el uso de disolventes y residuos, de la que la PLE es líder ya de por sí (Sun-2012). El método desarrollado, que fue optimizado inicialmente para muestras de sedimentos, fue capaz de generar extractos limpios listos para el análisis instrumental de PBDE y de DDX en tan solo 20-30 minutos. Además, demostró ser eficiente en el análisis de peces, tanto en muestras de músculo e hígado como en pez entero (Artículo #3 / Artículo #4 / (Eljarrat *et al.*, 2005b), artículo no incluido en la memoria) (Tabla 11). A pesar de

ser muestras más complejas que los sedimentos, en los peces de este estudio la purificación con alúmina dentro de la celda fue suficiente para obtener cromatogramas libres de interferencias, permitiendo una identificación fiable de los compuestos. No obstante, en estudios posteriores se encontró que en algunos casos la purificación simultánea con alúmina no era suficiente y fue necesaria una etapa de purificación adicional, como en el caso del análisis de madrillas, en el que se hizo una digestión ácida del extracto de la PLE (Guerra *et al.*, 2009; Santín *et al.*, 2013).

En los últimos años varios trabajos han puesto de manifiesto las bondades de la sílice impregnada con ácido sulfúrico en la purificación de los extractos biológicos, cuando los analitos que se quieren extraer son resistentes al ácido, como es el caso de los PBDE y DDT. Esta técnica asocia la alta eficacia del lavado con ácido para retirar la materia grasa y orgánica mientras que evita los problemas de separación de fases y el largo tiempo que requiere la extracción LL que hay que hacer después de un ataque ácido. Algunos autores han incluido la sílice acidificada en la celda, como SPLE (Björklund *et al.*, 2001; Westbom *et al.*, 2008b; Zhang *et al.*, 2011b). La aplicación de este adsorbente a la SPLE estaba limitada anteriormente porque los equipos comerciales de PLE no estaban preparados para el uso de ácidos fuertes, mientras que los modelos más actuales ya contemplan esta posibilidad. En cualquier caso, este protocolo no es adecuado en métodos multi-residuo, ya que muchos compuestos orgánicos, incluyendo algunos contaminantes de interés, son degradados por el ácido, como es el caso del aldrín o el endosulfan (USEPA, 1996c).

Losada *et al.* (2009) hicieron un trabajo extensivo de optimización de la SPLE para mono- a hexa-BDE en peces, en el que encontraron que el mejor adsorbente para retener la grasa es el Florisil (eluyendo con hexano:diclorometano 95:5 v/v), lo que aporta una menor variabilidad frente a la alúmina o la sílice acidificada (Losada *et al.*, 2010a). Otros autores también se han decantado por este adsorbente. Ghosh *et al.* (2011), que analizaban conjuntamente de tri- a hepta-BDE, PCB y pesticidas organoclorados en peces hicieron un estudio exhaustivo de la grasa retenida por el Florisil, llegando a la conclusión de que una mezcla 75:25 (v/v) de n-hexano:diclorometano proporcionaba los mejores resultados. En nuestros estudios, el florisil fue descartado frente a la alúmina en las pruebas de optimización del método porque en las condiciones probadas (eluyendo con hexano:diclorometano, 1:1) el BDE-209 quedaba retenido completamente (Artículo #2). No obstante, en otras investigaciones en que se ha utilizado Florisil como parte de la etapa de purificación de extractos de matrices biológicas para el análisis de BDE-209 (casi siempre tras GPC) no parece haberse encontrado este problema (Christensen *et al.*, 2005; Verreault *et al.*, 2005; Law *et al.*, 2006a; Li *et al.*, 2011).

Además de los que se acaban de mencionar, otros estudios posteriores a los nuestros han demostrado el potencial de combinar la purificación con adsorbentes (ya sea como SPE o MSPD) con la PLE, en general para la determinación de contaminantes en matrices complejas, tales como suelos, sedimentos o muestras biológicas con contenido graso. Pocos de estos métodos, sin embargo, se han testado para el análisis simultáneo de distintas clases de contaminantes prioritarios (Trumble *et al.*, 2012; Robinson *et al.*, 2013). En las muestras más complejas, algunos autores apuntan la necesidad de realizar una purificación adicional, como en el trabajo de Ghosh, que no pudieron analizar el DDT debido a interferencias presentes en los extractos (Ghosh *et al.*, 2011). Al margen de la SPLE, y muchas veces como complemento a ella, la GPC se ha convertido en el método de elección para la purificación de extractos debido a su alta capacidad, automatización y simplicidad de operación.

Otros autores hacen multicapas que combinan el potencial para retener interferencias de distintos tipos de adsorbentes (Subedi et al., 2012). También se han hecho algunos intentos de SPLE secuencial, en que la selectividad es mejorada eluyendo distintas clases de contaminantes de manera separada (Ruiz-Matute *et al.*, 2008; Subedi et al., 2014), e incluso modular (Do *et al.*, 2013) así como de mejorar la eliminación de interferencias incorporando una etapa de lavado dentro de la celda antes de la PLE de los compuestos diana (Onofrejová *et al.*, 2010). Otra tendencia en preparación de muestras como es la miniaturización es sólo posible a día de hoy con instrumentos de fabricación casera (Ruiz-Matute *et al.*, 2008; Alañón *et al.*, 2009).

Tabla 12. Métodos de SPLE descritos en la literatura científica internacional en orden cronológico.

Contaminantes	Matriz	Adsorbentes	Eluyente	Purificación adicional	Referencia
PCB	peces	alúmina	-	-	(Ezzell, 1996)
PCB	peces	alúmina ácida	hexano	no	(Thermo, 1996)
Musks policíclicos	peces	alúmina	acetato de etilo - hexano (1:5)	no	(Draisci et al., 1998)
Clorobenzenos HCH DDX PCB PAH	agujas de pino musgos	Florisil + alúmina (2:1)	hexano	Florisil	(Wenzel et al., 1998)
Clorobenzenos HCH DDX PCB PAH	suelos	Florisil + alúmina (2:1)	tolueno	Florisil	(Hubert et al., 2000)
PCB	peces	sílice ácida	hexano	no	(Björklund et al., 2001)
PCB	alimentos piensos	sílice ácida + sílice neutra	hexano	no	(Müller et al., 2001)
PCB	peces bivalvos huevas	Florisil	pentano - diclorometano (85:15)	no	(Gómez-Ariza et al., 2002)
PBDE DDX	sedimentos peces	alúmina	hexano - diclorometano	no	Este trabajo
OCP	suelos	sílice	hexano - acetona (1:1)	no	(Concha-Graña et al., 2004)
PCDD/F PCB	piensos	sílice ácida	-	-	(Bernsmann et al., 2004)
PCB	alimentos piensos	sílice ácida	heptano	no	(Sporring & Björklund, 2004)
PCB PCDD/F	alimentos piensos peces aceite de pescado suelos	Carbon activado + Celita	1) heptano para PCB 2) heptano - acetona + tolueno (giro de celda) para no-ortoPCB y PCDD/F	multicapa	(Sporring et al., 2003) (Nording et al., 2005) (Nording et al., 2006) (Haglund et al., 2007)
PAH y derivados oxigenados	suelos	sílice	1) ciclohexano - diclorometano (9:1) para los PAH 2) ciclohexano - diclorometano (1:3) para los derivados oxigenados	no	(Lundstedt et al., 2006)

Tabla 12. (Continuación)

Contaminantes	Matriz	Adsorbentes	Eluyente	Purificación adicional	Referencia
PCB	alimentos piensos	sílice ácida	heptano	no	(Sporring et al., 2006)
OCP	suelos	Florisil	heptano – acetona (1:1)	no	(Hussen et al., 2007)
PCB	alimentos	sílice ácida + sílice neutra	hexano	no	(Ramos et al., 2007a)
PCDD/F PCB	alimentos piensos	sílice ácida	heptano	multicapa	(Wiberg et al., 2007)
PCB y metabolitos	biota	Florisil	hexano – diclorometano – metanol (48:43:9)	no	(Kania-Korwel et al., 2008)
PCB	sedimentos	sílice ácida	heptano – diclorometano (9:1)	no	(Westbom et al., 2008b)
OCP	suelos	Florisil	heptano – acetona (1:1)	no	(Westbom et al., 2008a)
dioxinas	sedimentos suelos	alúmina + sílice-AgNO ₃ + sílice ácida	diclorometano	no	(Chuang et al., 2009)
PBDE	peces	Florisil	hexano – diclorometano (9:1)	no	(Losada et al., 2009)
PBDE	Peces huevos	alúmina ácida	hexano – diclorometano (1:1)	GPC	(Liu et al., 2009b) (Liu et al., 2010)
PBDE MeO-PBDE	peces crustáceos bivalvos	Florisil	hexano – diclorometano (9:1)	sílice ácida	(Losada et al., 2010b) (Losada et al., 2010a)
PBDE	polvo de interiores	Florisil	hexano – diclorometano (1:1)	no	(Martínez et al., 2010)
PAH	fangos residuales	KOH + Florisil + sílice (1:2)	hexano	no	(Pena et al., 2010)
Filtros UV y productos de degradación	sedimentos	alúmina	methanol + metanol-agua (1:1)	no	(Gago-Ferrero et al., 2011)
OCP PCB PBDE	peces	Florisil	hexano – diclorometano (75:25)	no	(Ghosh et al., 2011)
PBB	peces	sílice ácida	hexano	no	(Malavia et al., 2011)
Bisfenol A alquilfenoles	fangos residuales	Florisil	diclorometano	no	(Martínez-Moral and Tena, 2011)
PPCP Fármacos	peces	sílice	diclorometano – acetato de etilo (1:1)	GPC	(Subedi et al., 2011)
Estrogénos Bisfenol A	suelos	sílice	diclorometano – acetona (3:1)	no	(Zhang et al., 2011c)
PBDE PCB	hígado de oveja	sílice ácida	hexano – diclorometano (9:1)	no	(Zhang et al., 2011b)
Pesticidas	hierbas	Florisil + carbon grafitado (5:100)	acetato de etilo	no	(Du et al., 2012)
OCP PCB	agujas de pino	Florisil	hexano – diclorometano (75: 25)	no	(Lavin and Hageman, 2012)
PBDE	peces	sílice	hexano – diclorometano (1:9)	no	(Liguori et al., 2012)
Toltrazuril y metabolitos	suelos estiercol	sílice + grafito + alúmina	heptano + acetona – metanol (1:1) + ácido acético al 2% en metanol	no	(Olsen et al., 2012)

Tabla 12. (Continuación)

Contaminantes	Matriz	Adsorbentes	Eluyente	Purificación adicional	Referencia
Alquilfenoles Bisfenol A	moluscos	C18 + alúmina neutra	metanol	no	(Salgueiro-González et al., 2012)
PCDD/F PCB	peces crustáceos bivalvos	alúmina básica + Florisil + sílice + celita + carbon grafitado (20:20:10:10:1)	1) hexano – diclorometano (1:1) para los PCB 2) tolueno para los PCDD/F	no	(Subedi and Usenko, 2012) (Subedi et al., 2014)
OCP PCB PBDE	músculo y grasa de focas	sílice	diclorometano	GPC	(Trumble et al., 2012)
Piretroides	polvo de interiores	sílice ácida + sílice (1:10)	diclorometano	no	(Van Emon and Chuang, 2012)
PAH	suelos	alúmina + sílice (3:2)	hexano – diclorometano (1:1)	no	(Zhang et al., 2012)
PCB PBDE HBCD	polvo de interiores suelos sedimentos	sílice ácida + Florisil (10:5) + cobre	hexano – diclorometano (3:2)	no	(Abdallah et al., 2013)
PCDD/F	suelos sedimentos	sílice ácida + sílice activada + sílice básica (5:2:2:5)	heptano – diclorometano (1:1)	no	(Do et al., 2013)
PCB PBDE	piensos	sílice ácida + sílice neutra	hexano – diclorometano	no	(Pena-Abaurrea et al., 2013)
Pesticidas PCB PBDE	cerumen de ballena	alúmina básica + sílice + Florisil® (5:15:10)	hexano – diclorometano (1:1)	no	(Robinson et al., 2013)
PCB	suelos sedimentos	alúmina + sílice-AgNO ₃ + sílice ácida (3:1:6)	diclorometano	no	(Van Emon et al., 2013)
PCDD/F PCB	sedimentos	Cobre + Florisil + alúmina + sílice	tolueno	no	(Aguilar et al., 2014)
PAH	sedimentos marinos	cobre + sílice (5:5)	hexano – diclorometano (4:1)	no	(Choi et al., 2014)
PCB PBDE	plantas	Florisil + carbon grafitado	hexano – acetato de etilo (8:2)	no	(Perez et al., 2014)
Pesticidas prioritarios de la WFD	algas marinas	Florisil	hexano	no	(Pinto et al., 2014)

2.7.3. Evolución del análisis de PBDE y HBCD

El análisis de PBDE y HBCD, novedoso en el momento en que se realizaron estos trabajos, ha ido evolucionando desde entonces hasta día de hoy, en que ya existen métodos estandarizados (USEPA, 2010). Una revisión mediante el motor de búsqueda Scopus, permite ver que el número de artículos científicos publicados anualmente sobre estos compuestos (en distintas disciplinas) se ha triplicado en los últimos ocho años. No obstante, el número de citaciones de los artículos aquí presentados, aún en los últimos años, refleja la vigencia de nuestros resultados.

La mayor evolución, ha tenido lugar en el ámbito del análisis instrumental, con la incorporación cada vez mayor en los laboratorios de técnicas como la GC y la HRMS o la MS-MS, que posibilitan la separación de coeluciones, como se ha comentado en el Capítulo 1 (1.4.6). En nuestro caso, el carácter multirresiduo del método de extracción, eficiente en cuanto a la capacidad de analizar varios grupos de POP en un único extracto de la muestra, condicionó el análisis instrumental de mono- a heptaPBDE. De los dos métodos de GC-MS desarrollados con anterioridad en el laboratorio para la determinación de PBDE (Eljarrat *et al.*, 2002) en estos estudios se utilizó el modo de ionización de NCI, debido a la presencia en los extractos de compuestos clorados que interferían con algunos congéneres de PBDE, como el PCB-180, que coelucía con el BDE-47 (ver Figura 22). Los detalles de esto fueron publicados en otro artículo que no se incluye en la memoria de la tesis (Eljarrat *et al.*, 2003). Aunque la ionización NCI proporcionó una sensibilidad 1000 veces mayor que la EI (Eljarrat *et al.*, 2002) --que de otro modo hubiese tenido que ser compensada con un factor de preconcentración mayor--, el patrón de fragmentación obtenido con esta técnica se limita prácticamente a la pérdida de los átomos de bromo (excepto en el caso del BDE-209 (Björklund *et al.*, 2003a), por lo que no es posible distinguir entre los compuestos nativos de la muestra y los marcados isotópicamente y no se puede realizar dilución isotópica, salvo en el caso del BDE-209, ni tampoco distinguir entre compuestos bromados en caso de coeluciones, como ocurría con el BDE-99 y el HBCD.

Mediante la monitorización del ión bromuro, se pudo detectar la presencia de HBCD en las muestras de sedimentos y peces en la misma inyección cromatográfica que los PBDE (Artículo #3). En el cromatograma de GC-MS el HBCD aparece como un pico ancho, entre el BDE-153 y el BDE-183, que se forma por la separación no resuelta de los tres diastereoisómeros posibles de este compuesto (α , β y γ) que, además, sufren interconversión térmica a partir de 160°C (Peled, 1995). Por otra parte, las altas temperaturas en el inyector y en la columna en la GC, por encima de los 240°C y especialmente cuando en el sistema de GC existe suciedad, provocan la degradación del HBCD (Barontini *et al.*, 2001; Budakowski & Tomy, 2003; Covaci *et al.*, 2007), formándose otros compuestos que eluyen con tiempos de retención menores y pueden interferir en la identificación y cuantificación de otros PBDE, como se vio que ocurría en nuestras muestras con el BDE-99 (Artículo #3). Debido a esta degradación, compuestos como el PCB-209, utilizado en nuestros ensayos como patrón interno para el análisis de PBDE, no pueda utilizarse con el HBCD, ya que no puede compensar su degradación térmica porque es mucho más estable (Abdallah *et al.*, 2008). Por ello, en estos trabajos, la cuantificación se llevó a cabo por patrón externo y con una monitorización continua de la degradación del HBCD intercalando inyecciones de este patrón en cada secuencia. Con la disponibilidad más reciente

del ^{13}C -HBCDs, algunos laboratorios utilizan este compuesto como surrogate, lo que aporta precisión y especificidad aceptables al análisis por GC. Sin embargo, para ello ha de monitorizarse el ion $m/z=573$, perdiendo gran parte de la sensibilidad que ofrece la monitorización del ión bromuro (Haug *et al.*, 2008).

En los estudios posteriores con HBCD, la determinación del HBCD se llevó a cabo mediante LC-QIT-MS/MS (Guerra *et al.*, 2009). Aunque mucho menos sensible que la GC, las fases estacionarias existentes para LC permiten la separación de α -, β - y γ -HBCD (e incluso los enantiómeros, si se utilizan columnas quirales), al tiempo que se evitan los problemas de degradación asociados a las altas temperaturas de la GC, por lo que se ha convertido en la técnica de elección para el análisis de este contaminante (Budakowski & Tomy, 2003; Janák *et al.*, 2005; Zegers *et al.*, 2005).

2.7.4. Niveles y distribución entre biota y sedimento

Gracias al desarrollo de metodologías analíticas adecuadas para el análisis de estos contaminantes en diversas matrices, logamos llevar a cabo diversos estudios que proporcionaron los primeros datos de niveles de concentración de PBDE y HBCD en España, así como primeros datos de HBCD a nivel internacional.

Las Tablas 13 y 14 recogen los resultados de las dos campañas de muestreo que se realizaron al comienzo del trabajo de tesis, una vez que la metodología fue optimizada. La Tabla 13 muestra los niveles encontrados en muestras recogidas en las costas de Barcelona, Tarragona y Almería en el año 2002, publicada en colaboración con grupos de investigación de Tarragona y Almería (Eljarrat *et al.*, 2005a), en donde están incluidas las muestras a que hacen referencia los artículos #1 y #2. Estos constituyeron los primeros datos publicados de concentraciones de PBDE en costas españolas. En la Tabla 14 se resumen los resultados de todos los compuestos de la campaña de muestreo en el río Cinca en 2002 (Artículos #3 y #4), incluyendo los resultados del análisis de alburnos, con concentraciones similares a los barbos (Eljarrat *et al.*, 2005b), publicación no incluida en la memoria).

Tabla 13. Concentraciones de PBDE en sedimentos de la costa española (ng/g dw)

	Almeria		Llobregat (Barcelona)		Tarragona	
	promedio	Intervalo	promedio	Intervalo	promedio	Intervalo
BDE-28+33	nd	nd	nd	nd	0,24	nq-0,30
BDE-47	0,10	0,07-0,12	0,10	0,07-0,13	0,07	0,05-0,09
BDE-66	0,08	nd-0,09	nd	nd	nd	nd
BDE-77	0,03	nd-0,03	nd	nd	nd	nd
BDE-100	0,10	nd-0,19	0,11	0,10-0,13	nq	nq
BDE-99*	0,10	0,05-0,14	0,17	0,14-0,22	nd	nd-nq

Tabla 13. (Continuación)

	Almería		Llobregat (Barcelona)		Tarragona	
	promedio	Intervalo	promedio	Intervalo	promedio	Intervalo
BDE-118	1,41	0,08-3,3	0,19	nd-0,22	0,18	nq-018
BDE-154	nd	nd	0,10	nd-0,11	0,10	nd-0,10
BDE-153	nd	nd	0,26	0,24-0,32	0,27	nd-0,27
BDE-183	0,05	nd-0,05	0,62	0,4-1,22	0,32	nq-0,62
BDE-209	3,15	2,5-4,0	58,0	2,9-132	14,05	3,6-25

(nd: no detectado; nq: no cuantificable)

*En ese estudio no se detectó la presencia de HBCD, lo que a su vez permitió cuantificar el BDE-99.

Tabla 14. Concentraciones de PBDE, HBCD y DDX en sedimento y peces del río Cinca (ng/g dw).

		Aguas arriba de Monzón		Aguas abajo de Monzón	
		Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 4
Sedimentos (ng/g dw)	PBDE	2,4	2,6	42	40
	HBCD	nd	nd	514	90
	DDX	10,5	9,0	94	21
Barbos (ng/g ww)	PBDE	0.1-1.4	0.1-5.5	21-446	18-246
	HBCD	nd	nd	161-1172	42-180
	DDX	nd-64	nd-15	167-2098	101-1692
Alburnos (ng/g ww)	PBDE	-	nd-9.1	351-573	74-318
	HBCD	-	nd	247-1643	73-1103
	DDX	-	2-6	328-1527	40-303

Los niveles encontrados, en general, reflejan el grado de industrialización de las áreas de estudio, con valores mayores en la costa de Cataluña que en Almería y de manera evidente en el río Cinca aguas arriba y abajo del polígono industrial de Monzón, y tanto para los BFRs como para los DDX, cuyo origen en Monzón es industrial y no agrícola. Como se discute en los artículos, los valores son comparables con otras áreas de características similares. Si se comparan las dos familias de contaminantes, se puede observar que los niveles son mayores para DDX, lo que se explica por el uso del DDT en el área de Monzón durante largos periodos de tiempo, mientras que la utilización de los PBDE no ha sido tan prolongada.

Diversos estudios temporales en los últimos años parecen confirmar una disminución en los niveles de PBDE a nivel global. Dicha disminución cuadra bastante bien con la cronología de las sucesivas restricciones en la producción y uso de las distintas mezclas técnicas, al igual que tiempo antes ocurrió con el DDT. Así, mientras que existen evidencias de que los niveles los

PBDE parecen haber comenzado a disminuir a nivel global a principios de la década pasada tanto en sedimentos o suelos como en biota, el BDE-209 continúa en aumento hasta 2008 (Hale *et al.*, 2012) ó 2010 (Olofsson *et al.*, 2012). De manera similar, otros autores han podido medir tendencias contrapuestas entre los PBDE y el HBCD (Chen *et al.*, 2011; Vorkamp *et al.*, 2012). Sin embargo, los datos recientes de PBDE en sedimentos del río Cinca del año 2010 tras su paso por Monzón no reflejan una variación significativa de las concentraciones de estos compuestos (Barón *et al.*, 2014) con respecto a las del artículo #3. El HBCD, cuyo hallazgo en las muestras del Cinca supuso una de las primeras aportaciones de concentraciones de este compuesto en sedimentos y peces (después de Sellström *et al.* (1998) en Suecia y Budakowski & Tomy (2003) en Canadá), sí parece haber aumentado posteriormente, tanto en sedimentos (Figura 26) como en peces, al menos hasta 2005 (Guerra *et al.*, 2009).

Por otra parte, cabe mencionar que en los estudios más recientes sobre esta zona del río Cinca ya han comenzado a detectarse algunos FR de nueva generación. Debido a las restricciones recientes sobre el BDE-209 y el HBCD, en los últimos años se ha producido un incremento de BFR nuevos y FR fosforados (Yang *et al.*, 2012; Cristale & Lacorte, 2013). Algunos de los cuales, BFR emergentes, como el decabromodifenil etano (DBDPE) o los norborenos halogenados (HN) ya han comenzado a detectarse en el área de estudio del río Cinca (Santín *et al.*, 2013); Barón *et al.*, 2014).

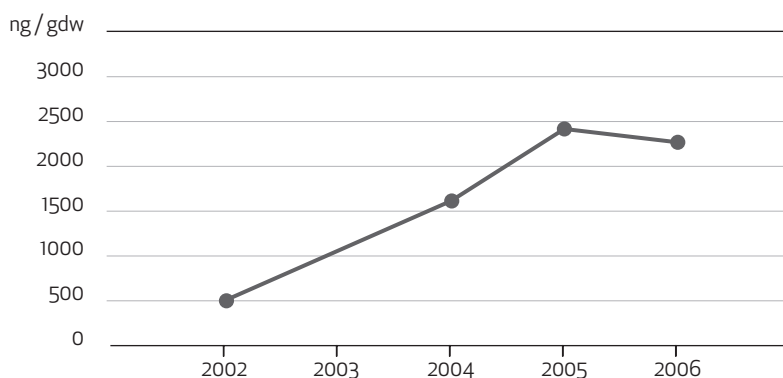


Figura 26. Niveles de HBCD en el sedimento del punto 3 del río Cinca durante diferentes campañas (ng/g dw)

Más representativa, en términos de biodisponibilidad y bioacumulación, resulta la comparación entre los compartimentos biótico y abiótico. En los artículos publicados se hizo un esfuerzo por extraer conclusiones sobre la capacidad de asimilación y acumulación de estos compuestos, comprobando el aumento de concentración en peces con la edad y calculando las relaciones entre la cantidad de contaminante acumulada en ellos y su concentración en el sedimento. En la Figura 27 se muestran los perfiles de los compuestos encontrados en el sedimento y los peces adultos del punto de mayor contaminación en el río Cinca (*Site 3* en los Artículos #3 y #4). La cifra que aparece sobre cada barra de la Figura corresponde al cociente entre la concentración media en los peces y la concentración en el sedimento normalizadas respecto al contenido lipídico y el contenido orgánico o factor de acumulación biota-sedimento (BSAF, de *Biota-Sediment Accumulation Factor*), que se puede utilizar como un descriptor del potencial de bioacumulación de cada contaminante. Las diferencias en el perfil de los PBDE entre cualquiera de las tres

matrices de peces y el sedimento son especialmente significativas. Mientras que los sedimentos mostraron un patrón de PBDE dominado por el BDE-209 (al igual que ocurría en las muestras costeras), en los peces este congénere no pudo ser detectado. Por el contrario, los BDE-47, BDE-153, BDE-154 y BDE-183, fueron mucho mayores relativamente en los peces. El p,p'-DDE, mayoritario en sedimentos, es mucho mayor proporcionalmente en los peces, aunque el grado de bioacumulación es mucho menor que los PBDE encontrados.

La variación entre los perfiles de contaminantes en sedimento y biota, que han sido puestas de manifiesto en otros estudios (Streets *et al.*, 2006; Koistinen *et al.*, 2008) puede ser explicada, al menos en parte, por las diferencias de accesibilidad de cada compuesto en el sedimento y de transformación metabólica en los organismos. Los compuestos más hidrofóbicos, si bien tienden a acumularse en los lípidos en mayor medida que los más polares cuando están disueltos en el agua, también tienden a ser retenidos en el sedimento en distintos grados, incluso de manera irreversible, dependiendo de las características del sedimento y del tiempo transcurrido, dificultando su asimilación por parte de los organismos vivos, lo que puede justificar que en los peces analizados no aparezcan los congéneres más bromados, como el BDE-209, o el bajo BSAF del HBCD (0.55 g OC / g lw), el compuesto más concentrado en sedimento, frente a PBDE menos bromados como el BDE-47 (40 g OC / g lw). Además, a día de hoy, como se comentó en el capítulo 1, varios estudios han dado cuenta de la existencia de procesos de desbromación en peces que pueden llevar a la desaparición del BDE-209 (Stapleton *et al.*, 2004a) y a una acumulación de congéneres menos bromados como el BDE-47 o el BDE-154 mayor que la correspondiente a la simple partición con el contaminante presente en el medio (Stapleton *et al.*, 2004b; Benedict *et al.*, 2007).

Las diferencias de perfiles entre sedimento y biota hacen patentes las limitaciones del análisis de matrices abióticas para extrapolar las concentraciones significativas para los organismos vivos. Tradicionalmente, el BSAF sirve para hacer esa extrapolación, ya que indicaría a qué concentración tienden a acumularse los compuestos en la biota en el equilibrio (Di Toro *et al.*, 1991). Sin embargo, los ecosistemas y en especial los organismos raramente se encuentran en equilibrio. Además, aun cuando se hace esta normalización, no se tiene en cuenta la capacidad de ciertos dominios de materia orgánica presentes en el sedimento para secuestrar irreversiblemente contaminantes. Por ello, con frecuencia, los BSAF medidos en campo difieren de las estimaciones de laboratorio (Muir *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2002). Por ejemplo, en un estudio reciente, La Guardia *et al.* (2012) han mostrado como los BAF calculados *in situ* de los PBDE más bromados en bivalvos y gasterópodos aguas abajo de una fábrica textil, son menores que los valores esperados a partir de su K_{oc} según la teoría de partición en el equilibrio (Di Toro *et al.*, 1991). En el Capítulo 3 se explora la posibilidad de analizar los contaminantes acumulados en el sedimento teniendo en cuenta la facilidad con que pueden ser desorbidos del mismo.

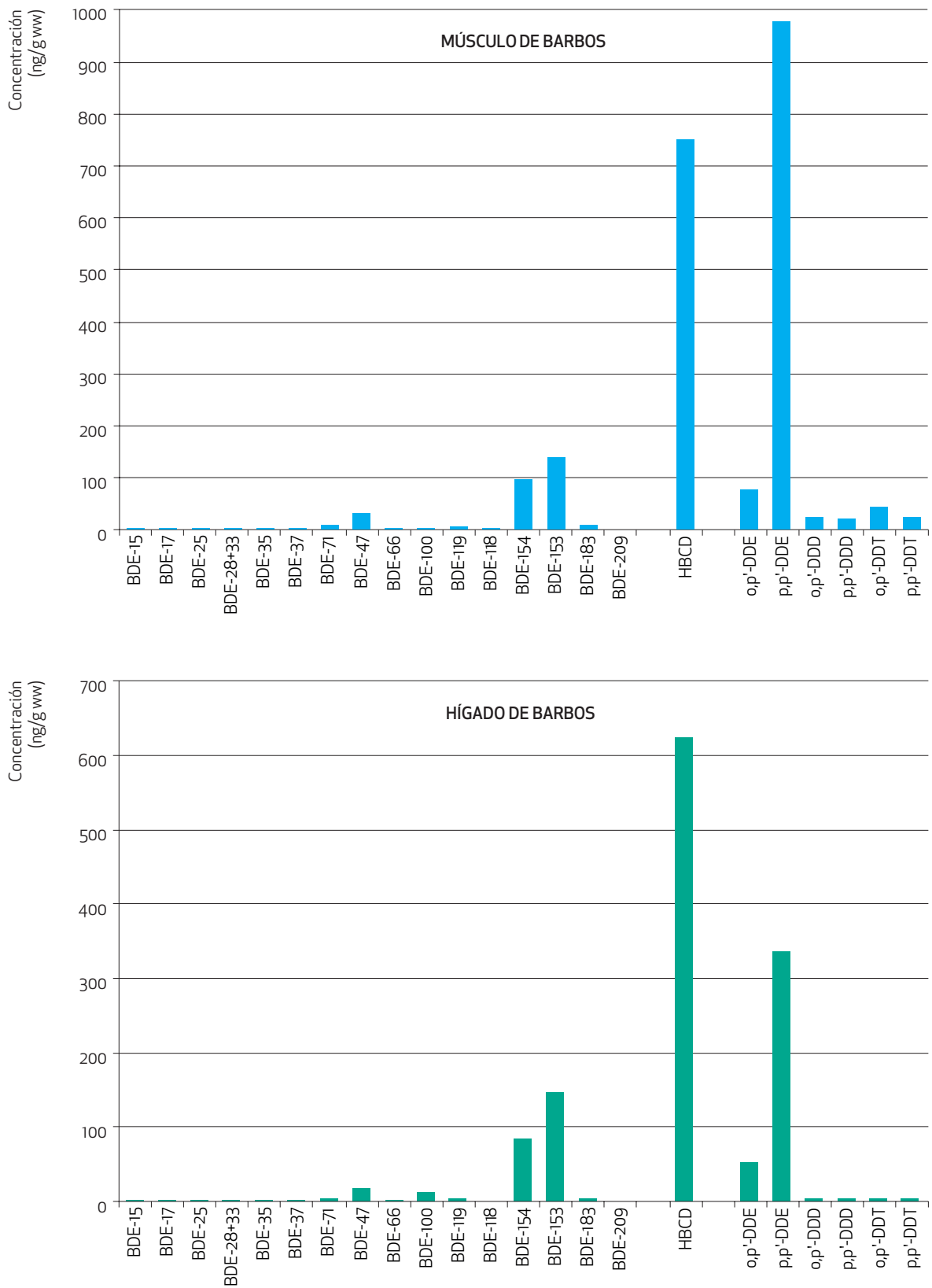


Figura 27. Perfil de PBDE, HBCD y DDX en los peces y el sedimento muestreado en el río Cinca a su paso por Monzón. Sobre las barras de la gráfica de alburnos se indica el BSAF (g OC / g lw) correspondiente a cada compuesto.

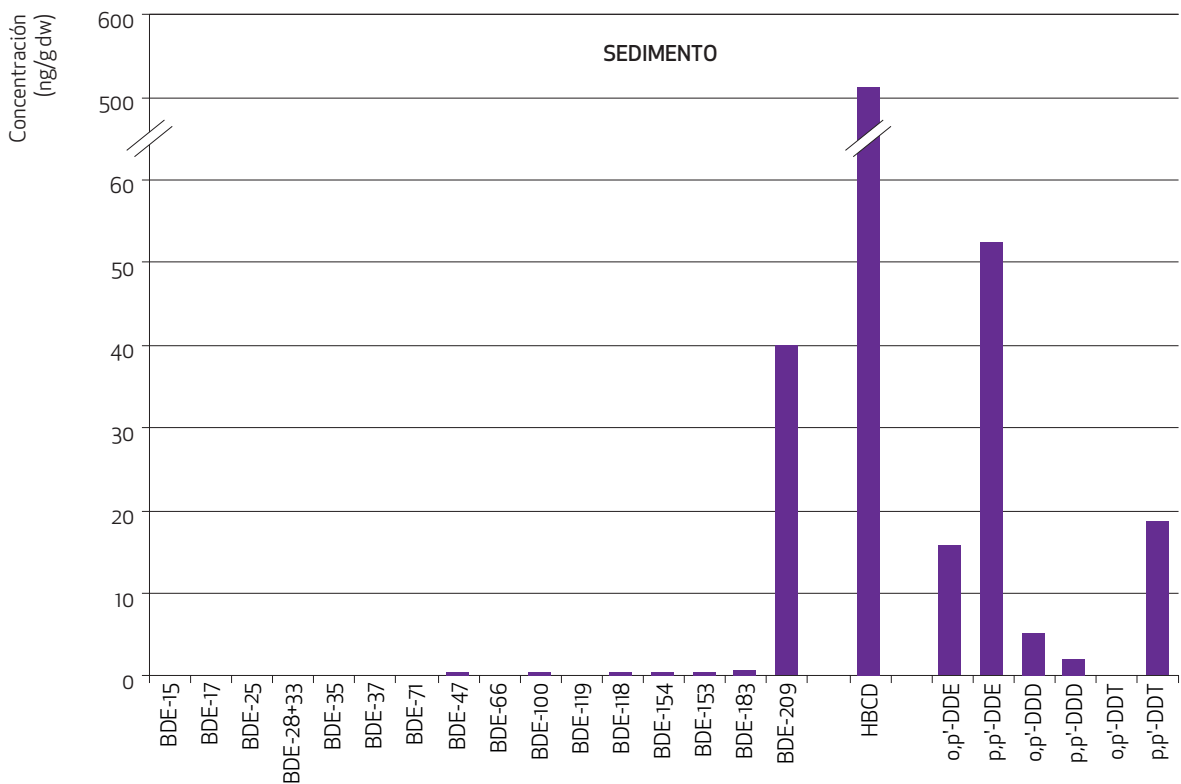
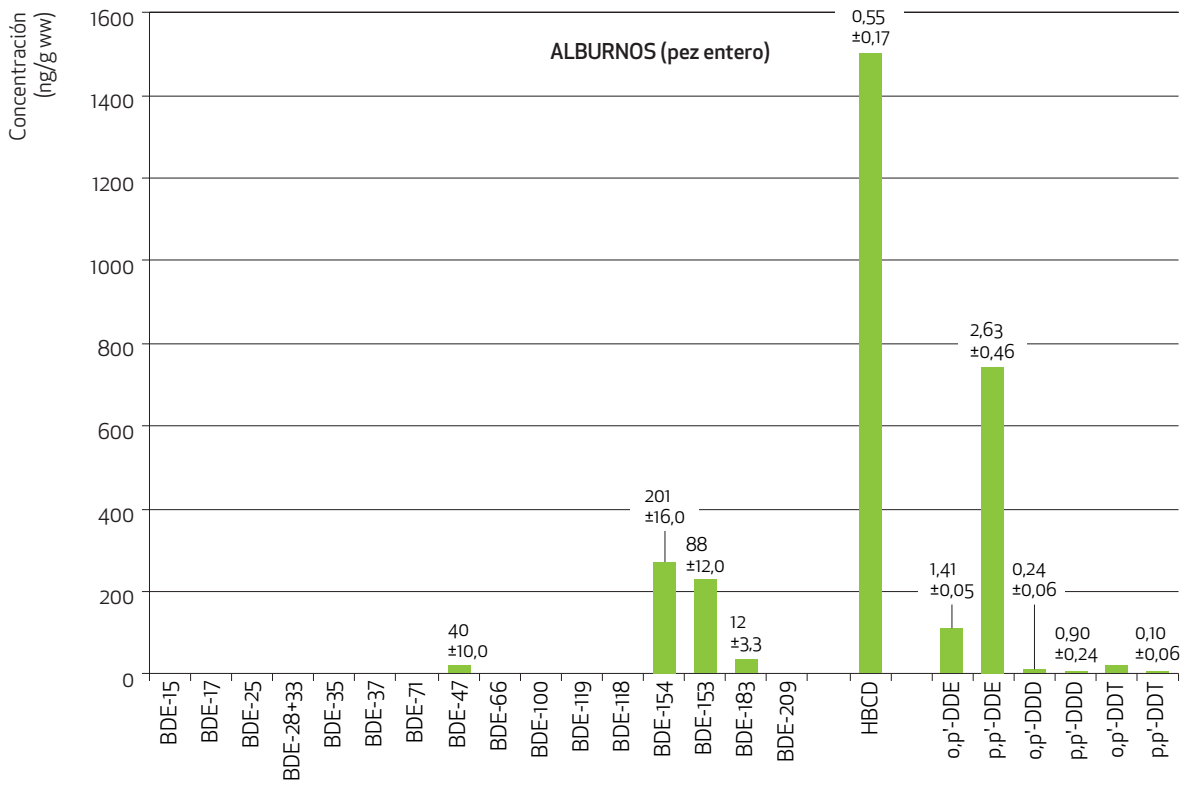


Figura 27. (Continuación).

3

Estudios de biodisponibilidad
en sedimento mediante
extracciones suaves con Tenax

■ 3.1. Introducción

La extracción exhaustiva del contaminante asociado a la fase particulada en el medio acuático, como la descrita en el capítulo anterior, aporta la rigurosidad requerida para cumplir los criterios de calidad normativos que aseguran la ausencia de riesgo independientemente de las circunstancias y cumplen, por tanto, el principio de precaución. Sin embargo, como se dijo en la introducción general de esta memoria, este tipo de mediciones incluyen en muchos casos una parte de contaminante asociado irreversiblemente a la materia orgánica, difícilmente accesible para los organismos vivos y resultan de interés limitado cuando se trata de estudiar el destino de los contaminantes hidrófobos en el medio y su biodisponibilidad (Reid *et al.*, 2000; Ehlers & Loibner, 2006). Puesto que suponen una sobreestimación de la exposición y del riesgo, la priorización de contaminantes puede resultar errónea o sesgada si se basa sólo en estas técnicas. Además, cuando se evalúan estrategias de biorremediación de zonas contaminadas concretas, una sobreestimación de la biodisponibilidad puede derivar no solo en una valoración del riesgo superior al real, que dé lugar a actuaciones innecesarias, sino también en una sobrestimación de la capacidad de degradación por parte de los microorganismos y en estrategias costosas que no den el resultado esperado. La determinación de la fracción de contaminante susceptible de pasar a la fase disuelta es más adecuada para predecir la biodisponibilidad y la exposición real de la biota a los contaminantes. En este capítulo se muestran los resultados referentes a la estimación de la fracción de desorción rápida de PBDE y DDX en sedimento de río, para lo que se utilizó la técnica de extracción con Tenax.

A pesar de ser contaminantes persistentes, tanto en el caso del DDT como de los PBDE, se ha demostrado la existencia de degradación fotoquímica y biológica en varios ambientes, incluyendo aire, agua, sedimento, y biota, lo que sugiere que la persistencia puede estar asociada, más bien, a alguna forma de secuestro ambiental, que los mantenga inaccesibles a los microorganismos. Sin embargo, si bien es generalmente conocido que los materiales sedimentarios son el principal sumidero de PBDE en el medio acuático, y que su distribución se correlaciona con el contenido de carbono orgánico de los mismos (Gouin & Harner, 2003; Hassanin *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006; Zou *et al.*, 2007), no se habían hecho estudios sobre el potencial de asociación y liberación de los PBDE a las fases minerales u orgánicas en suelos y sedimentos y existían lagunas en cuanto a la explicación de por qué las concentraciones de PBDE en la fase disuelta son menores a las que se pueden predecir a partir de su solubilidad, o por qué los compuestos de mayor bromación e hidrofobicidad son menos bioacumulados. Para comprender el comportamiento de estos contaminantes en el medio, así como el riesgo asociado a su presencia en cada sedimento en particular, era necesario el desarrollo y la aplicación de metodologías que permitan distinguir entre la fracción de cada contaminante susceptible de ser absorbida o transformada por los organismos vivos.

Para otros POP históricos, entre ellos el DDT, varios estudios habían revelado que, además de la absorción lineal a la materia orgánica amorfa, en los sedimentos existen fases de materia orgánica sedimentaria capaces de ejercer una absorción no lineal más fuerte que da lugar a un perfil de desorción bifásico con una fracción de desorción rápida y otra más lenta que aumenta con el tiempo de contacto entre contaminante y sedimento (Karickhoff *et al.*, 1979; Xing & Pignatello, 1997; Jonker & Koelmans, 2002). Se había visto, además, que este perfil estaba relacionado con

la capacidad de asimilación de esos contaminantes por los organismos vivos, especialmente microorganismos (Luthy, 1997; Cornelissen *et al.*, 1998; Cuypers *et al.*, 2002) y animales bentónicos (Kraaij *et al.*, 2002a), pero también para niveles tróficos superiores (Moermond *et al.*, 2004). Así, p. ej., las fracciones de DDT obtenidas mediante extracciones suaves de suelos habían sido relacionadas con la acumulación en gusanos *Eisenia foetida* (Tang *et al.*, 1999; Morrison *et al.*, 2000). Sin embargo, no existían datos sobre la desorción de DDX específicos de cada isómero.

Por otra parte, no existía ninguna técnica estandarizada --ni tan solo ampliamente aceptada-- que proporcionase una medida de dicha bioaccesibilidad sin tener que recurrir al trabajo con seres vivos. Los intentos por predecir la extensión de la biodegradación por atenuación natural o en campañas de biorremediación en suelos y sedimentos habían llevado a la utilización de distintos materiales para la evaluación química de la bioaccesibilidad como el Tenax TA (Pignatello, 1991), el XAD o las ciclodextrinas, capaces de actuar como sumidero infinito de los compuestos hidrofóbicos en una dilución acuosa y forzar la desorción de los compuestos asociados más débilmente al sedimento (dilución infinita), distinguiéndolos de aquella fracción que no se desorbe (ver Capítulo 1, 1.4.5.1). La extracción con Tenax TA --adsorbente polimérico de óxido de 2,6-difenil-p-fenileno que se utilizaba habitualmente como trampa en el análisis de compuestos volátiles (Lüthje *et al.*, 2004; García Pinto *et al.*, 2011)-- era quizá la que había recibido más atención. La relación entre la fracción desorbible rápidamente calculada a partir de ella y la biodisponibilidad había sido probada para distintos seres vivos (Cornelissen *et al.*, 2001; Kraaij *et al.*, 2001; Kraaij *et al.*, 2002b) (Tabla 15). Su principal ventaja frente a las ciclodextrinas o al XAD-4, p. ej., es que el Tenax es separado de la suspensión de sedimento con facilidad por flotación y el sedimento se va al fondo, sin necesidad de centrifugar o utilizar aditivos que pueden afectar al proceso de desorción e imposibilitan una segunda extracción de la misma muestra.

El proceso de extracción con Tenax se inicia mediante la adición de gránulos de este material a una suspensión de una muestra de sedimento. La mezcla es agitada de manera continuada durante un intervalo predeterminado, tras el cual las perlas de Tenax son aisladas y sometidas a la extracción con disolventes de los analitos adsorbidos. Cuando se realizan extracciones consecutivas, tras la separación del Tenax utilizado, se añade Tenax fresco a la suspensión de sedimento y se reanuda el proceso de agitación. El empleo de embudos de separación como recipiente para la extracción (Cornelissen *et al.*, 2001) facilita la retirada del Tenax tras el periodo de agitación, ya que éste flota en el agua y queda adsorbido a las paredes de vidrio cuando se realiza el traspaso de la suspensión de sedimento (Figura 28). Para la extracción de los analitos que han sido adsorbidos al Tenax antes de su análisis se han utilizado distintos métodos según los autores. Generalmente se utiliza la misma técnica empleada para la extracción del sedimento por cuestión de practicidad.

A partir de los datos obtenidos de etapas consecutivas de extracción se puede estimar la curva de desorción y ajustarla a un modelo cinético bi- o trifásico (ver Capítulo 1), de donde se obtiene la F_{rap} , que representa la bioaccesibilidad (Cornelissen *et al.*, 2001; Kraaij *et al.*, 2001). Sin embargo, el tiempo y número de etapas necesario para poder realizar este ajuste hacen este método largo y costoso. Algunos autores habían tratado de encontrar una relación constante entre la fracción de desorción rápida y la fracción cuantificada durante un solo paso de extracción de duración determinada, que permitiese utilizar esa fracción como representante de la F_{rap} y, por tanto, disponer de un método más simple y estandarizable para un uso rutinario. A este respecto,

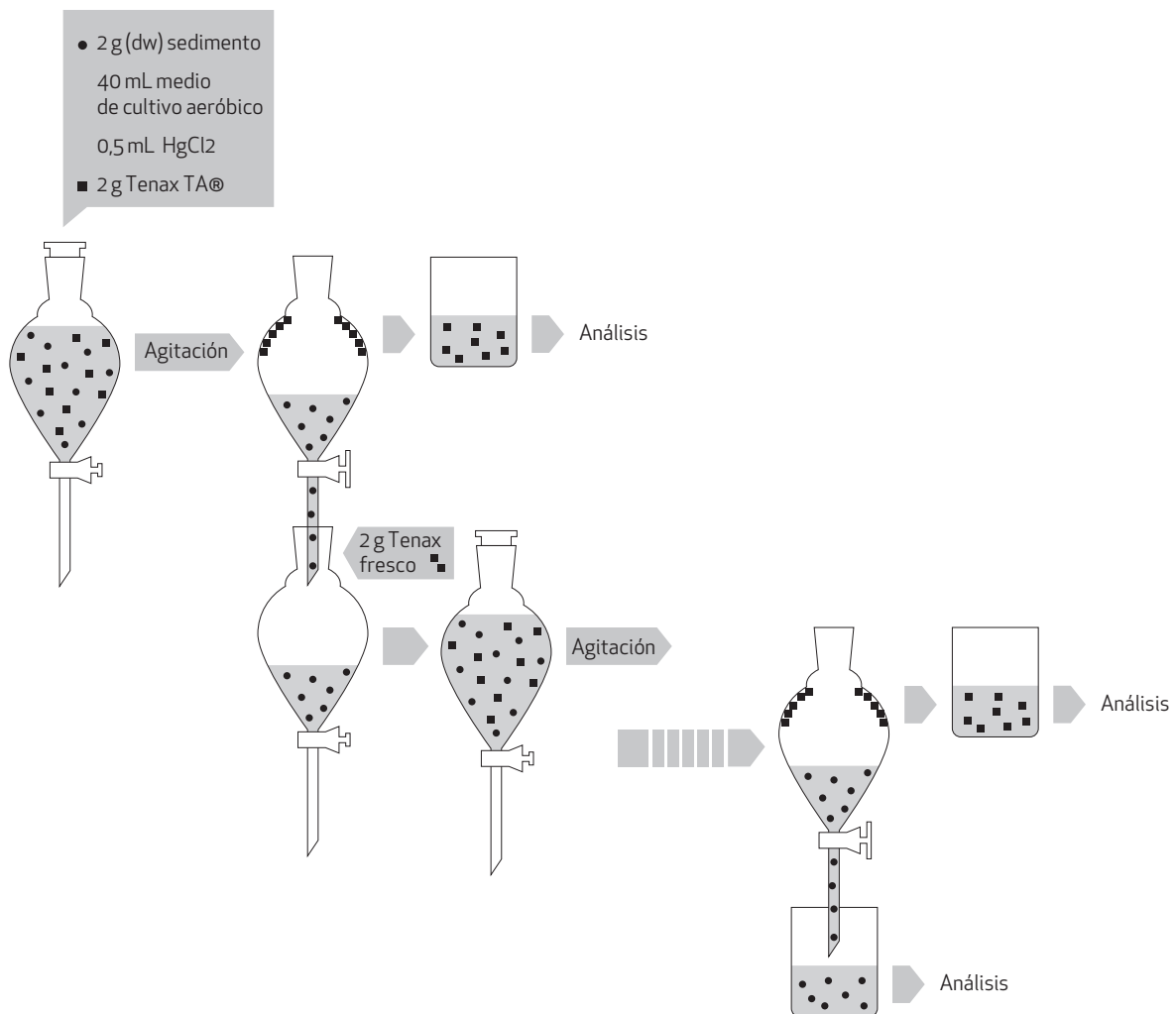


Figura 28. Esquema general de una extracción secuencial con Tenax.

Cornelissen *et al.* (2001) encontraron que para un grupo diverso de sedimentos y contaminantes (PAH, PCB, y CBS) la F_{rap} estimada era en promedio el doble de la fracción de contaminante desorbida tras 6 horas de extracción (dentro de un rango entre 0,38 y 10,26). Otros autores validaron este método para diferentes contaminantes y sedimentos mediante la comprobación de la correlación del porcentaje desorbido durante ese tiempo con la captación de los organismos que se alimentan directamente de depósitos (Ten Hulscher *et al.*, 2003). Sin embargo, en algunos otros experimentos, se han utilizado diferentes tiempos de extracción para describir la fracción desorbida rápidamente. Shor *et al.* (2003), p. ej., encontró que una extracción de 24 h proporcionaba una estimación aproximadamente de la misma magnitud que la F_{rap} . Kukkonen *et al.* (2004), en cambio, encontraron que ninguno de estos dos periodos (6 o 24 h) eran sustitutos adecuados para esa fracción.

Tabla 15. Estudios en que se ha comparado la extracción con Tenax con la acumulación en organismos, la biodegradación o la toxicidad de POP en sedimentos

Contaminante	Organismo	Matriz	Medida biológica	r ²	Referencia
PAH y PCB	Tubificidae	Sedimento fortificado	CBSAF	NP	(Kraaij et al., 2002a)
PAH	Limnodrilus sp.	Sedimento contaminado	CBSAF	0.96	(Ten Hulscher et al., 2003)
BDE-99 y TCDD	L. variegatus	Sedimento fortificado	CBSAF	NP	(Leppänen et al., 2003)
PAH	Diporeia sp.	Sedimento fortificado	CC	0.66	(Kukkonen et al., 2004)
PAH	L. variegatus	Sedimento fortificado	CC	0.67	(Kukkonen et al., 2004)
PAH	L. variegatus	Sedimento fortificado	CBSAF	NP	(Leppänen and Kukkonen, 2006)
PAH	Hinia reticulata	Sedimento contaminado	CBSAF	NP	(Oen et al., 2006)2006
Varios HOC	L. variegatus	Sedimento fortificado	CC	0.84	You-2006-p 6348
PCB y PAH	Diporeia sp.	Sedimento contaminado	CC	0.63	(Landrum et al., 2007)
PCB y PAH	Oligochaetes	Sedimento contaminado	CC	0.63	(Landrum et al., 2007)
Varios HOC	Oligochaetes	Sedimento fortificado y sedimento contaminado	CC	0.89	(Landrum et al., 2007)
Varios HOC	Oligochaetes	Sedimento fortificado y sedimento contaminado	CC	0.89	(Landrum et al., 2007)
PCB-77	L. variegatus	Sedimento fortificado	CR	0.8	(Sormunen et al., 2008b)
Nonilfenol	NA	Sedimento contaminado	Toxicidad	NP	(De Weert et al., 2008)
Piretroides	H. azteca	Sedimento contaminado	Toxicidad	NP	(You et al., 2008)
PCB	H. azteca, C. dilutus, & L. variegatus	Sedimento fortificado	CC	NP	(Sormunen et al., 2009a)
BDE-47 y BaP	L. variegatus	Sedimento fortificado	CBSAF	NP	(Sormunen et al., 2009b)
Permetrina	L. variegatus	Sedimento fortificado	CC	NP	(You et al., 2009)

CC = correlación con las concentraciones, CBSAF = correlación con los BSAF, B = bioadisonibilidad en general, NP = No Presentado, NA = No Aplicable

■ 3.2. Trabajo experimental

Dentro del periodo de tesis, se estudió la aplicación en sedimento de extracciones sucesivas con Tenax® como método de estimación de la fracción de desorción rápida para varios compuestos: PBDE, DDX, HBCD y Nonilfenol (NP). Una buena parte del trabajo englobado en este punto fue realizado durante una estancia (enero - junio 2006) en el Departamento de Tecnología Medioambiental de la Universidad de Wageningen, en Holanda, bajo la dirección del Dr. Grotenhuis con amplia experiencia en estudios de biodisponibilidad de compuestos orgánicos en sedimentos (Cuypers *et al.*, 2002; Smit *et al.*, 2004; Puglisi *et al.*, 2007). En el artículo #5, que se adjunta a continuación, se presentan los resultados relativos al trabajo realizado con PBDE y DDX en muestras de sedimento procedentes del río Cinca. Adicionalmente, en la discusión de resultados se hace referencia a los estudios realizados con HBCD, que se publicaron como parte de otro artículo no incluido en la memoria (Guerra *et al.*, 2009).

Para estos estudios se aplicó la técnica descrita por Cornelissen (Cornelissen *et al.*, 2001), realizando la extracción en embudos de decantación, como se explica en el artículo #5. La extracción de los analitos retenidos en el Tenax y de la cantidad total presente en el sedimento fue llevada a cabo mediante Extracción Asistida por Microondas (MAE) y purificación con extracción líquido-líquido (LLE), por ser ésta la técnica disponible en el laboratorio holandés donde se realizaron los experimentos. El análisis final de los extractos se llevó a cabo con la misma metodología descrita en el capítulo anterior para los extractos procedentes de SPLE (GC-NCI-MS para la determinación de los PBDE y GC-EI-MS para los DDX). En el experimento sobre HBCD, los extractos fueron reconstituidos con metanol en lugar de isooctano y la determinación se hizo ya en esta ocasión mediante LC-QIT-MS/MS según el método descrito en (Guerra *et al.*, 2008), de manera que pudieron diferenciarse los tres isómeros de este compuesto.

La duración de los experimentos de desorción (432 h) y el número de etapas (10) fue lo suficientemente larga para poder ajustar las cantidades desorbidas en las etapas consecutivas de extracción con Tenax a un modelo cinético trifásico de primer orden y comparar la fracción de desorción rápida calculada a partir de este modelo con la extraída en 6 horas (Cornelissen *et al.*, 2001) o en 24 horas (Shor *et al.*, 2003).

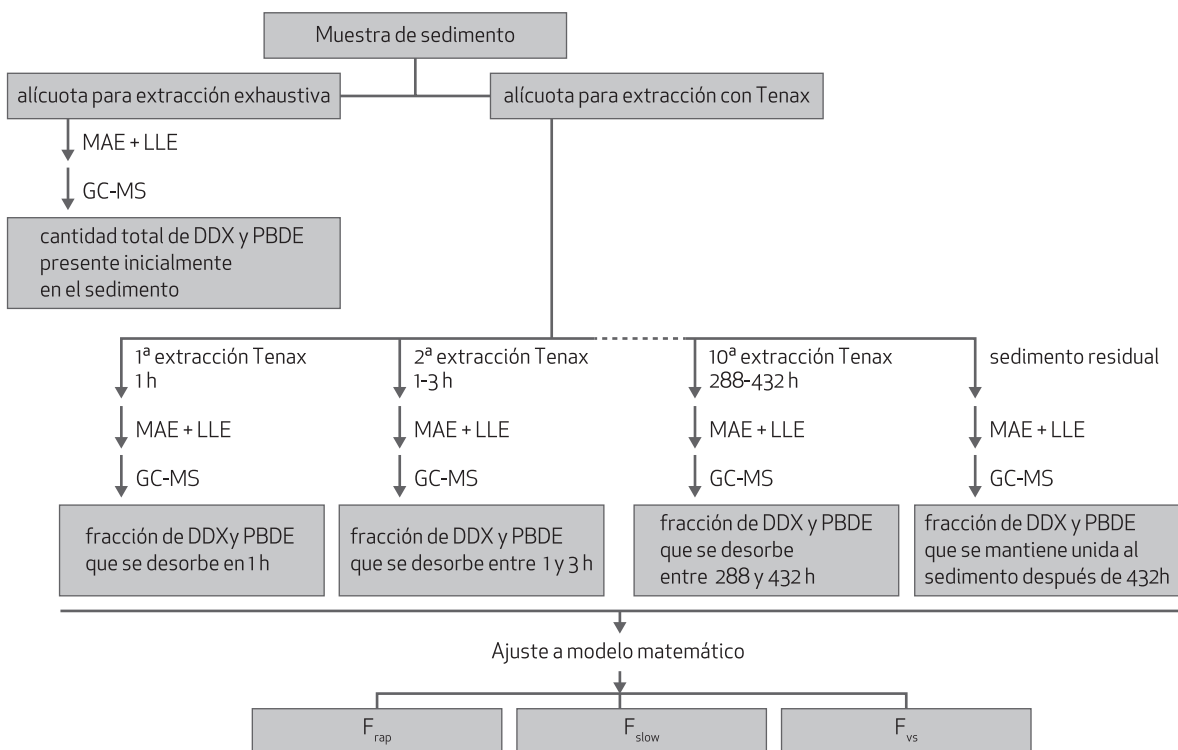


Figura 29 Diagrama del experimento de desorción del sedimento fortificado con PBDE y DDX

■ 3.3. Artículo científico #5

Tenax extraction as a tool to evaluate the availability of polybrominated diphenyl ethers, DDT, and DDT metabolites in sediments

A. de la Cal, E. Eljarrat, T. Grotenhuis, D. Barceló
Environ Toxicol Chem (2008) 27(6): 1250-1256

TENAX® EXTRACTION AS A TOOL TO EVALUATE THE AVAILABILITY OF
POLYBROMINATED DIPHENYL ETHERS, DDT, AND DDT
METABOLITES IN SEDIMENTSAGUSTINA DE LA CAL,[†] ETHEL ELJARRAT,^{*†} TIM GROTENHUIS,[‡] and DAMIÀ BARCELÓ[†][†]Department of Environmental Chemistry, Chemical and Environmental Research Institute of Barcelona, Spanish National Research Council, Jordi Girona, 18-26, 08034 Barcelona, Spain[‡]Subdepartment of Environmental Technology, Department of Agrotechnology and Food Sciences, Wageningen University, P.O. Box 8129, 6700 EV, Wageningen, The Netherlands

(Received 25 September 2007; Accepted 20 December 2007)

Abstract—Solid-phase extraction with Tenax® is one of the most used methods for determining the fraction of a pollutant that desorbs rapidly from sediment and thus is available for living beings. In the present study, this technique has been applied to sediment contaminated in the laboratory with polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and dichlorodiphenyltrichloroethane, dichlorodifenyldichloroethylene, and dichlorodifenyldichloroethane (generically, DDXs). The amount of chemical retained in sediment during the time of the experiment fit well with a three-phase exponential desorption model. The ratios between the rapidly desorbing fraction and the fraction desorbed during a fixed time (6 or 24 h) were calculated. The fraction desorbed in 6 h was lower than the rapidly desorbing fraction for most of PBDEs, whereas the fraction desorbed in 24 h exceeded the rapidly desorbing fraction for both groups of compounds. However, variability of these data suggests, when possible, a long time measure of desorption in order to achieve a more accurate estimation. Both the extent and the velocity of desorption were inversely related with the bromination degree and, consistently, with hydrophobicity and molecular size. In this way, low brominated PBDEs and DDXs showed a high availability relative to high brominated PBDEs.

Keywords—Polybrominated diphenyl ethers Dichlorodiphenyltrichloroethane Bioavailability Desorption Tenax®

INTRODUCTION

Because of the growth of industrialization in the past decades, the release to the environment of anthropogenic chemicals has reached enormous values. Some of those pollutants remain in the environment for long periods of time, as in the case of the so-called persistent organic pollutants (POPs). These constitute a list of 12 chemical groups whose persistent and bioaccumulating character and potential for long-range transport and toxicity caused alarm within the scientific community and led to their prohibition in the Stockholm Convention in 2001 (<http://www.pops.int/documents/signature/signstatus.htm>). One of the compounds included in the list of POPs is dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), which was one of the most widely used pesticides in Western countries until it was banned almost worldwide during the 1970s and 1980s, together with its metabolites dichlorodifenyldichloroethylene (DDE) and dichlorodifenyldichloroethane (DDD) because of their proven toxicity. The Stockholm convention defined also the criteria for screening new POPs among other contaminants of emerging concern. Among these emerging contaminants that meet the requirements for being so-called POPs are the polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), a group of compounds used as flame retardants in a broad range of consumer products and whose environmental levels have continuously increased in the past three decades.

For these two groups of chemicals, as for other pollutants of concern, most reported studies that evaluate their presence

in the sediment are based in the determination of their total quantity in it, and the accuracy of the methods used is interpreted only in chemical terms [1]. However, not all the chemicals present in the sediment are available for the uptake or transformation by living organisms. Because of increasing contact time, the (bio)available fraction of the chemicals decreases [2]. In the past decade, there is an increasing tendency to look for a more meaningful assessment that takes this into account. Nonexhaustive extraction techniques are based on the fact that contaminants in a freely dissolved or weakly adsorbed state are more available to aquatic biota than those bound to particles, which may become available only on digestion [3,4]. Because of their hydrophobic nature, as in the case of DDT and PBDEs, some important contaminants tend to remain sorbed to the solids, and their pore-water concentrations are maintained low. Then replenishment of the freely dissolved chemical in pore water by desorption from solid phases becomes an important factor.

The rate of desorption from sediment to water is kinetically limited to a bi- or triphasic model following exponential decrease [5,6] that describes a fast, slow, and very slow desorbing fractions. From a risk perspective, only the fraction of the total quantity of contaminant that desorbs sufficiently fast is relevant as it contributes to the freely dissolved concentration in the pore water. Several techniques have been tested to measure the dissolved and rapidly desorbing fraction (those called actual and potentially [bio]available, respectively) in front of a slowly desorbing fraction and a residual, not available, one [7]. In most cases, the freely dissolved fraction is relatively small compared to the potentially available fraction. Therefore,

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

Published on the Web 1/25/2008.

besides solid-phase microextraction to measure the freely dissolved fraction, several solid-phase extraction methods with an infinite sink of the pollutants were developed.

Cyclodextrin and, more frequently, Tenax® (Buchem Apeldoorn, The Netherlands) have been used to measure the rapidly desorbing fraction consisting of freely dissolved components and the potentially available fraction of pollutants from sediment [8,9]. The sorption of pollutants to those artificial adsorbents is so strong that the concentration of them in the water is maintained at virtually zero so that the gradient between water and sediment particles is at maximum. This gradient leads to a shift of equilibrium that causes organic pollutants to be transported from the sediment to the added solid phase (e.g., Tenax or cyclodextrin) via the aqueous phase. Determination of the rapidly desorbing fraction by Tenax extraction has been proven several times to correlate well with the fraction that a certain organism can take up or degrade from sediment [9–11].

Desorption studies have focused on polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), chlorinated biphenyls [9,10,12], and, less so, DDT, DDE, and DDD (hereafter referred to these generically as DDXs) [13,14]. Here we determined the fraction of PBDEs desorbed at consecutive times from laboratory-contaminated sediment by Tenax solid-phase extraction. To our knowledge, this is the first work on desorption of PBDEs from sediment. Our purpose was estimating the rapidly desorbing fraction of those compounds and its relationship with the fraction extracted during a certain time. Besides PBDEs, DDXs were spiked to the sediment. For these pollutants, the correlation between the Tenax-extractable fraction and uptake by earthworms has been demonstrated before [13]. In addition, the differences in the desorbing behavior of PBDEs and DDXs are discussed in relation to their chemical properties.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Individual PBDE congeners were a gift from Göran Marsh from the Department of Environmental Chemistry of Stockholm University (Stockholm, Sweden). The DDT isomers and metabolites were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Tenax-TA (20/35 mesh), a solid porous polymer synthesized from 2,6-diphenyl-*p*-phenylene oxide, was purchased from Buchem (Apeldoorn, The Netherlands). Copper (<63 µm) was purchased from Merck (Dramstadt, Germany).

The solvents used for extraction (petroleum ether 40–60°C and acetone) were of high-pressure liquid chromatography quality and supplied by Merck. Isooctane used for injection was of gas chromatography (GC) quality and was also purchased from Merck.

Sediment spiking

A sediment from the Cinca River (a tributary of Ebro River, Spain), collected at Puente las Pilas, a location far from potential sources of contamination, was used for this experiment. Exhaustive extraction of this sediment showed the absence of the target chemicals before the experiment. It was homogenized and 2-mm-mesh sieved, with a field humidity of 35%. Total organic carbon was determined after removal of carbonates with HCl to be 3.2% of the dry weight. For this analysis, an elemental analyzer (Fisons Instruments EA 1108 CHN-O analyzer; CE Instruments, Milan, Italy) was used. Fifty grams

of wet sediment were spiked on its surface with 1 ml of a concentrated solution of PBDEs and DDXs to reach individual concentration 10 µg/kg dry weight. The congeners included in the present study were two tri-BDEs (BDE-17, BDE-28), three tetra-BDEs (BDE-47, BDE-49, BDE-66), four penta-BDEs (BDE-99, BDE-100, BDE-119), five hexa-BDEs (BDE-138, BDE-139, BDE-140, BDE-153, BDE-154), one hepta-BDE (BDE-183), four octa-BDEs (BDE-194, BDE-196, BDE-197, BDE-203), *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDT, and *p,p'*-DDT. Acetone was used as carrier solvent because of its high volatility and water solubility. After allowing the solvent evaporate briefly under a nitrogen stream, the spiked sediment was shaken vigorously using a rolling wheel for 5 h. Then it was kept at 4°C for 12 d.

Tenax extraction

A solid-phase extraction with Tenax was carried out. For that purpose, we used the method described by Cornelissen et al. [12] with some modifications. All tests were carried out in triplicate. The wet equivalent of 2 g dry weight of sediment was mixed with 40 ml of a water-based medium at isotonic salt concentration, 0.5 ml of 10 g/L HgCl₂ (for preventing microbial degradation during the time course of the experiment), 1 g of copper (for removing sulfur), and 2 g of Tenax TA beads (20–35 mesh) in a separatory funnel. This mixture was continuously shaken in a horizontal shaker in a 20°C controlled-temperature room. After each preselected period, the slurry was transferred into another separatory funnel with 2 g of new Tenax. The used Tenax was rinsed with aerobic medium to remove attached sediment particles, and this washing medium was transferred into the new separatory funnel. The adsorbent was refreshed eight times up to completing a period of 432 h (1, 3, 6, 19, 30, 72, 144, 288, and 432 h). Both the Tenax extracted each time and the residual sediment after the last one were analyzed. In addition, a total extraction of the sediments was performed in order to check the mass balance.

The extraction from the sediment and the extraction from the Tenax were performed by microwave-assisted extraction with 30 ml of a 1:1 mixture of acetone and petroleum ether at 40 to 60°C. A microwave Milestone Ethos 1 (Shelton, CT, USA) was used at 100°C for 20 min. The resulting extract was shaken with approximately 200 ml of water in a separatory funnel, and the petroleum ether phase was separated. After concentration until incipient dryness under a nitrogen stream, the extract was reconstituted with 40 µl of isooctane. Then 10 µl of a solution containing the internal standards (PCB-209 and ¹³C-4,4-DDT) were added.

Instrumental analysis

The concentrated extracts were analyzed by GC coupled with mass spectrometry following methods described elsewhere [15,16]. The analyses of PBDEs were performed with a Trace GC Ultra coupled with a mass spectrometer Dual Stage Quadrupole (Thermo Electron, Austin, TX, USA). The separation of congeners was achieved using a J&W DB-5 (15 m × 0.25-mm internal diameter, 0.25 µm) capillary column (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) containing 5% phenyl methyl siloxane. The temperature program was from 140°C (held for 2 min) to 325°C (held for 10 min) at 10°C/min. Injection was carried out by splitless mode for 1 min with an injector temperature of 250°C. Negative chemical ionization was used as ionization mode with a source temperature of

250°C, ionization energy 40 eV, and ammonia as reagent gas at a system pressure of 2.5×10^{-2} Pa. Helium was used as the carrier gas at 6.8×10^4 Pa. Detection was carried out by monitoring the two most abundant isotope peaks from the mass spectra, corresponding to the loss of the bromine ion: $m/z = 79$ and 81.

The analyses of DDXs were performed with a GC 8000 series 8060 (Fisons Instruments, Milan, Italy) coupled with a mass spectrometer with quadrupole detector MD 800 (Fisons Instruments). A DB-5 (30m \times 0.25-mm internal diameter, 0.25 μ m) capillary column with 5% phenyl methyl siloxane was used. The temperature program was from 60°C (held for 1 min) to 200°C at 5°C/min, then from 200 to 220°C at 1°C/min, and finally at 8°C/min from 220 to 300°C (held for 5 min). Injection was carried out by splitless mode for 48 s with an injector temperature of 250°C. Electronic impact was used as ionization mode with ionization energy of 70 eV and source temperature of 200°C. Detection was performed monitoring the three most abundant isotope peaks from the mass spectra of each compound: m/z 246, 248, and 176 for *o,p'*-DDE; 246, 248, and 318 for *p,p'*-DDE; 235, 237, and 165 for *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDT, and *p,p'*-DDT. Quantification was carried out using PCB-209 and ¹³C-4,4-DDT as internal standards for PBDEs and DDXs, respectively. The described methods showed recoveries between 79 and 133% for PBDEs and 76 to 101% for DDXs. Reproducibility was below 21% in all cases.

Data modeling

The program Scientist® (Micromath Scientific Software, Salt Lake City, UT, USA) was used for mathematical modeling. The mass of the chemical remaining sorbed to the sediment at each step of the experiment (S_t) was normalized to the initial one (S_0) and fitted with the equation describing a desorption curve of three kinetically distinct phases [5]. They correspond to three different domains or binding pools within the sediment matrix that release the compounds simultaneous and independently one of each other and following first-order kinetics:

$$\frac{S_t}{S_0} = F_{\text{rap}} \cdot e^{-k_{\text{rap}} \cdot t} + F_{\text{slow}} \cdot e^{-k_{\text{slow}} \cdot t} + F_{\text{very slow}} \cdot e^{-k_{\text{very slow}} \cdot t}$$

where F_{rap} , F_{slow} , and $F_{\text{very slow}}$ are the fractions (dimensionless) of the chemical in the fast, slow, and very slow compartment at time zero; k_{rap} , k_{slow} , and $k_{\text{very slow}}$ are the desorption rate coefficients for respective compartments (per hour); and t is the time (h). Negligible amounts in the water phase and no significant readsorption to the sediment are assumed (this is possible because of the strong sorptive capacity of the Tenax). The amounts present in each fraction and the rate coefficients were determined by minimizing the sum of the squared residuals between experimental and calculated values of S_t/S_0 under the boundary condition that $F_{\text{rap}} + F_{\text{slow}} + F_{\text{very slow}} = 1$.

RESULTS AND DISCUSSION

Desorption kinetics

The mass of the chemical remaining sorbed to the sediment at each step of the experiment (S_t) was normalized to the initial one (S_0) and plotted versus time (Fig. 1). As can be seen in the graph, the shape of the curve agrees with the exponential decrease referred in literature for other compounds [5,6]. Variation between the three triplicates was below 18% in all cases. Deviation bars are not drawn in the figure because it would

be very confusing. The calculated data were fitted with the equation describing a desorption curve with three kinetically distinct phases [5]. The values obtained from this modeling are shown in Table 1. The correlation coefficients and the sum of squared deviations (all above 0.999 and below 0.004, respectively) are reported in the same table.

The magnitude of the obtained desorption rate constants demonstrates the existence in the sediment of fast ($k_{\text{rap}} = 0.04$ – 0.94 /h), slow ($k_{\text{slow}} = 0.002$ – 0.07 /h), and very slow fractions ($k_{\text{very slow}} = 0.00003$ – 1 /h) with values similar to the ones reported in other studies for PCBs and PAHs [12,17–19]. These values diminished for each fraction from low to highly brominated PBDE congeners. Both F_{rap} and F_{slow} were in general similar, as was found also by Cornelissen et al. [12], and they decrease when increasing the bromination degree (from 0.48–0.01) inversely to the very slow fractions, which acquire more importance for the highly brominated congeners (from 0.04–0.31). The DDXs gave values similar to those of the less brominated PBDEs.

The estimation of the complete curve of desorption that is needed to define the rapidly desorbing fraction is time and economically costly. For routine use, a simpler method is required. A few attempts of establishing a constant relationship between the rapidly desorbing fraction and the fraction extracted during a certain time can be found in literature. In this respect, Cornelissen et al. [12] reported a relationship between the chemicals desorbed in 6 h of Tenax extraction (better than with 30 h, also tested) and the rapidly desorbing fraction determined by fitting the consecutive desorption data to a model. They found that in a wide range of pollutants (PAHs, PCBs, and CBs) and sediments, this ratio was within a range of 0.38 to 10.26 with an average of 2.04. That means that the fraction desorbed in 6 h of extraction was approximately half the fraction rapidly desorbed. Other authors have validated this method for different pollutants and sediments by checking the correlation of the percentage desorbed during that time with the uptake of deposit-feeding organisms [14,20–22]. Indeed, it can be said that 6 h of Tenax extraction has become the reference method for quantifying the bioavailability of hydrophobic organic pollutants in sediment.

However, in some other experiments, different lengths of Tenax extraction have been used for describing the rapidly desorbing fraction. Shor et al. [23], for example, found that 24 h of Tenax extraction correlated well with F_{rap} . Kukkonen et al. [11], however, found that none of these two periods (6 or 24 h) were suitable surrogates for that fraction. Furthermore, Morrison et al. [13] correlated Tenax extraction of DDXs during 14 h with uptake by the earthworm *Eisenia foetida*.

In order to check the applicability of these estimations to the data obtained here, the ratios between the rapidly desorbing fraction and the accumulative amount extracted in 6 and 24 h for each compound (F_{rap}/F_6 and F_{rap}/F_{24}) were calculated (Table 1). The values resulting here for F_{rap}/F_6 ranged between 0.46 and 4.75 with an average of 1.62 ± 1.17 and 0.76 ± 0.04 for PBDEs and DDXs, respectively. All values are in the range reported in Cornelissen et al. [12]. Applying the criteria used in that study, F_{rap} could be calculated for PBDEs and DDXs as 1.62 and 0.76 part of the contaminant extracted during 6 h of Tenax extraction. On the other hand, when comparing F_{rap} with the fraction desorbed in 24 h calculated from the equation of the curve (F_{24}), it can be observed that F_{rap} is lower than F_{24} in almost all cases with F_{rap}/F_{24} ranging from 0.20 to 1.13 for PBDEs and from 0.42 to 0.62 for DDXs. For both evaluated

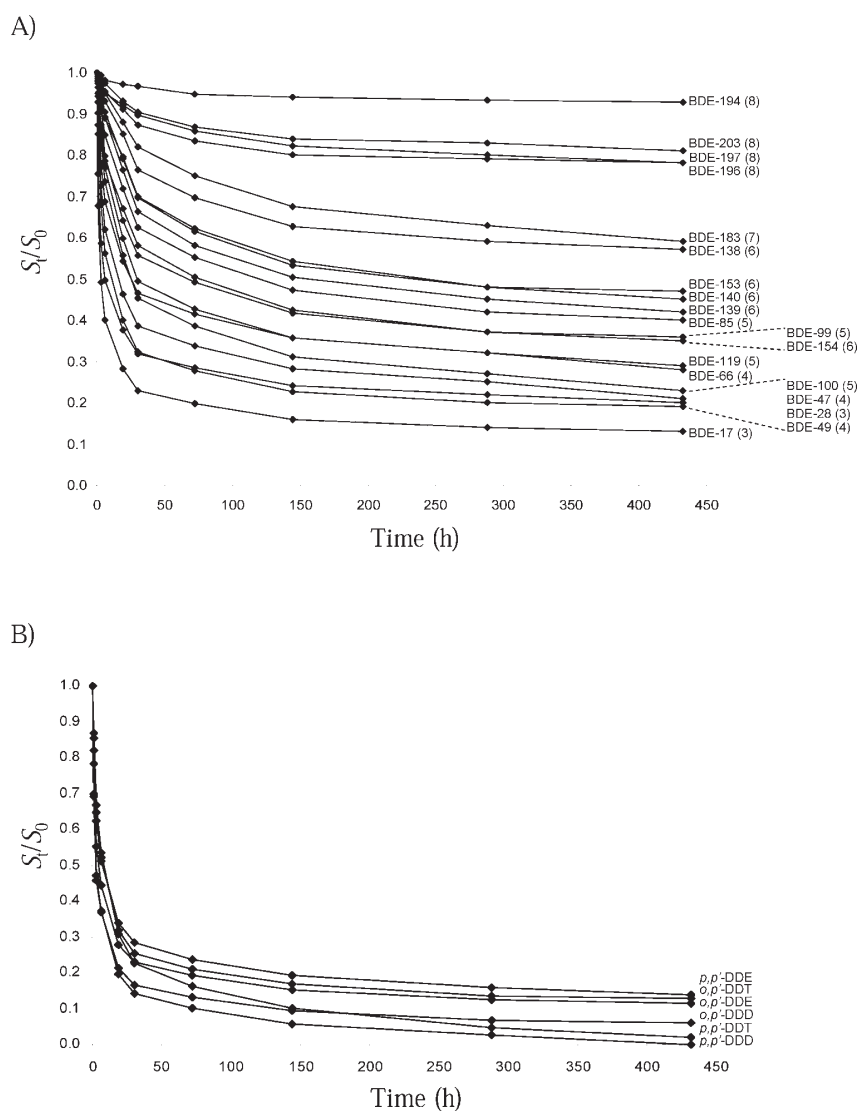


Fig. 1. Fraction of sorbed polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) (A) and DDT and metabolites (dichlorodiphenyldichloroethane [DDD] and dichlorodiphenyldichloroethylene [DDE]) (B) remaining in the sediment during the Tenax® (Buchem Apeldoorn, The Netherlands) extraction experiment. S_t = chemical remaining sorbed to the sediment at each step of the experiment; S_0 = chemical sorbed to the sediment initially.

relationships, we consider that the variation is too high to be used as a constant for the estimation of F_{rap} . These results, together with the different approaches reported in the literature, reflect a highly variable relationship of F_{rap} with any fraction extracted in a certain time, according with the differences in the shape of the curves. For an accurate estimation, the complete curve of desorption should be determined, or, at least, extraction should continue until the slow desorbing fraction is reached. However, this costly work cannot be included in routine sediment characterization, where a rapid and simple method that (although not definitive) provides an improvement over the simple total extraction is required. Because F_{24} gave an underestimation of F_{rap} for PBDEs in only three cases, whereas F_6 gave an underestimation of F_{rap} in 10 cases, we would recommend for PBDEs 24 h of Tenax extraction as a first

indicator for uptake in the food chain. Therefore, Tenax extraction during a fixed time and application of the previously calculated ratios between this fraction and F_{rap} can be useful in providing a preliminary estimation of (bio)available fractions in sediment.

Correlation with chemicals' properties

From the graph in Figure 1A, an inverse relationship can be inferred between the extent of desorption (chemical desorbed at a certain time) and velocity (given by the rates of desorption) with the degree of bromination of the PBDE (number of bromine atoms in brackets). This can be explained partially by the increase of the hydrophobicity of the PBDE molecule when bromination is higher. Cornelissen et al. [24] found for PAHs and PCBs in laboratory-contaminated sediments a

Table 1. Fractions, rate constants, and fitting parameters for the three-compartment model for the desorption of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and DDT and metabolites (dichlorodiphenyldichloroethane [DDD] and dichlorodiphenyldichloroethylene [DDE]) from sediment and fractions desorbed after 6 and 24 h of extraction and its relationship with the rapidly desorbing fraction. F_{rap} , F_{slow} , and $F_{\text{very slow}}$ = fractions of rapidly, slow, and very slow compounds, respectively. k_{rap} , k_{slow} , and $k_{\text{very slow}}$ = rate constants (per hour) for the rapidly, slow, and very slow fractions, respectively. ssq = sum of squared deviations of the applied model. r^2 = correlation coefficient of the applied model. F_6 and F_{24} = fractions of chemical desorbed in 6 and 24 h, respectively. Underestimations of the fractions released freely to the water are in italic (see also the text at the end of the *Desorption Kinetics* section)

	F_{rap}	k_{rap}	F_{slow}	k_{slow}	$F_{\text{very slow}}$	$k_{\text{very slow}}$	ssq	r^2	F_6	F_{rap}/F_6	F_{24}	F_{rap}/F_{24}
BDE-17	0.482	0.942	0.314	0.073	0.203	0.00116	0.0005	0.99978	0.6	0.8	0.75	0.65
BDE-28	0.4	0.851	0.318	0.061	0.282	0.00083	0.0003	0.99989	0.5	0.79	0.65	0.61
BDE-49	0.338	0.472	0.384	0.061	0.278	0.00099	0.0007	0.99975	0.44	0.77	0.64	0.53
BDE-47	0.258	0.535	0.391	0.067	0.351	0.00121	0.0006	0.99981	0.38	0.68	0.58	0.45
BDE-66	0.214	0.463	0.359	0.059	0.428	0.00095	0.0005	0.9986	0.31	0.68	0.49	0.43
BDE-100	0.153	0.383	0.463	0.053	0.386	0.00123	0.001	0.99976	0.27	0.57	0.49	0.31
BDE-119	0.272	0.157	0.305	0.034	0.417	0.00093	0.0009	0.9998	0.23	<i>1.18</i>	0.45	0.61
BDE-99	0.354	0.116	0.274	0.011	0.365	0.00005	0.0005	0.99989	0.2	<i>1.75</i>	0.4	0.88
BDE-85	0.31	0.082	0.264	0.01	0.417	0.00012	0.0009	0.99982	0.15	<i>2.03</i>	0.33	0.93
BDE-154	0.328	0.117	0.287	0.013	0.394	0.00028	0.0025	0.99949	0.21	<i>1.53</i>	0.38	0.86
BDE-153	0.248	0.066	0.262	0.009	0.485	0.00009	0.0008	0.99986	0.1	<i>2.56</i>	0.26	0.97
BDE-139	0.326	0.059	0.21	0.009	0.464	0.00025	0.0006	0.99989	0.11	<i>3.03</i>	0.29	<i>1.13</i>
BDE-140	0.257	0.059	0.225	0.012	0.517	0.00032	0.0004	0.99993	0.1	<i>2.69</i>	0.25	1.01
BDE-138	0.227	0.05	0.194	0.008	0.58	0.00006	0.0009	0.9987	0.07	<i>3.3</i>	0.19	<i>1.17</i>
BDE-183	0.077	0.06	0.228	0.017	0.694	0.00037	0.0005	0.99993	0.05	<i>1.54</i>	0.14	0.54
BDE-197	0.035	0.174	0.149	0.016	0.815	0.00007	0.0043	0.99999	0.05	0.71	0.08	0.42
BDE-203	0.131	0.037	0.054	0.002	0.812	0.00008	0.0001	0.99999	0.03	<i>4.75</i>	0.08	<i>1.56</i>
BDE-196	0.021	0.528	0.171	0.027	0.81	0.00009	0.0002	0.99998	0.04	0.46	0.1	0.2
BDE-194	0.017	0.228	0.046	0.018	0.938	0.00003	0	1	0.02	0.85	0.03	0.52
<i>o,p'</i> -DDE	0.449	0.585	0.352	0.074	0.201	0.001	0.0004	0.99983	0.56	0.81	0.75	0.6
<i>p,p'</i> -DDE	0.369	0.550	0.38	0.073	0.252	0.001	0.0003	0.99988	0.49	0.76	0.69	0.53
<i>o,p'</i> -DDD	0.503	0.826	0.351	0.082	0.148	0.002	0.0003	0.99985	0.63	0.8	0.81	0.62
<i>p,p'</i> -DDD	0.447	0.905	0.398	0.101	0.155	0.007	0.0002	0.99991	0.63	0.71	0.83	0.54
<i>o,p'</i> -DDT	0.358	0.440	0.428	0.073	0.217	0.001	0.0005	0.99981	0.48	0.75	0.71	0.5
<i>p,p'</i> -DDT	0.339	0.396	0.48	0.066	0.184	0.033	0.0006	0.99979	0.46	0.73	0.82	0.42

relationship of $\log(F_{\text{slow}}/F_{\text{rap}})$ with $\log K_{\text{OC}}$ and a correlation of k_{slow} with the molecular weight. Shor et al. [23] reported a correlation of the PAHs desorbed during 1 d from a field-contaminated sediment and their K_{OW} for a sediment but not for another one. Figure 2 shows the relationship between F_{rap} , F_6 , and F_{24} and the $\log K_{\text{OW}}$ for DDXs and some environmentally relevant PBDEs. Correlation coefficient is higher for F_6 and F_{24} (0.93 and 0.88, respectively) than for F_{rap} (0.68). Since the values for K_{OW} reported in literature for a certain chemical are highly variable, for PBDEs we have used only existing K_{OW} data determined in the same way [25]. The \log

K_{OW} for PBDEs ranged from 5.74 (BDE-17) to 8.27 (BDE-183). The $\log K_{\text{OW}}$ for DDXs (5.87–6.79) was calculated with the KOWWIN 1.57 software package (Syracuse Research, North Syracuse, NY, USA).

The reason that this correlation has not often been reported could be that in field-contaminated sediments, it is hidden by the differences in aging and concentration among pollutants. For example, for a range of PCBs, a behavior similar to that of PBDEs could be expected regarding the number of chlorine atoms. However, Moermond et al. [20] did not find a correlation between 6-h Tenax-extracted PCBs and their K_{OW} . Also, when correlating data for PCBs reported by van Noort et al. [26] with their K_{OW} [27], no correlation becomes apparent.

On the other hand, the increase in the number of bromine atoms implies a correlative increase in the molecular weight (from 407 atomic mass units of triBDEs to 801 atomic mass units of octa-BDE). This fact could contribute to strengthen the decrease of the extent of desorption reported previously, as larger molecules diffuse more slowly through organic matter or narrow micropores [24]. The molecular weight of DDXs ranges from 318 to 354 atomic mass units, fitting into the low part of the range of PBDE molecular weights.

It was not possible to measure the desorption of the decabrominated congener BDE-209 because it was not recovered with the microwave-assisted extraction method. However, from the tendency showed in Figure 1 of increasing sequestration simultaneously to the number of bromine atoms (BDE-209 $\log K_{\text{OW}} \approx 10$ and molecular wt = 961 [28]; <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc162.htm>), an almost complete sequestration of this compound can be easily supposed. This would explain on its own and complementarily to

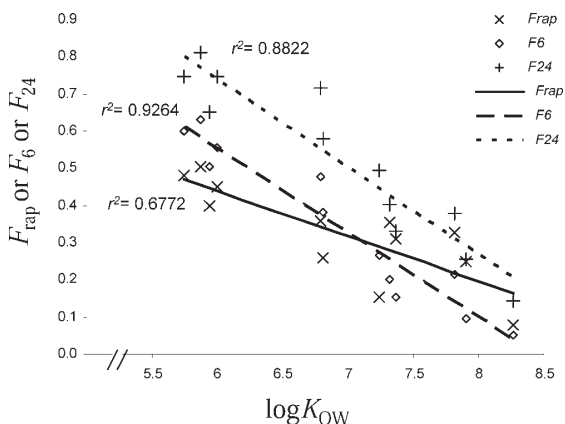


Fig. 2. Desorbing fractions against $\log K_{\text{OW}}$. F_{rap} = rapidly desorbing fraction; F_6 and F_{24} = fractions of chemical desorbed in 6 and 24 h, respectively.

studies of uptake by organisms [29] that BDE-209 does not accumulate in biota the same way as it does in sediment [30].

Research has shown that desorption from field-contaminated sediments is slow compared to freshly added chemicals [13,31]. The results obtained in the present study show how physical availability of a released contaminant can be much lower than its total concentration even after a relative short contact time or aging (12 d), as this was sufficient to originate significant slow and very slow desorbing fractions. This fact was reported also for PAHs by Gomez-Lahoz et al. [32] after 7 d of aging. Here, even after 432 h of extraction, the desorbed fraction for the highly brominated PBDEs constituted a very small percentage of the compound added to the sediment at the beginning of the experiment.

CONCLUSIONS

Tenax extraction can be used to measure the easily desorbing fraction of a pollutant in sediment, providing, at least, an improvement over the simple total extraction techniques. Here, the desorption curve of PBDEs and DDT and metabolites from sediment during 432 h has been estimated, and the ratios between the rapidly desorbing fraction and the fraction desorbed during a fixed time (6 or 24 h) were calculated. Our results confirm that those ratios are quite variable so that, when possible, a long time measure of desorption is recommended. Analyte desorption correlated inversely with their hydrophobicity. This tendency suggests a very low bioavailability for highly brominated PBDEs that must be taken into account when assessing the risk that these pollutants imply in the environment.

Acknowledgement—The present study received financial support from the European Union under the AQUATERRA (505428) project and the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (Acción Complementaria CTM2005-25168-E and project CEMAGUA, CGL2007-64551/HID). The present study reflects only the authors' views and the European Community is not liable for any use that may be made of the information contained therein. Agustina de la Cal acknowledges grants from Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya (2003FI 00092 and 2005BE 00540). We thank G. Marsh for supplying the individual PBDEs standards. Both R. Chalor and D. Fanjul are thanked for assistance with the work.

REFERENCES

- Alexander M. 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environ Sci Technol* 34: 4259–4265.
- Hatzinger PB, Alexander M. 1995. Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environ Sci Technol* 29:537–545.
- Ogram AV, Jessup RE, Ou LT, Rao PSC. 1985. Effects of sorption on biological degradation rates of (2,4-dichlorophenoxy)acetic acid in soils. *Appl Environ Microbiol* 49:582–587.
- Voie OA, Johnsen A, Rosslund HK. 2002. Why biota still accumulate high levels of PCB after removal of PCB contaminated sediments in a Norwegian fjord. *Chemosphere* 46:1367–1372.
- Cornelissen G, Rigterink H, van Noort PCM, Govers HAJ. 2000. Slowly and very slowly desorbing organic compounds in sediments exhibit Langmuir-type sorption. *Environ Toxicol Chem* 19: 1532–1539.
- Ten Hulscher TEM, Vrind BA, Van den Heuvel H, Van der Velde LE, Van Noort PCM, Beurskens JEM, Govers HAJ. 1999. Triphasic desorption of highly resistant chlorobenzenes, polychlorinated biphenyls, and polycyclic aromatic hydrocarbons in field contaminated sediment. *Environ Sci Technol* 33:126–132.
- Puglisi E, Murk AJ, van den Berg HJ, Grotenhuis JTC. 2007. Extraction and bio-analysis of the ecotoxicological relevant fraction of contaminants in sediments. *Environ Toxicol Chem* 26: 2122–2128.
- Pignatello JJ. 1990. Slowly reversible sorption of aliphatic halocarbons in soils. 1. Formation of residual fractions. *Environ Toxicol Chem* 9:1107–1115.
- Cornelissen G, Rigterink H, Ferdinandy MMA, Van Noort PCM. 1998. Rapidly desorbing fractions of PAHs in contaminated sediments as a predictor of the extent of bioremediation. *Environ Sci Technol* 32:966–970.
- Kraaij R, Seinen W, Tolls J. 2002. Direct evidence of sequestration in sediments affecting the bioavailability of hydrophobic organic chemicals to benthic deposit-feeders. *Environ Sci Technol* 36: 3525–3529.
- Kukkonen JVK, Landrum PF, Mitra S, Gossiaux DC, Gunnarsson J, Weston D. 2004. The role of desorption for describing the bioavailability of select polycyclic aromatic hydrocarbon and polychlorinated biphenyl congeners for seven laboratory-spiked sediments. *Environ Toxicol Chem* 23:1842–1851.
- Cornelissen G, Rigterink H, ten Hulscher DEM, Vrind BA, van Noort PCM. 2001. A simple Tenax® (R) extraction method to determine the availability of sediment-sorbed organic compounds. *Environ Toxicol Chem* 20:706–711.
- Morrison DE, Robertson BK, Alexander M. 2000. Bioavailability to earthworms of aged DDT, DDE, DDD, and dieldrin in soil. *Environ Sci Technol* 34:709–713.
- Ten Hulscher TEM, Postma J, Den Besten PJ, Stroomberg GJ, Belfroid A, Wegener JW, Faber JH, Van der Pol JJC, Hendriks AJ, Van Noort PCM. 2003. Tenax extraction mimics benthic and terrestrial bioavailability of organic compounds. *Environ Toxicol Chem* 22:2258–2265.
- Eljarrat E, Lacorte S, Barceló D. 2002. Optimization of congener-specific analysis of 40 polybrominated diphenyl ethers by gas chromatography/mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 37:76–84.
- de la Cal A, Eljarrat E, Raldúa D, Durán C, Barceló D. 2008. Spatial variation of DDT and its metabolites in fish and sediment from Cinca River, a tributary of Ebro River (Spain). *Chemosphere* 70:1182–1189.
- Greenberg MS, Burton GA, Landrum PF, Leppanen MT, Kukkonen JVK. 2005. Desorption kinetics of fluoranthene and trifluralin from Lake Huron and Lake Erie, USA, sediments. *Environ Toxicol Chem* 24:31–39.
- Kraaij RH, Ciarelli S, Tolls J, Kater BJ, Belfroid A. 2001. Bioavailability of lab-contaminated and native polycyclic aromatic hydrocarbons to the amphipod *Corophium volutator* relates to chemical desorption. *Environ Toxicol Chem* 20:1716–1724.
- Kukkonen JVK, Landrum PF, Mitra S, Gossiaux DC, Gunnarsson J, Weston D. 2003. Sediment characteristics affecting desorption kinetics of select PAH and PCB congeners for seven laboratory spiked sediments. *Environ Sci Technol* 37:4656–4663.
- Moermond CTA, Roozen F, Zwolsman JJG, Koelmans AA. 2004. Uptake of sediment-bound bioavailable polychlorobiphenyls by benthivorous carp (*Cyprinus carpio*). *Environ Sci Technol* 38: 4503–4509.
- Moermond CTA, Zwolsman JJG, Koelmans AA. 2005. Black carbon and ecological factors affect in situ biota to sediment accumulation factors for hydrophobic organic compounds in flood plain lakes. *Environ Sci Technol* 39:3101–3109.
- You J, Landrum PF, Lydy MJ. 2006. Comparison of chemical approaches for assessing bioavailability of sediment-associated contaminants. *Environ Sci Technol* 40:6348–6353.
- Shor LM, Rockne KJ, Taghon GL, Young LY, Kosson DS. 2003. Desorption kinetics for field-aged polycyclic aromatic hydrocarbons from sediments. *Environ Sci Technol* 37:1535–1544.
- Cornelissen G, vanNoort PCM, Govers HAJ. 1997. Desorption kinetics of chlorobenzenes, polycyclic aromatic hydrocarbons, and polychlorinated biphenyls: Sediment extraction with Tenax® (R) and effects of contact time and solute hydrophobicity. *Environ Toxicol Chem* 16:1351–1357.
- Braekvelt E, Tittlemier SA, Tomy GT. 2003. Direct measurement of octanol-water partition coefficients of some environmentally relevant brominated diphenyl ether congeners. *Chemosphere* 51: 563–567.
- van Noort PCM, Cornelissen G, ten Hulscher TEM, Belfroid A. 2002. Influence of sorbate planarity on the magnitude of rapidly desorbing fractions of organic compounds in sediment. *Environ Toxicol Chem* 21:2326–2330.
- Mackay D, Shiu WY, Ma KC. 1991. *Illustrated Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals*. CRC, Boca Raton, FL, USA.

28. World Health Organization/International Program of Chemical Safety. 1994. *Environmental Health Criteria 162: Brominated Diphenyl Ethers*. Geneva, Switzerland.
29. Kierkegaard A, Balk L, Tjarnlund U, De Wit CA, Jansson B. 1999. Dietary uptake and biological effects of decabromodiphenyl ether in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Sci Technol* 33:1612–1617.
30. Voorspoels S, Covaci A, Maervoet J, Schepens P. 2004. PBDEs in marine and freshwater sediments from Belgium: Levels, profiles, and relations with biota. *J Environ Monit* 6:914–918.
31. Lamoureux EM, Brownawell BJ. 1999. Chemical and biological availability of sediment-sorbed hydrophobic organic contaminants. *Environ Toxicol Chem* 18:1733–1741.
32. Gomez-Lahoz C, Ortega-Calvo JJ. 2005. Effect of slow desorption on the kinetics of biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Sci Technol* 39:8776–8783.

■ 3.4. Discusión de resultados

3.4.1. Desorción de PBDE, DDX y HBCD

El trabajo experimental incluido en este capítulo de la memoria permitió abordar por primera vez la accesibilidad de los PBDE que se acumulan en sedimentos y también por primera vez la accesibilidad de los DDX de manera isómero-específica. Mediante la aplicación de la extracción parcial con Tenax se pudo diferenciar la fracción susceptible de pasar a la fase disuelta rápidamente (fácilmente disponible para los organismos vivos) de la carga total de PBDE y DDX que es recuperada mediante las técnicas de extracción exhaustiva como la SPLE aplicada en el Capítulo 2 o la MAE, en este caso. La formación de una fracción residual de contaminante de desorción muy lenta tan solo en 12 días de equilibración en el sedimento --predominante en el caso de los PBDE más bromados-- confirma la rápida asociación irreversible de estos contaminantes con la fase particulada, con la consecuente pérdida de biodisponibilidad.

El sedimento estudiado en el Artículo #5 procedía de un muestreo en el río Cinca, en el año 2006, realizado en los mismos puntos de muestreo que la campaña descrita en el Capítulo 2 de esta memoria. Con el fin de poder analizar el comportamiento de cada uno de estos compuestos en igualdad de condiciones y visibilizar las diferencias según el grado de bromación y según el patrón de cada isómero se utilizó sedimento fortificado en el laboratorio con una mezcla de DDX y de tri- a decaBDE. El experimento descrito se llevó a cabo concretamente con el sedimento procedente del punto aguas arriba del foco de contaminación, donde los niveles de contaminación que se habían encontrado eran casi negligibles (ver Artículos #3 y #4). Además, paralelamente se realizó una extracción del sedimento en el foco de contaminación en Monzón, donde se habían encontrado los mayores niveles de contaminación por PBDE, DDX y HBCD en la campaña anterior. El análisis de los extractos del sedimento de Monzón con LC-MS, a diferencia de la GC utilizada en el Capítulo 2, permitió cuantificar los tres isómeros de HBCD por separado. La extracción exhaustiva mediante SPLE de este sedimento dio una concentración de 2400 ng/g dw (ver Figura 24) dominada por el γ -HBCD, que constituyó un 96%. La Figura 28 muestra la curva de desorción obtenida mediante la extracción con Tenax.

En ambos experimentos se pudo observar la presencia de fracciones fuertemente resistentes a la desorción incluso después de 432 h de extracción --presumiblemente formadas por la difusión de los contaminantes hacia formas condensadas de materia orgánica--, aunque en proporciones notablemente diferentes. A pesar de ser menos hidrofóbico que los PBDE, entre un 40-55% del HBCD se mantuvo retenido por el sedimento al final del experimento, proporción similar a la de los hexaBDE en el sedimento fortificado. Además, si se compara la Figura 28 con las curvas de desorción obtenidas en el estudio descrito en el Artículo #5 para PBDE y DDX, se puede observar que la tasa inicial de desorción no fue tan pronunciada, probablemente por tratarse de sedimentos contaminados en el campo, con más tiempo de contacto que los 12 días de equilibración del sedimento fortificado en el laboratorio.

Las diferencias de comportamiento de desorción de PBDE y DDX y HBCD en el sedimento del río Cinca contribuyen a justificar la variación en el perfil de contaminantes entre sedimento y biota del Capítulo 2. La baja disponibilidad de los congéneres de PBDE más bromados (ver Figura 1 del artículo #5) puede justificar por qué estos son menos predominantes en peces que en sedimento. También son consistentes con estudios de biodisponibilidad realizados con biota.

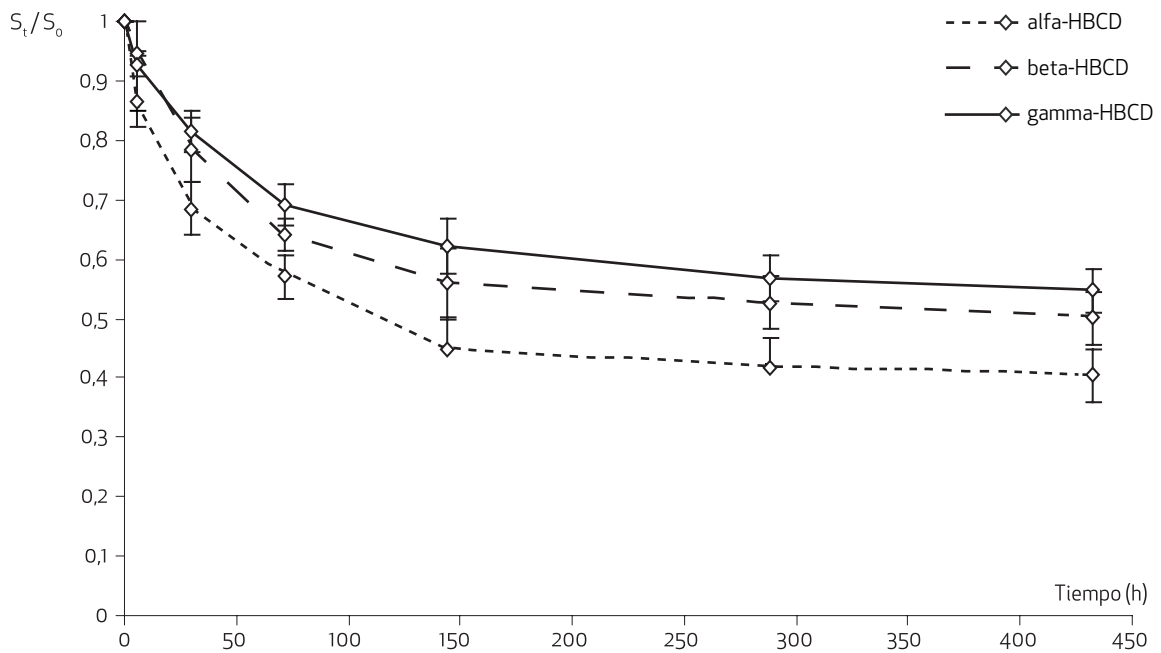


Figura 30. Curva de desorción de los tres isómeros de HBCD en el sedimento del punto 3, aguas abajo de Monzón.

Tanto Liang *et al.* (2010) como Zhang *et al.* (2013), p. ej., han podido comprobar que la bioacumulación por gusanos de los PBDE en suelos disminuye con el aumento del K_{ow} , igual que lo hacen las concentraciones libremente disueltas.

La mayor retención del DDT por parte del sedimento respecto a sus metabolitos, en consonancia con su hidrofobicidad, también justificaría los resultados obtenidos en el capítulo 1, donde la proporción de p,p'-DDE fue mayor proporcionalmente en los peces que en los sedimentos. Esta diferencia en cuanto a la retención de los DDX también ha sido puesta de manifiesto por otros estudios (Menchai *et al.*, 2008; Hale *et al.*, 2009). Además, en el Artículo #6 se observó que las F_{rap} de los isómeros p,p'- son ligeramente menores que las de los o,p'-DDX (Tabla 1 del artículo #6). Baczynski *et al.* (2010), p. ej., observaron como la biodegradación anaeróbica en suelos era mayor para el o,p'-DDT que para el p,p'-DDT, que se relacionaban la diferencia de desorción de ambos isómeros. En cambio, en los sedimentos del canal Lauritzen (USA), Hale *et al.* (2009), que utilizaron muestreadores pasivos para estudiar las distribuciones de masa de los isómeros de DDX, vieron que los p,p'- presentaban una desorción mayor que los o,p'-DDX correspondientes.

De la misma forma, la tendencia de los tres isómeros de HBCD con una desorción fue más rápida y más extensa para el isómero α y más baja para el isómero γ , es coherente con la tendencia de sus solubilidades en agua, que disminuyen en el orden $\alpha > \beta > \gamma$ (Hunziker *et al.*, 2004) y la del $\log K_{ow}$ ($5.07 < 5.12 < 5.47$, respectivamente (Hayward *et al.*, 2006). Junto con la bioisomerización (Law *et al.*, 2006b) y la diferencias en el metabolismo de los tres isómeros (Zegers *et al.*, 2005) que se han publicado para este compuesto, las diferencias en la capacidad de desorción que se derivan de la gráfica podrían explicar en parte (hasta un 15% en este caso) por qué la acumulación de α -HBCD en la biota es comúnmente favorecida respecto a su bajo

contenido en la mezcla técnica. Los resultados que se obtuvieron en este trabajo fueron completados posteriormente en el laboratorio con un estudio en el que se estudió la acumulación en peces cebra expuestos al effluente de una de las industrias causantes de la contaminación por HBCD en Monzón durante 12 días y su depuración al exponerlos a agua limpia durante 9 y 16 días (Guerra *et al.*, 2009). Los resultados indicaron que la depuración del isómero γ (70% en 9 días) es mayor que la de α - y β -HBCD (46 y 27% en 9 días), lo que también concuerda con la predominancia de α -HBCD en biota.

Recientemente, otros autores han realizado extracciones parciales de sedimentos fortificados con estos contaminantes también y han proporcionado valores de F_{rap} . Liu *et al.*, (2011a) estudió la desorción de tres sedimentos diferentes fortificados e incubados durante 7 y 14 días antes con 11 tetra- a decaBDE. En los sedimentos incubados 14 días encontraron fracciones residuales mayores que las nuestras, desde $0,76 \pm 0,08$ para el BDE-47 hasta $0,89 \pm 0,04$ para el BDE-183 (frente a 0,35 y 0,69, respectivamente, en nuestro caso). Inversamente, las fracciones de desorción rápida fueron hasta 4 veces menores en su experimento. Con solo 7 días de equilibración, en cambio, las fracciones residuales formadas fueron similares a las nuestras (0,31-0,77 para BDE-47 y BDE-183, respectivamente). Las F_{vs} estimadas por Sormunen *et al.* (2009a) en tres sedimentos de ríos europeos con TOC similar (-5-7% del peso seco) fortificados e incubados 6 semanas con BDE-99 pero distinto contenido en carbono negro, fueron también mayores que las nuestras (0,58-0,75). En cambio, estos mismos autores (Sormunen *et al.*, 2009b), en sedimentos del lago Kuorinka con un TOC menor ($0,39 \pm 0,04\%$) enriquecidos con BDE-47 e incubados durante meses observaron un comportamiento similar al nuestro para este compuesto ($F_{rap} = 0,435 \pm 0,112$).

Los estudios publicados que tratan de estimar la bioaccesibilidad del DDT y el DDE en suelos y sedimentos han sido mucho más frecuentes. Además, mientras que los trabajos sobre PBDE se han llevado a cabo con sedimentos fortificados en el laboratorio --ya que las concentraciones a que estos contaminantes suelen encontrarse en el campo no son suficientes para poder detectar el compuesto extraído en cada una de las etapas del experimento--, en el caso de los DDX se ha podido evaluar la accesibilidad en sedimentos contaminados décadas atrás. Yang *et al.*, (2010) estudiaron la accesibilidad de p,p'-DDT y p,p'-DDE derivados del uso de DDT y de dicofol en el cultivo de algodón durante décadas en suelos de China. En dichos experimentos, el comportamiento inicial de estos dos contaminantes fue similar al nuestro, con F_{rap} de $0,314 \pm 0,050$ y $0,338 \pm 0,062$ para p,p'-DDE y p,p'-DDT, respectivamente (en el Artículo #5 se obtuvieron unas F_{rap} estimadas de 0,369 para el p,p'-DDE y de 0,339 para el p,p'-DDT). Sin embargo, las cantidades de contaminante residual de extracción muy lenta fueron casi dos veces mayores en estos suelos que en nuestro estudio ($0,392 \pm 0,101$ y $0,393 \pm 0,100$ frente a 0,252 y 0,184). You *et al.* (2007), que aplicaron las mismas condiciones en dos sedimentos distintos fortificados e incubados a 4°C durante 7 días con p,p'-DDE, encontraron una diferencia significativa entre ellos (F_{rap} de $0,250 \pm 0,021$ y de $0,538 \pm 0,082$), relacionada presumiblemente con las características del sedimento. No hemos encontrado ningún estudio que haya analizado la desorción y haya proporcionado valores de F_{rap} para el HBCD, que nos permita establecer comparaciones.

3.4.2. Estandarización de la extracción con Tenax

En general, las diferencias entre los porcentajes extraídos de una misma sustancia en distintos sedimentos reflejan la especificidad de la bioaccesibilidad de los contaminantes dependiendo de las características intrínsecas del sedimento, especialmente la cantidad (Borglin *et al.*, 1996) y tipo de materia orgánica que lo forma (Kukkonen *et al.*, 2003), así como del tiempo y las condiciones en que los contaminantes han estado en contacto con el sedimento (Pignatello & Xing, 1996). En el caso del trabajo de (Liu *et al.*, 2011a) mencionado más arriba, p. ej., uno de los factores que pueden justificar la menor biodisponibilidad es que la incubación de su sedimento se realizó a temperatura ambiente, mientras que en el artículo #5 se llevó a cabo a 4°C. Una temperatura mayor favorece el movimiento de los contaminantes en las partículas del sedimento (Sormunen *et al.*, 2009a, b). En este sentido, es importante también normalizar o tener en cuenta la granulometría del sedimento. En nuestros trabajos, como en la mayor parte de los experimentos con Tenax, se partió de sedimento tamizado a 2 mm (Yang *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011a), pero otros se han hecho con fracciones más finas (Sormunen *et al.*, 2009a, b), que favorecen la acumulación de HOCs debido a su mayor contenido orgánico.

Por otra parte, aunque en los últimos años, el número de artículos relacionados con la aplicación de Tenax para evaluar la bioaccesibilidad se ha incrementado, convirtiéndose en una técnica de referencia, existen algunas diferencias en el diseño experimental de los distintos trabajos que pueden ser responsables de parte de las variaciones entre las F_{rap} publicadas. Una de ellas es la duración de los experimentos. Cuanto mayor es la duración del experimento y el número de etapas, más precisa es la estimación de las distintas fracciones. Liu *et al.* (2011a), p. ej., prolongaron el experimento hasta 45 días en lugar de 18 (nosotros), permitiendo cuantificar mejor la fracción muy lenta. Más importante aún es que la estimación de la fracción bioaccesible se ha hecho de distintas maneras, no siempre se ha realizado la curva de desorción completa, de operativa difícil en rutina, sino que se han hecho extracciones con Tenax en una sola etapa de extracción durante un tiempo determinado, mayoritariamente 6h como propuso (Cornelissen *et al.*, 2001), 24 h como propuso (Shor *et al.*, 2003) u otros tiempos (Morrison *et al.* (2000) había encontrado que todos los DDX se extraían en 18h). En el Artículo #5 se trató de validar alguna de estas propuestas para nuestros compuestos. Sin embargo, se llegó a la conclusión de que la relación de F_{rap} con cualquier fracción en un tiempo determinado era muy variable y se recomienda una extracción mínima de 24 h, ya que es un tiempo suficiente para extraer la F_{rap} para casi todos los analitos en consideración.

Para poder usar la fracción desorbida durante un tiempo estándar como representante de la fracción de desorción rápida, este sustituto tendría que tener una relación constante con la F_{rap} , independientemente de las características del sedimento, la magnitud de la F_{rap} y de las propiedades del compuesto. En una publicación reciente, van Noort *et al.* (2014) discuten la idoneidad de la F_{6h} y F_{24h} como sustituto de la F_{rap} a partir de los datos disponibles en la literatura científica. Basándose en la variación de las relaciones F_{6h}/F_{rap} y F_{24h}/F_{rap} con el K_{ow} de los compuestos y con el tamaño de la F_{rap} , recomiendan el uso de la F_{24h} , en concordancia con la conclusión a que se llegó en este trabajo. En promedio de todos los compuestos y tipos de sedimentos, la F_{rap} hace por un 70% de la F_{24h} . Si se observa la Tabla 16, que muestra los valores recogidos de la bibliografía para esos parámetros, se puede extraer que la variabilidad asociada al cociente F_{24h}/F_{rap} es inferior al 30%, mientras que la asociadas al F_{6h}/F_{rap} alcanza el 50%.

3.4.3. Evolución de la técnica

La variación en los cocientes F_o/F_{rap} que se desprende de la comparación entre los diferentes trabajos publicados (van Noort *et al.*, 2014) puede ser asumible cuando se quiere determinar las fracciones correlacionadas con la biodisponibilidad de contaminantes orgánicos, en un método operacional y semicuantitativo (Harmsen, 2007). Sin embargo, las evaluaciones de riesgo deben abarcar la variabilidad entre individuos y deben ser aplicables en una amplia gama de tipos de sedimento o suelo y circunstancias, adoptando una posición de precaución que se apoye en métodos científicos validados. Por ello, a pesar de que cada vez es más reconocido que los conceptos sobre la disponibilidad desempeñan un papel fundamental en la evaluación de riesgos, y de la evidencia de procesos de dispersión y degradación natural que conducen a una reducción de las concentraciones de contaminantes con el tiempo, son escasas las normas sobre la forma de traducir esta información en la toma de decisiones y generalmente se adopta una posición conservadora donde dicha información es obviada. En el caso de los POP, que conllevan un riesgo incluso a niveles de exposición bajos y que comúnmente aparecen en mezclas, establecer métodos de referencia que permitan incluir estos conceptos y reducir el nivel de conservadurismo dentro de la normativa sin causar un riesgo potencial para la salud es aún más complicado.

En cualquier caso, la inclusión de información sobre la biodisponibilidad o bioaccesibilidad aumentan el conjunto de herramientas disponibles en las evaluaciones de riesgo de lugares contaminados, contribuyendo a una evaluación más realista que puede suponer un paso adelante en la disyuntiva coste-beneficio y facilitar la gestión eficaz de estos casos, especialmente cuando se evalúan estrategias de remediación. Puesto que la biodisponibilidad depende de variables tales como el contaminante, el organismo en cuestión, y las propiedades reales del medio, cualquier método utilizado para medirla no debe utilizar solo la palabra biodisponibilidad sino también referirse a estas variables. Un primer paso en el proceso de normalización fue la publicación en 2008 de la norma ISO 17402 (ISO, 2008) sobre calidad de suelos (y aplicable a sedimentos), que promueve la introducción del concepto de biodisponibilidad estableciendo los requisitos para la selección y aplicación de métodos para diferentes especies objetivo y en el contexto de las circunstancias específicas del lugar con respecto a varias clases de contaminantes. Aunque en las extracciones parciales la desorción del sedimento sea el factor limitante y, por tanto, independiente del material (Tenax, ciclodextrinas, XAD, etc) siempre que la cantidad de absorbente sea suficiente (Brack *et al.*, 2009), es importante establecer unas condiciones estandarizadas que eviten las variaciones derivadas del diseño experimental. Actualmente está en desarrollo una norma ISO para la “Determinación de la disponibilidad potencial usando un adsorbente fuerte o un agente complejante” (ISO/AWI 16751-1), que incluye Tenax y Ciclodextrinas.

Tabla 16. Valores de los parámetros de ajuste y las relaciones entre F_{rap} , F_6 o F_{24} que se derivan de los experimentos de extracción de sedimentos y suelos con Tenax publicados hasta la fecha (promedios y desviaciones estándar calculados a partir de los datos publicados por Van Noort et al., (2014).

Compuestos	Log K_{ow}	k_{rap}	k_{slow}	k_{vs}	F_{rap}	F_{slow}	F_{vs}	F_6/F_{rap}	F_{24}/F_{rap}	Referencias
PAH	4,2-7,0	0,92 (±0,64)	0,031 (±0,015)	0,00022 (±0,000014)	0,199 (±0,074)	0,086 (±0,026)	0,715 (±0,085)	0,99 (±0,15)	1,24 (±0,10)	(Van Noort et al., 2003)
		0,15 (±0,12)	0,014 (±0,011)	0,00066 (±0,000042)	0,282 (±0,141)	0,244 (±0,048)	0,473 (±0,180)	0,57 (±0,33)	1,05 (±0,31)	(Kukkonen et al., 2004)
		0,63 (±0,10)	0,009 (±0,003)	0,00013 (±0,000022)	0,440 (±0,082)	0,117 (±0,083)	0,443 (±0,159)	0,99 (±0,02)	0,99 (±0,02)	(Lamoureux and Brownawell, 2004)
		0,91 (±0,58)	0,028 (±0,015)	0,00123 (±0,000022)	0,578 (±0,041)	0,297 (±0,036)	0,127 (±0,012)	1,03 (±0,11)	1,25 (±0,10)	(Gomez-Lahoz and Ortega-Calvo, 2005)
		0,47 (±0,11)	0,029 (±0,004)	0,00021 (±0,000004)	0,410 (±0,059)	0,136 (±0,019)	0,452 (±0,043)	0,99 (±0,05)	1,18 (±0,06)	(Greenberg et al., 2005)
		0,25 (±0,22)	0,010 (±0,006)	0,00019 (±0,000012)	0,177 (±0,032)	0,249 (±0,031)	0,569 (±0,040)	0,74 (±0,38)	1,23 (±0,25)	(Leppänen and Kukkonen, 2006)
		0,44 (±0,09)	0,046 (±0,005)	0,00320 (±0,000235)	0,557 (±0,075)	0,274 (±0,012)	0,170 (±0,084)	1,05 (±0,05)	1,35 (±0,03)	(You et al., 2007)
		0,07 (±0,01)	0,010 (±0,001)	0,00040 (±0,000007)	0,183 (±0,062)	0,258 (±0,045)	0,555 (±0,106)	0,45 (±0,03)	1,15 (±0,08)	(Sormunen et al., 2009b)
		1,23 (±0,45)	0,201 (±0,087)	0,01263 (±0,000550)	0,591 (±0,087)	0,258 (±0,051)	0,151 (±0,054)	1,29 (±0,16)	1,45 (±0,17)	(Rhodes et al., 2010)
		2,15 (±2,33)	0,036 (±0,008)	0,00065	0,198 (±0,095)	0,245 (±0,133)	0,558 (±0,228)	1,21 (±0,10)	1,71 (±0,16)	(Cui et al., 2010)
PCDD/F	6,6-8,9	0,272 (±0,260)	0,00078 (±0,00158)	0,074 (±0,071)	0,083 (±0,060)	0,843 (±0,111)	1,36 (±0,21)	1,91 (±0,48)	6,11 (±2,96)	(Poot et al., 2014)
		0,27 (±0,09)	0,016 (±0,005)	0,00005 (±0,000004)	0,022 (±0,020)	0,037 (±0,026)	0,943 (±0,046)	0,87 (±0,27)	1,53 (±0,28)	(Sormunen et al., 2008a)
		0,18 (±0,04)	0,012 (±0,005)	0,00003 (±0,000010)	0,016 (±0,006)	0,027 (±0,009)	0,956 (±0,015)	0,80 (±0,20)	1,48 (±0,29)	(Sormunen et al., 2008a)
		0,03 (±0,01)	0,019 (±0,020)	0,00020 (±0,000000)	0,208 (±0,063)	0,110 (±0,038)	0,675 (±0,067)	0,30 (±0,10)	0,81 (±0,21)	(Sormunen et al., 2009a)

Tabla 16. (Continuación)

Compuestos	Log K_{ow}	Kr_{sp}	k_{slow}	k_{vs}	F_{rap}	F_{slow}	F_{vs}	F_d/F_{rap}	F_{24}/F_{rap}	Referencias
Clorobencenos	3.4-5.5	0.55 (± 0.29)	0.025 (± 0.015)	0.00017 (± 0.00013)	0.040 (± 0.030)	0.052 (± 0.043)	0.908 (± 0.059)	1.17 (± 0.35)	1.85 (± 0.82)	(Van Noort et al., 2003)
		0.27 (± 0.04)	0.007 (± 0.003)	0.00026 (± 0.00024)	0.380 (± 0.075)	0.470 (± 0.121)	0.150 (± 0.046)	0.85 (± 0.05)	0.85 (± 0.05)	(Lamoureaux and Brownawell, 2004)
		10.94	0.406	0.0005	0.138	0.183	0.679	2.22	2.38	(Song et al., 2011)
PCB	5.8-6.9	0.34 (± 0.21)	0.029 (± 0.011)	0.00060 (± 0.00020)	0.172 (± 0.079)	0.201 (± 0.104)	0.627 (± 0.141)	1.01 (± 0.16)	1.66 (± 0.42)	(Van Noort et al., 2003)
		0.11 (± 0.04)	0.012 (± 0.006)	0.00054 (± 0.00005)	0.417 (± 0.043)	0.241 (± 0.032)	0.337 (± 0.057)	0.52 (± 0.13)	1.06 (± 0.13)	(Leppänen et al., 2003)
		0.08 (± 0.05)	0.011 (± 0.004)	0.00042 (± 0.00013)	0.399 (± 0.113)	0.219 (± 0.039)	0.380 (± 0.100)	0.39 (± 0.17)	0.93 (± 0.23)	(Kukkonen et al., 2004)
Clorpirifos	4.9	0.20 (± 0.02)	0.016 (± 0.001)	0.00040 (± 0.00000)	0.248 (± 0.045)	0.252 (± 0.032)	0.496 (± 0.013)	0.81 (± 0.01)	1.36 (± 0.11)	(Leppänen and Kukkonen, 2006)
		0.25 (± 0.14)	0.022 (± 0.018)	0.00275 (± 0.00237)	0.301 (± 0.215)	0.396 (± 0.154)	0.304 (± 0.120)	1.03 (± 0.36)	2.04 (± 1.24)	(You et al., 2007)
		0.17 (± 0.04)	0.016 (± 0.003)	0.00030 (± 0.00019)	0.206 (± 0.124)	0.193 (± 0.112)	0.604 (± 0.228)	0.70 (± 0.13)	1.31 (± 0.16)	(Sormunen et al., 2008b)
Permetrina	6.5	0.94 (± 0.58)	0.048 (± 0.033)	0.00273 (± 0.00313)	0.477 (± 0.139)	0.215 (± 0.089)	0.317 (± 0.092)	1.07 (± 0.35)	1.43 (± 0.56)	(You et al., 2007)
		0.26 (± 0.16)	0.007 (± 0.001)	0.00091 (± 0.00041)	0.156 (± 0.077)	0.640 (± 0.077)	0.208 (± 0.138)	0.88 (± 0.31)	1.68 (± 0.38)	(Jantunen et al., 2008)
		0.41 (± 0.12)	0.040 (± 0.013)	0.00278 (± 0.00204)	0.340 (± 0.180)	0.402 (± 0.125)	0.257 (± 0.081)	1.22 (± 0.14)	1.99 (± 0.65)	(You et al., 2007)
	0.09 (± 0.01)	0.006 (± 0.002)	-	0.119 (± 0.007)	0.297 (± 0.177)	0.569 (± 0.191)	0.60 (± 0.00)	1.26 (± 0.04)	(Cui et al., 2010)	

Tabla 16. (Continuación)

Compuestos	Log K _{ow}	kr _{ap}	k _{slow}	k _{vs}	F _{rap}	F _{slow}	F _{vs}	F _{g/rap}	F _{24/rap}	Referencias
Trifluralin	5.3	0.55 (±0.11)	0.028 (±0.003)	0.00032 (±0.00006)	0.472 (±0.061)	0.162 (±0.015)	0.366 (±0.047)	1.02 (±0.04)	1.18 (±0.05)	(Greenberg et al., 2005)
Dieldrin	5.5	1.06 (±0.33)	0.035 (±0.007)	0.00020 (±0.00000)	0.120 (±0.000)	0.270 (±0.057)	0.610 (±0.057)	1.44 (±0.17)	2.32 (±0.45)	(Hilber et al., 2009)
DDX	5.7-6.2	0.31 (±0.18)	0.031 (±0.024)	0.00150 (±0.00130)	0.394 (±0.174)	0.418 (±0.118)	0.188 (±0.081)	1.02 (±0.25)	1.67 (±0.63)	(You et al., 2007)
		0.62 (±0.21)	0.078 (±0.012)	0.00255 (±0.00236)	0.411 (±0.065)	0.398 (±0.050)	0.193 (±0.039)	1.32 (±0.07)	1.90 (±0.28)	Este trabajo
		0.43 (±0.23)	0.061 (±0.023)	0.00054 (±0.00025)	0.326 (±0.056)	0.282 (±0.087)	0.392 (±0.097)	1.13 (±0.20)	1.68 (±0.34)	(Yang et al., 2010b)
PBDE	5.5-10.1	0.28 (±0.28)	0.029 (±0.024)	0.00048 (±0.00046)	0.234 (±0.132)	0.258 (±0.108)	0.507 (±0.211)	0.95 (±0.57)	1.76 (±1.02)	Este trabajo
		0.13 (±0.04)	0.015 (±0.005)	0.00062 (±0.00022)	0.435 (±0.112)	0.258 (±0.035)	0.308 (±0.111)	0.58 (±0.09)	1.13 (±0.08)	(Sormunen et al., 2009b)
		0.02 (±0.01)	0.023 (±0.015)	0.00023 (±0.00010)	0.168 (±0.056)	0.163 (±0.031)	0.668 (±0.077)	0.23 (±0.04)	0.71 (±0.16)	(Sormunen et al., 2009a)
		0.13 (±0.05)	0.009 (±0.007)	0.00009 (±0.00007)	0.079 (±0.057)	0.072 (±0.038)	0.849 (±0.083)	0.60 (±0.024)	1.01 (±0.015)	(Liu et al., 2011a)

4

Evaluación del Chemcatcher
como sistema de muestreo
pasivo en aguas

■ 4.1. Introducción

La tendencia de los contaminantes hidrofóbicos a acumularse en las fases orgánicas resulta en una merma de las cantidades que se pueden encontrar disueltas en los sistemas acuáticos (ver 1.2.1.1). Conseguir una determinación fiable de estas concentraciones disueltas conlleva una serie de dificultades analíticas importantes, tanto por los LOD que se necesita alcanzar como por la complejidad de diferenciar la parte verdaderamente disuelta y la que forma coloides o está unida a materia orgánica. Una medida puntual de la concentración en la fase acuosa es, además, poco representativa e incluso considerada de poca utilidad, por lo que con frecuencia es sustituida por el análisis de sedimento o biota, que representan una integración temporal de la contaminación. Sin embargo, aunque pequeña proporcionalmente, esta fracción es importante por su mayor disponibilidad para los seres vivos y porque contribuye significativamente a la descarga y la dispersión de estos contaminantes en el medio ambiente.

Los sistemas de muestreo pasivo, que, debido a su captación molecular, concentran sólo la fracción de los contaminantes verdaderamente disuelta, pretenden aportar una serie de ventajas frente a las técnicas que se aplican tradicionalmente para las determinaciones en el medio acuático, no sólo en términos de la representatividad de la muestra respecto a la disponibilidad de los contaminantes para ser asimilados y acumulados por los seres vivos, sino también en cuanto a la simplificación de las etapas necesarias para su tratamiento en el laboratorio. En concreto, los muestreadores de modo cinético permiten integrar información temporal que de otra manera requeriría de una frecuencia de muestreo prohibitiva, y la concentración *in situ* en la fase receptora permite alcanzar LOD más bajos que con las usuales extracciones líquido-líquido o en fase sólida de las muestras de agua (ver 1.4.5.2). En definitiva, estos sistemas representan una alternativa tanto a la toma de muestras aisladas como al muestreo de biota. En este capítulo se aborda el trabajo realizado durante la tesis con el fin de poner a punto una metodología de muestreo pasivo con un dispositivo en fase experimental como era el Chemcatcher® para el seguimiento de la contaminación por PBDE y DDX en agua.

Las ventajas que este tipo de metodología podían aportar para el análisis de compuestos hidrofóbicos son especialmente importantes en el caso de los PBDE. Como se comentó en el primer capítulo (1.3.3.3) la solubilidad de estos compuestos es muy baja (ug/L), pero las concentraciones que se han encontrado son aun menores, del orden de los pg/L o incluso menores (Booij *et al.*, 2002; Oros *et al.*, 2005; Streets *et al.*, 2006). Los pocos estudios que habían buscado estos compuestos en agua habían requerido la concentración de volúmenes muy grandes de muestra para conseguir su cuantificación. Sólo más recientemente se han descrito métodos para el análisis de PBDE en agua que han permitido rebajar esos límites, como la SPME (Polo *et al.*, 2004), la SBSE (Llorca-Porcel *et al.*, 2006) o la DLLME (microextracción líquido-líquido dispersiva) (Fontana *et al.*, 2009). Aun así sigue siendo muy difícil llegar a los LOD requeridos por los EQS europeos para ellos, inferiores a los ng/L (EU, 2008).

En las dos últimas décadas han visto la luz toda una serie de diseños de dispositivos para el muestreo pasivo de distintos tipos de contaminantes en agua, con los que se trata de emular el éxito del muestreo pasivo de aire, que ya se viene aplicando desde 1970 para la medida de la calidad del aire en zonas industriales. De entre ellos, los Dispositivos de Membrana Semipermeable (SPMD, de *Semipermeable Membrane Devices*) (Huckins *et al.*, 1990) habían alcanzado

un cierto grado de consolidación para el muestreo de sustancias orgánicas apolares ya cuando se llevó a cabo el presente trabajo. Sin embargo, aunque los SPMD se habían utilizado con éxito para la evaluación de DDX y PBDE en agua (Petty, 1995; Booij et al., 2002; Rayne & Ikonomou, 2002), el tratamiento que se requiere en el laboratorio para la extracción de los analitos acumulados en su fase aceptora lipídica es largo y laborioso (Petty *et al.*, 2000). Además de poco manejables, estos PSD sólo son aplicables a compuestos hidrofóbicos, por lo que no pueden controlar de forma eficaz todas las sustancias prioritarias de preocupación en el ámbito de la política de aguas.

El proyecto europeo STAMPS (*Standardized Aquatic Monitoring of Priority Pollutants by Passive Sampling*), en el que se enmarca el trabajo aquí presentado, pretendía poner a punto el diseño y la metodología de uso de un prototipo de muestreador manejable y de bajo coste que pudiese alojar diferentes combinaciones de materiales como fasesceptoras y membranas de difusión y, así, pudiese ser utilizado para una gama amplia de clases de contaminantes (Greenwood *et al.*, 2007). Entre los distintos participantes del proyecto se trató de optimizar su configuración y uso para contaminantes orgánicos polares y apolares (triazinas, PAH, pesticidas organoclorados (OCP) (Kingston *et al.*, 2000; Vrana *et al.*, 2005b; Vrana *et al.*, 2006a; Vrana *et al.*, 2007), compuestos organoestánicos (Aguilar-Martínez *et al.*, 2008; Aguilar-Martínez *et al.*, 2009) y metales pesados (Blom *et al.*, 2002; Allan *et al.*, 2007).

El dispositivo, denominado Chemcatcher[®], consiste en un cuerpo cilíndrico con una base plana que hace de soporte a un disco Empore de 47 mm de diámetro que hace de fase aceptora y está cubierta por la membrana de difusión previamente acondicionada (en caso de que se utilice membrana de difusión). Ambas láminas se mantienen sujetas por un anillo frontal que se une mediante rosca con el resto del cuerpo de PTFE y deja una superficie activa de 17.5 cm² al descubierto. Para el transporte del Chemcatcher[®] montado, éste se rellena de agua y se coloca una tapa sobre el anillo frontal. El prototipo inicial, que fue el utilizado en este trabajo, fue construido en PTFE y era reutilizado tras un proceso de limpieza. Este diseño (desarrollado en el Proyecto MAPPS) constituyó la base para el diseño de un segundo prototipo de policarbonato (Proyecto STAMPS) formado por dos piezas y una tapa fácilmente ajustables (Lobpreis *et al.*, 2008). En este prototipo se mejora la geometría del muestreador reduciendo la cavidad existente entre el medio acuático y la membrana de difusión (de 20 a 6 mm) con el fin de facilitar la transferencia de masa, ya que se minimiza la capa de agua estacionaria en torno a dicha membrana. Otras ventajas adicionales son la reducción de costes de fabricación y la facilidad de manejo del muestreador. Al ser más barato que el de PTFE, este diseño podía considerarse de un solo uso, de manera que se evitan problemas de limpieza del cuerpo y por tanto de riesgos de contaminación cruzada. No obstante, posteriormente, se ha desarrollado una nueva variación del Chemcatcher de PTFE con una cavidad todavía menos profunda (2 mm), que es la que se comercializa actualmente (Figura 31).

Para los compuestos apolares se utilizó una barrera de difusión de LDPE, material de naturaleza hidrofóbica que presenta unas cavidades con un tamaño de aproximadamente 1 nm. Estas características permiten una exclusión por tamaños ya que impide la acumulación de moléculas de gran tamaño así como de aquellas adsorbidas en coloides y ácidos húmicos. Tampoco son susceptibles de acumulación compuestos iónicos o metales, por lo que solo difundirá la fracción

disuelta de los contaminantes de naturaleza hidrofóbica. La primera versión llevaba como fase receptora un disco Empore de C18, y era capaz de muestrear contaminantes con $\log K_{ow} > 3$ (Kingston *et al.*, 2000). Una optimización posterior, saturando los poros del disco con octanol, permitió disminuir la resistencia interna del muestreador para la transferencia de contaminantes con $\log K_{ow} > 5$ (Vrana *et al.*, 2005b).

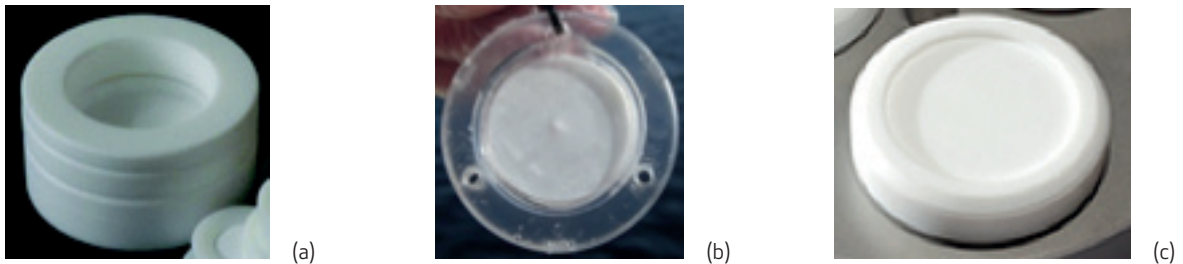


Figura 31. Evolución del diseño del Chemcatcher.

■ 4.2. Trabajo experimental

La investigación llevada a cabo con el prototipo de Chemcatcher® durante el periodo de tesis dio lugar a dos publicaciones científicas, que recogen los resultados más significativos de toda una serie de experimentos llevados a cabo con la finalidad de poner a punto las herramientas necesarias para la calibración de los muestreadores pasivos en nuestro laboratorio. Como parte de esta memoria se adjunta la publicación correspondiente a los PBDE y los DDX (Artículo #6). Debido a las cantidades de patrones comerciales necesarias para la calibración y su alto coste en el caso de los PBDE, para estos estudios se seleccionaron solamente dos congéneres (BDE-47 y el BDE-99), en lugar de las mezclas que se habían utilizado en el caso de los experimentos de los capítulos 2 y 3.

El trabajo experimental incluyó el desarrollo de métodos tanto para la extracción de los compuestos de interés en los discos Empore™ utilizados como fase receptora como para su análisis en agua, con el fin de poder comparar la masa acumulada durante la exposición de los muestreadores y la concentración en el agua circundante. La extracción de los analitos de los discos Empore™ fue llevada a cabo mediante US. Los analitos disueltos en agua fueron preconcentrados mediante SPE en cartuchos de C18. La determinación posterior de los analitos en los extractos se realizó siguiendo la misma metodología de los trabajos anteriores presentados en esta memoria: GC-NCI-MS para los PBDE y GC-EI-MS para los DDX, si bien para la separación cromatográfica de los dos PBDE estudiados se utilizó una columna de 15 m, como la utilizada en el análisis del BDE-209. Además, para el análisis de extractos en octanol (resultantes de la extracción de las fases receptoras impregnadas con este disolvente), se modificaron las condiciones de inyección de manera que se adecuasen a la elevada viscosidad de este disolvente (9.0 frente a 0.5 mPa·s del isoctano (fichas de seguridad de los productos Merck)).

Por otra parte, se puso a punto en el laboratorio un sistema de flujo continuo, como se describe en el artículo #6, que permitió llevar a cabo experimentos de exposición en condiciones controladas de concentración, temperatura y turbulencia (Figura 32). Con una entrada de agua

destilada en el tanque a un flujo de 30 mL/min paralelamente a la entrada de una solución patrón de 30 ng/mL en metanol para cada compuesto nativo impulsada a 0,1 mL/min, se obtenía una concentración teórica de exposición de cada analito de 100 ng/L para cada compuesto en el tanque. Con ese sistema, se llevaron a cabo varios experimentos de exposición en el laboratorio, con el fin de evaluar la idoneidad de distintos materiales en la configuración del muestreador tanto para los PBDE y DDX como para otros analitos más polares (Kuster *et al.*, 2010). Para los compuestos apolares se eligió la misma configuración que la utilizada por el grupo de la universidad de Portsmouth para los PAH (Vrana *et al.*, 2006a), con discos de C18 impregnados en octanol como fase receptora y LDPE como membrana de difusión. Posteriormente, mediante periodos de exposición prolongados a 14 días, se trató de calibrar el dispositivo para el cálculo de la concentración promediada en el tiempo, así como establecer sus LOD.

Además del trabajo en el laboratorio, se llevó a cabo una campaña de muestreo en el río Cinca en las zonas de muestreo de las campañas objeto de los capítulos 2 y 3, que no se trata en el artículo #6. La exposición de los muestreadores, ubicados en el interior de jaulas de acero inoxidable, se alargó durante 14 días, tras los cuales los muestreadores fueron trasladados al laboratorio y analizados.

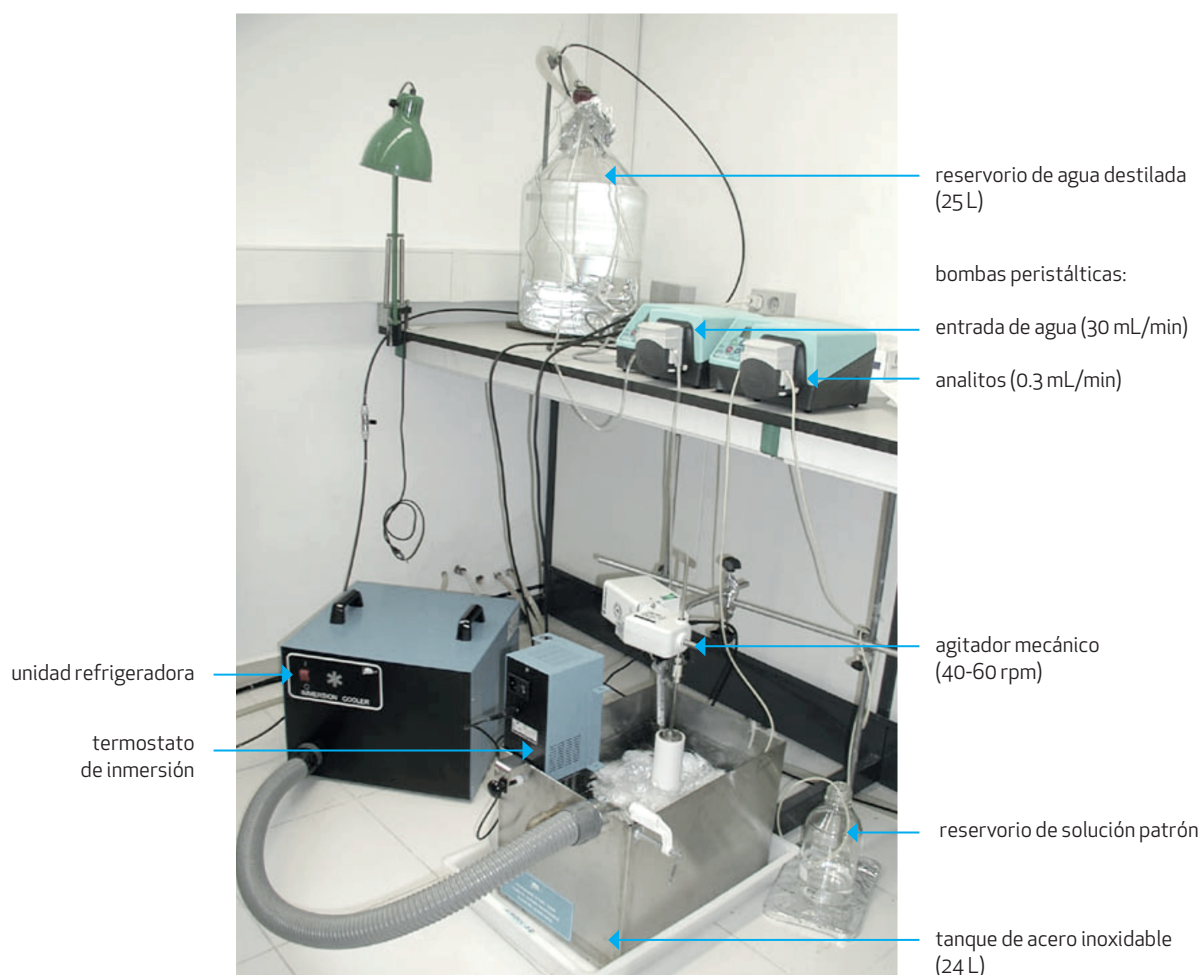


Figura 32. Sistema de flujo continuo puesto en marcha en nuestro laboratorio para el estudio.

■ 4.3. Artículo científico #6

Evaluation of the aquatic passive sampler Chemcatcher for the monitoring of highly hydrophobic compounds in water

A. de la Cal, M. Kuster, M. López de Alda, E. Eljarrat, D. Barceló
Talanta (2008) 76(2): 327-332



Evaluation of the aquatic passive sampler Chemcatcher for the monitoring of highly hydrophobic compounds in water

A. de la Cal, M. Kuster, M. Lopez de Alda, E. Eljarrat*, D. Barceló

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 November 2007
Received in revised form 27 February 2008
Accepted 29 February 2008
Available online 15 March 2008

Keywords:

Passive sampling
Water monitoring
PBDE
DDT
DDE
DDD

ABSTRACT

The Chemcatcher passive sampler was primarily developed for the detection and quantification of priority organic pollutants (e.g., polycyclic aromatic hydrocarbons) in water. In the present study, this prototype was evaluated for highly hydrophobic compounds such as the tetrabrominated diphenyl ether BDE-47, the hexabrominated diphenyl ether BDE-153, and the historic pesticide DDT with its main metabolites (DDE and DDD). The sampling device consists basically of a receiving phase with high affinity for organic chemicals which is separated from the environment by a diffusion limiting membrane, both placed in a rigid PTFE body. C18 Empore® disks were evaluated as receiving phase, obtaining a better accumulation when impregnated until saturation with *n*-octanol. As diffusion membrane, low density polyethylene was chosen over polyethersulphone. Once optimized its accumulation capacity for the target compounds, the linear behaviour of this accumulation was investigated and shown to be satisfactory in a period of 15 days. Preliminary uptake rates calculated from that accumulation anticipate the utility of this device for the detection of DDXs and the PBDEs, as calculated limits of detection are lower than usually reported environmental concentrations.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The most accepted procedure for identifying and quantifying organic pollutants in water is spot sampling followed by extraction and analysis in the laboratory. However, this procedure measures an instantaneous concentration that might not be representative of the average concentration in time. Besides, this type of analysis quantify not only the truly dissolved phase of a chemical, but also that sorbed to particles and in colloidal phase, whose bioavailability, and hence environmental risk, is considered limited. Biomonitoring, directly measuring the accumulation of lipophilic pollutants within living organisms, offers a more time-integrative assessment of contamination and, of course, it measures only the bioavailable fraction. But biomonitoring implies some technical disadvantages. First, a species cannot live anywhere but under some restricted environmental conditions, so that the same species cannot be found or used everywhere. In fact, only a few living beings can survive in highly polluted environments. Moreover, rates of bioaccumulation are influenced by biological factors, and vary even between individuals of the same species. As a result, it is difficult to obtain comparable results. Another inconvenience is that not all chemicals bioaccumulate, because some of them are metabolized

by the living organism. On the other hand, the pool of fish or other living beings is not infinite, and, from an ethical point of view, killing living beings is not desirable. In the last few years the European Union (EU) has encouraged the so-called “intelligent testing strategies of chemicals”, that promotes the use of alternative devices to living organisms for conducting experimental tests. Passive sampling provides a continuous measure of pollution and overcomes all these difficulties associated to both spot sampling and biomonitoring. Moreover, it offers an important analytical advantage: sample pre-treatment and cleanup are simpler than those required for animal tissues. This way, in the last two decades different types of devices have been shown as promising tools for measuring a wide range of pollutants in water.

The Chemcatcher passive sampling device was developed by Portsmouth University in the frame of an EU project (Standardised Aquatic Monitoring of Priority Pollutants by Passive Sampling, STAMPS). It consists of the basic configuration of aquatic passive samplers being formed by a receiving phase with high affinity for organic chemicals which is separated from the environment by a diffusion limiting membrane. In this case, both the receiving phase and the diffusion membrane are 47 mm diameter disks, loaded on a rigid PTFE body (Fig. 1). It was designed in order to enable its application to several classes of target analytes by simply varying the receiving phase and the membrane in accordance with the compounds affinities. A complete description of the device can be looked up in Kingston et al. [1], Vrana et al. [2]

* Corresponding author. Tel.: +34 934006170; fax: +34 932045904.
E-mail address: eeeqam@cid.csic.es (E. Eljarrat).

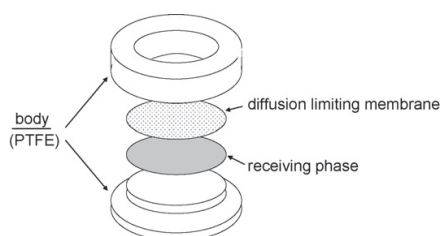


Fig. 1. Chemcatcher general configuration.

or Greenwood et al. [3]. These authors developed the system and calibrated its use for the detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), organochlorine pesticides and triazines. Besides, it has been evaluated for metals [4] and organometals [3].

The objective of the present study is to explore the possibilities of this system for the sampling and subsequent analysis of a selected group of halogenated endocrine disrupting organic contaminants in water: the tetrabrominated diphenyl ether BDE-47 and the hexabrominated diphenyl ether BDE-153, both used as flame retardants, and the historic pesticide DDT and its two main metabolites DDE and DDD (DDXs). Both classes of compounds are subjected to regulation in water in the EU. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are included in the list of 33 priority substances in the field of water policy established in the Decision No 2455/2001/EC that amends the Water Framework Directive 2000/60/EC [5]. Besides, for both PBDEs (included in the pentabromodiphenylether mixture) and DDT (DDT total and *p,p'*-DDT) annual average concentrations (in the range 0.0002–0.0005 and 0.01–0.025 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively) have been proposed for inland and other surface waters [6].

For both groups of compounds, besides the common advantages of passive sampling (e.g. time-integrated measurements), the goal of the use of this kind of methodology is to overcome the analytical difficulties, especially for PBDEs, that arise from their low solubility in water. Although the levels of these compounds are extremely low in water, this medium contributes significantly to the discharge and spread of these pollutants in the environment. In situ concentration onto the receiving phase allows lower quantification limits than usual liquid–liquid or solid phase extraction of water samples. Although semipermeable membrane devices have been successfully used for the assessment of DDXs and PBDEs in water [7,8], usually these devices require laborious and time-consuming separation of lipid matrix components from target analytes using solvent dialysis and size exclusion chromatography [9].

Once that the suitability of the system is verified, a large set of laboratory experiments has to be performed in order to calibrate the device at different environmental conditions (e.g. temperature and turbulence of water).

2. Experimental

2.1. Materials and chemicals

Chemcatcher PTFE devices were supplied by Portsmouth University. C18 Empore[®] disks were obtained from 3M (St. Paul, MN, USA). Polyethersulphone (PES) membranes Pall Corporation (East Hills, NY, USA) and low density polyethylene (LDPE) membranes, 40 μm thick, were a gift from Portsmouth University obtained from Fisher Scientific (Loughborough, UK). Sodium sulphate cartridges were purchased from Varian, Inc. (Palo Alto, USA). C18 Isolute cartridges were supplied by Biotage (Hengoed, UK) and Oasis HLB cartridges were supplied by Waters (Mildford, Massachusetts, USA).

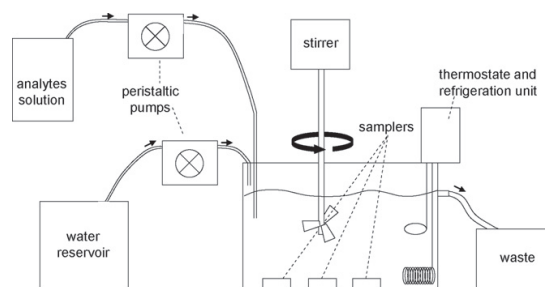


Fig. 2. Schematic drawing of the flow-through system used for laboratory exposure experiments.

All solvents were of gas chromatography quality and supplied by Merck (Darmstadt, Germany) except for octanol which was purchased from Riedel de Haën (Seelze, Germany). HPLC grade water was from Merck (Darmstadt, Germany).

Certified pure standards of the test compounds were used. Solid BDE-47 and BDE-153 congeners were purchased from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA). PCB-209 (10 ng μL^{-1}), used as internal standard, and solid DDT isomers and metabolites were purchased from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany).

2.2. Exposure system

For laboratory exposure experiments, a flow-through system where water temperature and turbulence and the concentrations of the studied analytes can be maintained constant was employed (Fig. 2). It consisted of a 25 L stainless steel tank with an overflow to waste. Distilled water and a solution of the target chemicals in methanol (30 $\mu\text{g L}^{-1}$) were continuously supplied to the tank by means of Marprene[®] tubes and two peristaltic pumps (Watson Marlow, Wilmington, MA, USA) working at velocities high enough to compensate for the losses due to accumulation in the disks and maintain a constant concentration in it (33 mL min^{-1} and 100 $\mu\text{L min}^{-1}$, respectively). An overhead stirrer (Heidolph, Kelheim, Germany) was used for mixing continuously the water in the exposure tank and controlling the turbulence to which samplers were exposed. The water temperature was maintained constant by using simultaneously a cooling unit (Afora, Barcelona, Spain) and a heating thermostat (SBS, Rubí, Spain) in the tank.

2.3. Chemcatcher configuration optimization

The suitability of different materials was evaluated by comparing the accumulation of each compound onto different configurations of the sampler during an experiment of 48 h at constant concentration, temperature and turbulence. C18 Empore[®] disks were tested as receiving phase, and PES or LDPE, microporous and non-porous membranes respectively, as diffusion membrane. Before loading the samplers, all disks were conditioned by soaking them in methanol until they were translucent, and then passing 10 mL of methanol followed by 20 mL of HPLC water through them. Disks were then treated in two different ways. Six disks were directly (saturated with water) loaded on the sampler lying on the PTFE disk. Other four disks were completely dried under vacuum during 30 min and then impregnated until saturation with *n*-octanol by adding 1 mL of a solution of octanol in acetone (45%, v/v) and allowing acetone to evaporate. Two of the six water-saturated disks were loaded in the sampler without membrane. Two octanol-saturated disks and two water-saturated disks were covered with a polysulphone membrane and the remaining two disks of each type were covered with a low density polyethylene

membrane (previously washed during 24 h with hexane and dried). In both cases the diffusion limiting membrane was loaded on top of the C18 disk carefully, preventing the formation of bubbles, and they were fixed with the supporting disk of the sampler. After exposure, the samplers were disassembled, the diffusion membrane removed, and the Empore® disks analyzed.

2.4. Calibration experiment

Accumulation of the target compounds in the disks was tested at a high and theoretically constant concentration of the compounds in water of 100 ng L^{-1} each. The theoretical behaviour of this accumulation has been described as an exponential approach to the steady state [10,11]. Nevertheless, during the initial stage of exposure, the uptake and accumulation kinetics of the analytes in the receiving phase should be linear, according to the equation:

$$m(t) = m(0) + C_w R_s t \quad (1)$$

where m represents the mass of analyte in the receiving phase at exposure time t (day) or initial time (0), C_w is the concentration in water during that period (ng L^{-1}) and R_s is the sampling rate of the device, that is, the equivalent extracted water volume per unit of time (L day^{-1}).

The main factors that influence the sampling rate are the sampler configuration, the molecular properties of the analyte and the environmental conditions. The sampling rate is, however, independent of the concentration of the analyte in the water [12]. By this experiment, with known concentration in water, the rate of sampler uptake of each analyte from the water could be calculated for the different environmental conditions tested (temperature and turbulence) and it could be used then, in the field, for quantifying the time-averaged concentration in water during the time that the samplers were immersed. For this purpose, 14 samplers were exposed in the flow-through system at 11°C during 14 days. The stirrer was used at 20 rpm to mix the fortified water without generate high turbulence. Two samplers were removed every two days for analysis of the accumulated chemicals. Duplicate water samples from the outlet of the tank were taken daily to confirm the concentration to which samplers were exposed.

2.5. Extraction of analytes from disks

Analysis of the accumulated compounds in the receiving phase by ultrasonic solvent extraction consisted of two 5 min extractions, first with 10 mL of acetone and then with 10 mL of a mixture acetone:hexane (1:1, v/v). The extracts were combined, passed through a Na_2SO_4 cartridge and concentrated under N_2 stream until only the octanol remained in the vial. In the case of water-saturated disks the extracts were concentrated until incipient dryness and redissolved with $225 \mu\text{L}$ of isoctane. After adding the internal standards ($25 \mu\text{L}$ of a solution in octanol or isoctane of PCB-209 and ^{13}C - p,p' -DDT at $0.4 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) the extracts were analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry detection (GC/MS).

2.6. Extraction of analytes from water

For preventing adsorption of chemicals to the glass walls of the container, the samples were mixed with 30% of methanol just after sampling. Previous to the analyses, samples were filtered through a glass fiber filter ($0.45 \mu\text{m}$ pore size). Afterwards, solid phase extraction (SPE) of the samples was performed with an automated sample processor Aspec XL (Gilson, Middleton, USA) using C18 (500 mg, 3 mL) cartridges. Cartridges were conditioned by passing hexane, followed by dichloromethane, methanol and water HPLC through them (6 mL each , at 1 mL min^{-1}). Once conditioned, 325 mL

of sample ($250 \text{ mL water} + 30\% \text{ MeOH}$) was loaded onto the cartridges at 5 mL min^{-1} . Afterwards, the cartridges were washed with 3 mL of HPLC water at 1 mL min^{-1} and dried under vacuum during 30 min. The cartridges were kept at -20°C until elution. For elution, methanol, dichloromethane and hexane (3 mL each , 1 mL min^{-1}) were passed through the cartridges. Other solvents (acetonitrile, ethyl acetate) and cartridges (Oasis HLB, 200 mg, 6 mL) were tested, but the best recovery and/or variation was achieved with the above described procedure. The resulting extracts were concentrated down to incipient dryness under nitrogen stream and redissolved with $225 \mu\text{L}$ of isoctane. $25 \mu\text{L}$ of a solution in isoctane of PCB-209 and ^{13}C - p,p' -DDT at $0.1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ were added as internal standards prior to the analysis by GC/MS.

2.7. Instrumental analysis

Analysis of extracts was performed following previously described GC/MS methods [13,14]. PBDEs analyses were performed using a gas chromatograph Agilent 6890 coupled to a mass spectrometer Agilent 5973 Network (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA). The separation of congeners was achieved using a DB-5 ($15 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm i.d.}$, $0.25 \mu\text{m}$) capillary column containing 5% phenyl methyl siloxane. The temperature program was from 140°C (held during 2 min) to 325°C (held during 10 min) at $10^\circ\text{C min}^{-1}$. Injection was carried out in the splitless mode during 1 min with an injector temperature of 250°C . Negative chemical ionization (NCI) was used as ionization mode with a source temperature of 250°C , ionization energy 40 eV and ammonia as reagent gas at a system pressure of 1.9×10^{-4} Torr. Helium was used as the carrier gas at 10 psi. Detection was carried out monitoring the two most abundant isotope peaks from the mass spectra, corresponding to the loss of the bromine ion: $m/z=79$ and 81, and m/z 498 and 500 for the internal standard PCB-209.

DDXs analyses were performed with a gas chromatograph GC 8000 series 8060 (Fisons Instruments, Spain) coupled with a mass spectrometer with quadrupole detector MD 800 (Fisons Instruments, Spain). A DB-5 ($30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm i.d.}$, $0.25 \mu\text{m}$) capillary column with 5% phenyl methyl siloxane was used. The temperature program was from 120°C (held during 1 min) to 200°C at 5°C min^{-1} , then from 200 to 220°C at 1°C min^{-1} and finally at 8°C min^{-1} from 220 to 300°C (held during 5 min). Injection was carried out in the splitless mode during 48 s with an injector temperature of 250°C . Electronic impact (EI) was used as ionization mode with ionization energy of 70 eV and source temperature of 250°C . Detection was performed monitoring the three most abundant isotope peaks from the mass spectra of each compound: m/z 246, 248 and 176 for o,p' -DDE; 246, 248 and 318 for p,p' -DDE; 235, 237 and 165 for o,p' -DDD, p,p' -DDD, o,p' -DDT and p,p' -DDT, and m/z 247 and 249 for the internal standard ^{13}C -4,4-DDT.

For the analysis of the disks extracts a slightly modified methodology had to be used due to the high viscosity of the extract solvent octanol. Modifications comprised the application of a pulse of pressure during injection (50 psi), application of a viscosity delay to the syringe time of sampling and injection (7 s) and rising of the initial oven temperature to 120°C .

Quantification was carried out using PCB-209 and 13 C-4,4-DDT as internal standards for PBDEs and DDXs, respectively.

3. Results and discussion

3.1. Chemcatcher configuration

The accumulation in disk (ng of compound per sampler) was tested with two different membranes and without membrane, and

Table 1Amount of pollutants accumulated in the disks (ng) under different configurations after being immersed during 48 h in the flow-through system (mean values from $n=2$)

	Accumulated amount (ng)				
	Without membrane	Polyethylene octanol	Membrane water	Polyethersulfone octanol	Membrane water
BDE-47	30	20	1.85	1.01	0.04
BDE-153	2.7	1.0	0.01	0.11	0.01
<i>o,p'</i> -DDE	25	11	0.6	0.5	0.01
<i>p,p'</i> -DDE	17	7	0.4	0.3	0.06
<i>o,p'</i> -DDD	48	21	1.2	0.9	0.05
<i>p,p'</i> -DDD + <i>o,p'</i> -DDT	54	26	1.1	1.0	0.05
<i>p,p'</i> -DDT	56	29	2.5	2.7	0.09

with and without octanol as interstitial solvent. Results obtained are shown in Table 1. As expected, the maximum accumulation occurred onto the disks without coating membrane (2.7–56 ng), whereas the use of a membrane lowered the accumulation 12–270 (LDPE membrane) or 270–2500 (PES membrane) times. Nevertheless, the use of the membrane is mandatory, in order to avoid deterioration of the receiving phase in the aqueous environment, especially due to the biofouling. The diffusion through the tested membranes, and thus accumulation in the disks, was clearly higher (up to 60 times for *o,p'*-DDE) when LDPE was used. Besides, accumulation was found to be up to 100 times higher (BDE-153) when the interstitial space between the receiving sorbent phase and the diffusion membrane is saturated with *n*-octanol. This solvent has a high permeability for the target analytes, so that the internal resistance to mass transfer is decreased. Therefore, the chosen configuration was C18 Empore® disks and low density polyethylene membrane with *n*-octanol as interstitial phase, which is the same that the one used for PAHs and organochlorine compounds with K_{ow} greater than 3 by Vrana et al. [15].

3.2. Disks and water analysis

The optimized procedure for disks analysis yielded recoveries of nearly 100% (89–100%) and maximum relative standard deviations of 5% (1–5%) for all compounds (Table 2). Detection limits ranged from 7.4 to 126.6 pg per disk, where the lowest values were for BDEs and the highest for DDXs.

In the extraction of water, however, no satisfactory recoveries could be achieved for PBDEs. All tested solvents gave similar results, whereas some improvement could be achieved by employing C18 instead of Oasis HLB cartridges. Nevertheless, under the best conditions the recoveries were still very low for both congeners (30% in average). Furthermore, variability, acceptable for BDE-153 (8%), was very high for BDE-47 (49%). For DDXs, recoveries were slightly better (49–55%) but variation was also very high (37–54%). These low recoveries and high variability could be attributed to the high lipophilicity of these chemicals and its consequent sorption to the walls of the containers used. Moreover, we cannot assure either that the concentration measured in the spot water samples does not include part of the chemicals in the colloidal phase or bounded to the dissolved organic mater.

Table 2

Quality control parameters of the analytical method developed for disks

	Recovery (%) (mean of $n=3$)	Relative standard deviation (%) ($n=3$)	Limit of detection (pg disk ⁻¹)
BDE-47	98	4	7.4
BDE-153	98	4	48.9
<i>o,p'</i> -DDE	91	5	31.9
<i>p,p'</i> -DDE	89	5	41.6
<i>o,p'</i> -DDD	89	4	81.0
<i>p,p'</i> -DDD	91	4	85.8
<i>o,p'</i> -DDT	96	2	116.8
<i>p,p'</i> -DDT	100	1	126.6

3.3. Uptake rates

Uptake curves (accumulated analyte against time of exposure) for the studied analytes are plotted in Fig. 3. As could be expected, they were found to be (roughly) linear, with coefficients ranging from 0.76 to 0.88 (slightly better for PBDEs than for DDXs). Preliminary rates of uptake (R_s) were estimated from the division of the slope of the curves by the concentration of each compound in water (see Eq. (1)).

At this point, problems arose from the uncertainty associated to the analysis of water. To the variability of the measured concentration during the length of the experiment (17–36% for PBDEs and 15–22% for DDXs), it has to be added the uncertainty about the recovery of the method that was explained in the previous section. Moreover, measured concentrations (corrected by the recoveries) differed from the theoretical aimed 100 ng L⁻¹: 22–89 ng L⁻¹ for PBDEs and 133–288 ng L⁻¹ for DDXs.

Possible uptake rates were calculated from both (theoretical and measured) values for each compound. The results of both calculations are shown in Table 3. R_s values ranged between 0.002 and 0.013 L day⁻¹ for DDXs and 0.055–0.32 L day⁻¹ for PBDEs. Only for BDE-153 the difference between the two values was important (0.251 L day⁻¹ from the estimated value and 0.055 L day⁻¹ from the theoretical value).

On the other hand, in the same way that it was done for other passive samplers [12,16], an empirical model was derived for the same Chemcatcher configuration used by us (B. Vrana, School of Biological Sciences, University of Portsmouth, Portsmouth, United Kingdom, personal communication). This model allows the calculation of the sampling rate as a function of the hydrophobicity of the compound. In accordance with this model, this configuration of the Chemcatcher favours the uptake of compounds with moderate hydrophobicity ($\log K_{ow} = 4.0$ – 5.0) showing a higher declination for compounds with high K_{ow} than semipermeable membrane devices (SPMDs) [3]. Table 3 presents the result of the application of this model to the K_{ow} of the analytes studied here. The lowest K_{ow} found in literature [17–19] were used for this calculation so that a maximum limit for sampling rates could be estimated. High sampling rates combined with low instrument detection limits are essential, especially for sampling of non-polar chemicals, due to their

Table 3Uptake rates R_s (L day⁻¹) estimated in this study and estimated with the model of [2]

	Experimental		Estimated from [2]
	Using measured water concentration	Using theoretical water concentration	
BDE-47	0.317	0.282	0.013
BDE-153	0.251	0.055	0.003
<i>o,p'</i> -DDE	0.002	0.003	0.013
<i>p,p'</i> -DDE	0.001	0.002	0.010
<i>o,p'</i> -DDD	0.003	0.007	0.010
<i>p,p'</i> -DDD + <i>o,p'</i> -DDT	0.005	0.013	0.003
<i>p,p'</i> -DDT	0.001	0.004	0.003

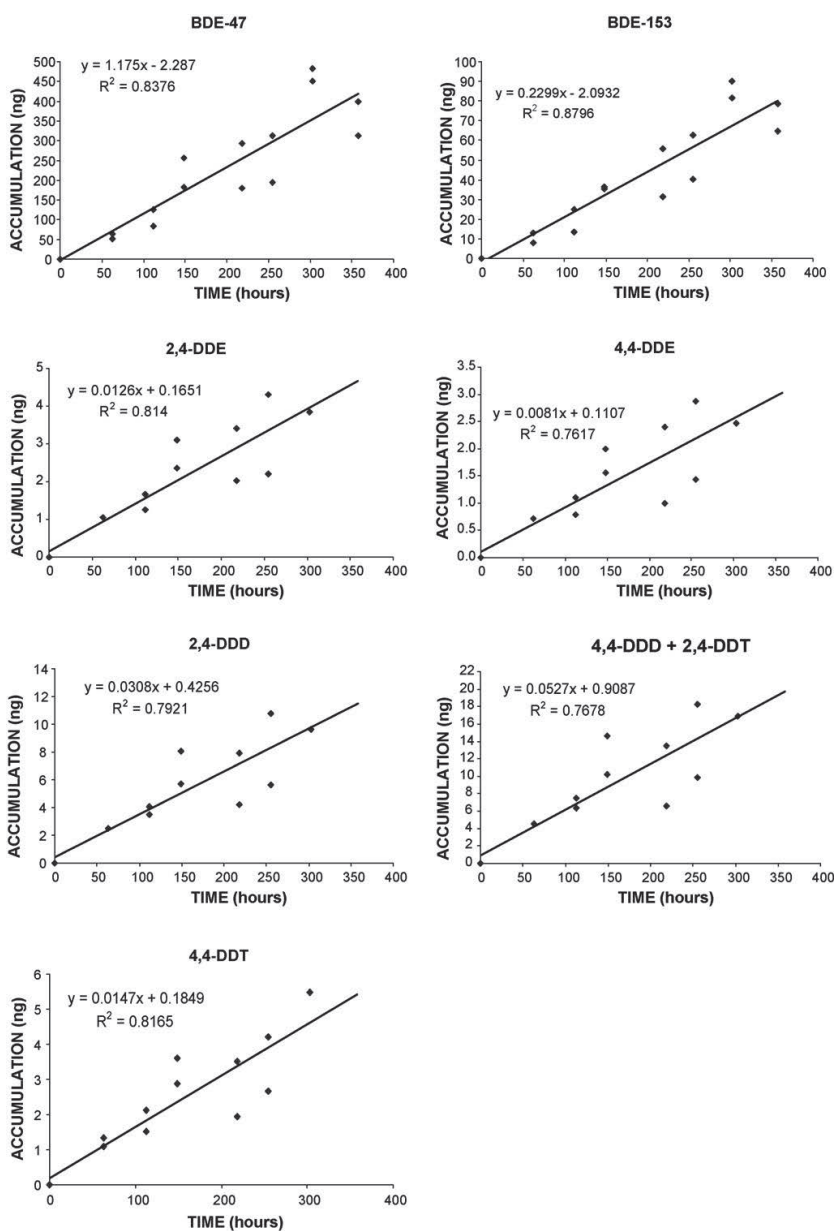


Fig. 3. Uptake curves obtained for the studied chemicals.

extremely low concentration in the water phase. In Table 4 the minimum concentration measurable in water after 15 days of exposure was calculated from the detection limit of the method and the uptake rates of Table 3.

The uptake rates obtained experimentally for the DDXs are not significantly different from those predicted with the model of Vrana et al. [15] and their limits of detection (Table 4) are in the range of 0.16–8.4 ng L⁻¹. Those limits of detections are far below the concentrations commonly detected for these compounds in freshwater (e.g. 92 ng L⁻¹ [20], 59 ng L⁻¹ [21], 29–270 ng L⁻¹ [22]).

For PBDEs, the experimental rates obtained are higher than those for DDXs. This added to the lower detection limits achieved for these compounds as compared with DDXs with the analytical method employed [13,14] yields lower detection limits for PBDEs than for DDXs also when using the Chemcatcher. These uptake rates indicate that concentrations of 2 and 13–59 pg L⁻¹ of BDE-47 and BDE-153, respectively, could be detected in 15 days (Table 4). Data about concentrations of PBDEs in water are very scarce in literature. In the San Francisco Estuary BDE-47 reached 180 pg L⁻¹, near wastewater treatment plant effluents whereas BDE-153 was

Table 4Minimum concentration (pg L^{-1}) measurable in water after 15 days of exposure calculated from the detection limit of the method and the uptake rates of Table 3

	From experimental R_s		From R_s estimated from [2]
	Calculated using the measured water concentration	Calculated using the theoretical water concentration	
BDE-47	1.5	1.7	37.9
BDE-153	13.0	59.3	1087
<i>o,p'</i> -DDE	1063	709	164
<i>p,p'</i> -DDE	2773	1387	277
<i>o,p'</i> -DDD	1800	771	540
<i>p,p'</i> -DDD + <i>o,p'</i> -DDT	1333	513	2222
<i>p,p'</i> -DDT	8440	2110	2813

no higher than 10 pg L^{-1} [23]. 158 pg L^{-1} were reported in Lake Michigan for a sum of six PBDE congeners [24]. These concentrations are clearly above the detection limits achieved with the Chemcatcher, which confirms the suitability of the system for the detection of PBDEs. On the other hand, concentration in the Dutch coast calculated from SPMD data ($0.1\text{--}1 \text{ pg L}^{-1}$) [8] would not be detected by the Chemcatcher according with these limits. It has to be taken into account, besides, that the uptake rates predicted with the model of Vrana et al. [15] suggest a much lower sensitivity.

On the other hand, Vrana et al. [2] found that uptake rates increase with increasing turbulence. As turbulence was not used in this experiment, we can expect higher rates in systems like rivers. Moreover, the sensitivity of the second generation of Chemcatcher (here it was used the first one), has been proved to be higher [3].

4. Conclusions

A recently developed passive sampling device, the Chemcatcher, has been evaluated by the first time for the highly hydrophobic pollutants BDE-47, BDE-153, DDT and metabolites. Accumulation rates calculated here predict the viability of the evaluated configuration of the Chemcatcher for the monitoring of these compounds in environmental water bodies. This possibility means an improvement over traditional water pollution assessment, both over water analysis and over biomonitoring – see Section 1.

On the basis of these preliminary results, future experiments involve the calibration of the system at different water temperatures and turbulences, necessary for the calculation of the time-averaged concentration of the pollutants in water from the amount of accumulated compound in the sampler.

Acknowledgements

This work has been financially supported by the European Union under the STAMPS (EVK1-CT2002-00119) and AQUATERRA (505428) projects and by the Spanish Ministry of Education and Science through the project CEMAGUA (CGL2007-64551/HID) and Acción Complementaria CTM2005-25168-E. This work is also part of the SOSTAQUA Project, leaded by Aguas de Barcelona and founded by CDTI in the framework of the Ingenio 2010 Programme under the CENIT call. Agustina de la Cal acknowledges grant from Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació

de la Generalitat de Catalunya (2003FI 00092). Marina Kuster acknowledges the I3P Program co-financed by CSIC and European Social Funds for a predoctoral grant. R. Chalor and D. Fanjul are thanked for assistance with the MS work. This work reflects only the author's views and the European Community is not liable for any use that may be made of the information contained therein.

References

- [1] J.K. Kingston, R. Greenwood, G.A. Mills, G.M. Morrison, L.B. Persson, J. Environ. Monit. 2 (2000) 487.
- [2] B. Vrana, G.A. Mills, E. Dominiak, R. Greenwood, Environ. Pollut. 142 (2006) 333.
- [3] R. Greenwood, G. Mills, B. Vrana, I.J. Allan, R. Aguilar, G. Morrison, in: R. Greenwood, G. Mills, B. Vrana (Eds.), Comprehensive Analytical Chemistry, vol. 48, Elsevier, Amsterdam, 2007, pp. 199–229.
- [4] L.B. Blom, G.M. Morrison, J. Kingston, G.A. Mills, R. Greenwood, T.J.R. Pettersson, S. Rauch, J. Environ. Monit. 4 (2002) 258.
- [5] Decision No 2455/2001/EC of the European Parliament and of the Council of 20 November 2001 establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC, Official Journal of the European Communities, 15.12.2001, L 331/2.
- [6] Commission of the European Communities, Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council on environmental quality standards in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC, Brussels, 2006, COM(2006) 397 final.
- [7] J.D. Petty, J.N. Huckins, D.B. Martin, T.G. Adornato, Chemosphere 30 (1995) 1891.
- [8] K. Booi, B.N. Zegers, J.P. Boon, Chemosphere 46 (2002) 683.
- [9] J.D. Petty, C.E. Orazio, J.N. Huckins, R.W. Gale, J.A. Lebo, J.C. Meadows, K.R. Echols, W.L. Cranor, J. Chromatogr. A 879 (2000) 83.
- [10] J.N. Huckins, G.K. Manuweera, J.D. Petty, D. Mackay, J.A. Lebo, Environ. Sci. Technol. 27 (1993) 2489.
- [11] J.N. Huckins, J.D. Petty, K. Booi, Monitors of organic chemicals in the environment: Semipermeable Membrane Devices, Springer Verlag, New York, 2006, p. 223.
- [12] J.N. Huckins, J.D. Petty, C.E. Orazio, J.A. Lebo, R.C. Clark, V.L. Gibson, W.R. Gala, K.R. Echols, Environ. Sci. Technol. 33 (1999) 3918.
- [13] E. Eljarrat, S. Lacorte, D. Barceló, J. Mass Spectrom. 37 (2002) 76.
- [14] A. de la Cal, E. Eljarrat, D. Raldúa, C. Durán, D. Barceló, Chemosphere 70 (2008) 1182.
- [15] B. Vrana, G. Mills, R. Greenwood, J. Knutsson, K. Svensson, G. Morrison, J. Environ. Monit. 7 (2005) 612.
- [16] D.A. Álvarez, J.N. Huckins, J.D. Petty, T. Jones-Lepp, F. Stuer-Lauridsen, T. Getting, J.P. Goddard, A. Gravel, in: R. Greenwood, G. Mills, B. Vrana (Eds.), Comprehensive Analytical Chemistry, vol. 48, Elsevier, Amsterdam, 2007, pp. 171–197.
- [17] E. Braekvelt, S.A. Tittlemier, G.T. Tomy, Chemosphere 51 (2003) 563–567.
- [18] H. Kuramochi, K. Maeda, K. Kawamoto, Chemosphere 67 (2007) 1858.
- [19] D. Mackay, W.Y. Shiu, K.C. Ma, Illustrated Handbook of Physical–Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals, Chelsea, MI, USA, 1991.
- [20] Z.L. Zhang, J. Huang, G. Yu, H.S. Hong, Environ. Pollut. 130 (2004) 249.
- [21] S. Tao, B.G. Li, X.C. He, W.X. Liu, Z. Shi, Chemosphere 68 (2007) 10.
- [22] K.H. Leong, L.L.B. Tan, A.M. Mustafa, Chemosphere 66 (2007) 1153.
- [23] D.R. Oros, D. Hoover, F. Rodigari, D. Crane, J. Sericano, Environ. Sci. Technol. 39 (2005) 33.
- [24] R.C. Hale, M. Alae, J.B. Manchester-Neesvig, H.M. Stapleton, M.G. Ikonou, Environ. Int. 29 (2003) 771.

■ 4.4. Discusión de resultados

4.4.1. Aplicabilidad del Chemcatcher al muestreo de PBDE y DDX

La participación en el proyecto STAMPS permitió tomar parte de manera activa en la optimización y validación del muestreador pasivo Chemcatcher[®]. Los PBDE y DDX, a los que se refiere el artículo #6, constituían el grupo de mayor hidrofobicidad de los contaminantes seleccionados para la validación del dispositivo dentro del proyecto. La evolución de la técnica desde la publicación del artículo permite valorar los resultados obtenidos entonces en cuanto a la aplicabilidad de este PSD para el monitoreo de PBDE y DDX en agua.

Como se explica en el artículo, para estos compuestos, la capacidad de acumulación del muestreador fue optimizada gracias al uso de una membrana de difusión de LDPE y a la adición de octanol a una fase aceptora de C18, que también funcionó con éxito para otros compuestos apolares de $\log K_{ow}$ entre 4 y 6.2 (Vrana *et al.*, 2005b). Sin embargo, la fuerte tendencia a unirse a la materia orgánica presente en el agua y a las superficies sólidas del sistema y la dificultad de determinar de manera precisa la fracción verdaderamente disuelta (especialmente en el caso de los PBDE), supuso un obstáculo a la hora de estimar los LOD del dispositivo y calibrar su capacidad de acumulación. Aun teniendo en cuenta la incertidumbre en la estimación de la concentración del agua y de la masa acumulada por los muestreadores para el cálculo de las R_s , la capacidad de acumulación calculada a partir de los experimentos de exposición, reflejada en LOD de entre 1.5 y 59 pg/L para los PBDE y de 0,5-8,4 ng/L para los DDX, resultó ser muy ajustada para cuantificar las bajas concentraciones en que se suelen encontrar estos compuestos en la fracción disuelta de los sistemas acuáticos, en el rango de los pg/L (Booij *et al.*, 2002) o inferiores (Booij *et al.*, 2002; Streets *et al.*, 2006; Vonderheide, 2009; Vecchiato *et al.*, 2015), y también para los EQS definidos por la EU en aguas superficiales (0,2-0,5 ng/L para PBDE y 25 ng/L para DDX) (EU, 2008). En relación con esto, aunque no se trata en el artículo, vale la pena mencionar que, una vez optimizados los métodos de acondicionamiento y tratamiento en el laboratorio y realizados los primeros experimentos de exposición, se llevó a cabo una campaña de muestreo en el río Cinca (aguas arriba y aguas abajo del foco de contaminación en Monzón) con el fin de evaluar en campo la aplicabilidad del Chemcatcher para el muestreo de PBDE y DDX. A pesar de que estos contaminantes habían sido detectados en el sedimento y en la biota de esas localizaciones (ver Capítulo 2), y en concordancia con los resultados obtenidos en el laboratorio, ninguno de ellos pudo detectarse en los muestreadores después de periodos de exposición de dos semanas.

Por otra parte, paralelamente a nuestros experimentos, el grupo de la Universidad de Portsmouth participante en el proyecto pudo describir un modelo empírico que relaciona las R_s con la hidrofobicidad de los analitos a partir de las calibraciones del Chemcatcher para PAH (Vrana *et al.*, 2007). La baja capacidad de acumulación por parte del Chemcatcher para PBDE y DDX es coherente con la tendencia definida por ese modelo, que predice R_s máximas para K_{ow} en torno a 4,5 y menores conforme aumenta la hidrofobicidad (Figura 33).

Muy recientemente, Petersen *et al.* (2015) han aportado nuevas R_s para el muestreo de PBDE y DDX con la misma versión del Chemcatcher que la nuestra. La Tabla 17 muestra la comparación de R_s para los analitos coincidentes. Esos autores midieron tasas de muestreo mucho mayores para los DDX, lo que atribuyen al hecho de que su experimento fue realizado en condiciones de turbulencia, mientras que en nuestro caso se mantuvo la agitación mínima para

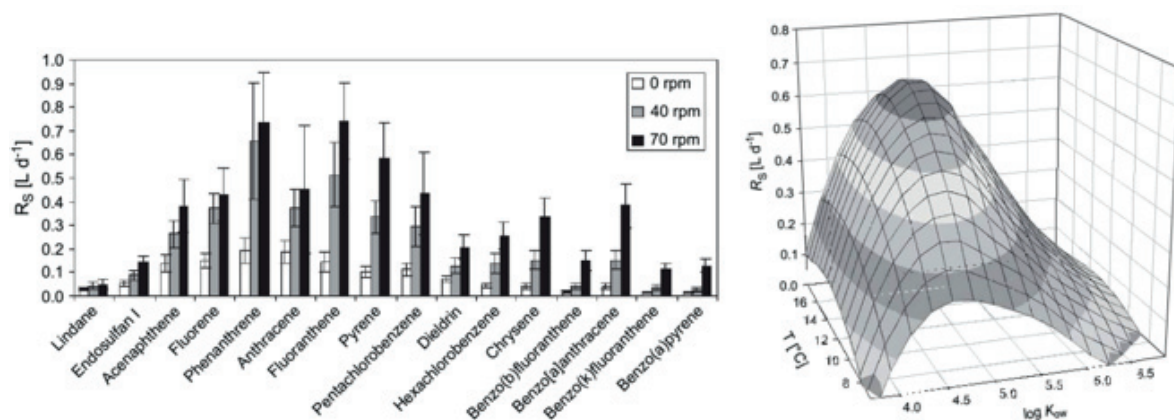


Figura 33. Variación de la R_s para PAH del Chemcatcher apolar en función de (a) de la hidrodinámica del agua (en términos de velocidad de rotación de los muestreadores) en orden creciente de hidrofobicidad y (b) de la temperatura y el $\log K_{ow}$ (Reproducidas de Vrana *et al.* (2006a) con permiso de Elsevier)

asegurar la mezcla de la solución patrón. Para compuestos muy hidrofóbicos, la acumulación de contaminantes en el muestreador viene controlada por la capa limitante de agua que se forma adyacente a la membrana. Puesto que la tasa de muestreo de los muestreadores aumenta con el flujo y la turbulencia del agua, al tiempo que el grosor de dicha capa disminuye, es plausible pensar que las R_s sean mayores en la experiencia de Petersen *et al.* (2015). No obstante, a juzgar por la variación de las R_s con el flujo del agua encontrada por Vrana *et al.* (2006a) para la misma versión de Chemcatcher no parece suficiente como para justificar una diferencia tan grande en las R_s de los DDX (Figura 33).

Tabla 17. Comparación de las tasas de muestreo obtenidas con los datos de bibliografía experimental y los predichos a partir del K_{ow} de los analitos.

		R_s [L/d]		
		Este trabajo	Petersen <i>et al.</i> (2015)	Estimadas a partir del modelo de Vrana <i>et al.</i> (2006a)
Temperatura		11 °C	13 °C	11 °C
Hidrodinámica		sin turbulencia	0.1 m/s	sin turbulencia
Analito	<i>o,p'</i> -DDE	0.002-0.003	0.81 ± 0.18	0.013
	<i>p,p'</i> -DDE	0.001-0.002	0.57 ± 0.15	0.010
	<i>o,p'</i> -DDD	0.003-0.007	0.65 ± 0.15	0.010
	PBDE 47	0.282-0.317	0.58 ± 0.15	0.013

En nuestro estudio sorprende la diferencia entre las R_s de los DDX, acordes con las estimaciones a partir del modelo de Vrana *et al.* (2006a), y las obtenidas para los PBDE, mucho mayores y mayores de lo que cabría esperar por la hidrofobicidad de estos compuestos. Sin embargo, las R_s por Petersen *et al.* (2015) son mucho más altas, del orden de las nuestras para PBDE. Sin embargo, más allá de las que se acaban de mencionar, no se han encontrado publicaciones que refieran el uso del Chemcatcher para PBDE o DDT que permitan esclarecer estas discordancias (Tabla 18).

No obstante, la imposibilidad del Chemcatcher para el muestreo de compuestos muy apolares ha sido puesta de manifiesto en otros estudios. Muestra de este comportamiento son, p. ej., los resultados de Allan *et al.* (2009), que evaluaron el rendimiento en campo de varios PSDs (incluyendo Chemcatcher no-polar, LDPE, MESCO, SR y SPMD) para el monitoreo de PAH, PCB, y pesticidas organoclorados. Tras exposiciones en campo simultáneas de 7-28 días en el río Mosa, estos autores pudieron comprobar que la mayoría de los compuestos con un $\log K_{ow}$ mayor de 5.2 no pudieron ser detectados en el Chemcatcher[®], ni tampoco en el MESCO, pero sí en los SPMD y las láminas de LDPE y de SR. Resultados similares se obtuvieron en un interlaboratorio realizado el río Rhône (France) (Miège *et al.*, 2012).

Esta disminución en las R_s a partir de cierto valor de hidrofobicidad también se ha observado en los experimentos de calibración de SPMD para compuestos con $\log K_{ow} > 6$ (Meadows *et al.*, 1998; Rantalainen *et al.*, 2000; Luellen & Shea, 2002; Huckins *et al.*, 2006; Vrana *et al.*, 2007) y se ha atribuido a la dificultad creciente para las moléculas más grandes para difundir en el LDPE de la membrana, que actuaría como limitante de la velocidad. No obstante, la unión de los contaminantes más hidrofóbicos al DOC, que reduciría la fracción disponible para los muestreadores pero no para las extracciones con disolventes del agua, puede resultar en una subestimación de las R_s que explicaría la tendencia a la baja observada para estos compuestos (Hermans *et al.*, 1992; Smedes, 1994). La Figura 34 muestra la representación gráfica de varios modelos empíricos o hipótesis para relacionar las R_s con la hidrofobicidad.

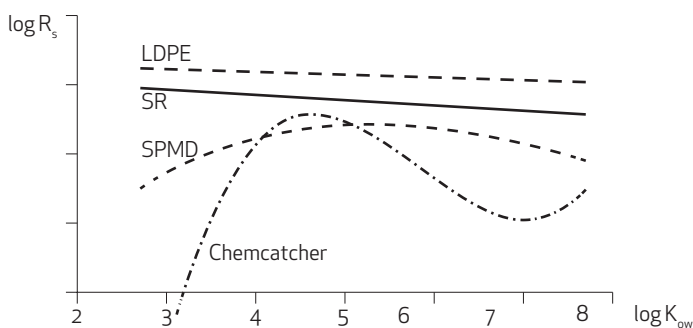


Figura 34. Perfil relativo de variación de las R_s en función del $\log K_{ow}$ para la versión apolar del Chemcatcher, SPMD, SR y LDPE, de acuerdo a los modelos de Vrana *et al.* (2007), Huckins *et al.* (2006), Rusina *et al.* (2010) y Booij *et al.* (2003), respectivamente (tomada de Rusina (2009) con permiso de la autora).

4.4.2. Valoración de la técnica

Un aspecto no profundizado en el artículo es la evaluación de la técnica en cuanto a su practicidad. Una de las cuestiones que se valoran positivamente a la hora de implementar el uso de muestreadores pasivos como técnica de rutina en el laboratorio es la simplificación que generalmente supone en el tratamiento de muestra. En nuestro caso, p. e., se consigue una recuperación del 89-100 % de los analitos acumulados en el muestreador en 10 minutos de extracción con US. Sin embargo, la puesta a punto de una metodología de trabajo para su calibración y validación, especialmente en lo tocante al diseño de un sistema que permita realizar experimentos de exposición en condiciones controladas como el sistema de flujo continuo construido para este

estudio (Figura 32), requiere un esfuerzo adicional no exento de dificultades técnicas que ha de valorarse (al menos en cuestión de tiempo) cuando se considera la adopción de esta tecnología en un laboratorio. En nuestra experiencia, la cuestión más problemática para el desarrollo de la calibración fue el mantenimiento de la entrada de analito en el tanque a concentración constante, debido a variaciones en el flujo de la solución patrón en metanol provocadas por la expansión o el estrangulamiento del tubo en la bomba peristáltica. También, el sistema utilizado para conservar la temperatura del agua en el tanque de exposición, con termostato y unidad refrigeradora independientes, fue causa de varias interrupciones de los experimentos debido a la congelación del agua entorno a la unidad refrigeradora. Con estos inconvenientes, pese a que con el método de extracción mediante US de los PBDE y DDX acumulados en los discos aceptores se obtuvo una buena repetitibilidad (1-5%), la variabilidad en la masa de analito acumulada entre duplicados de muestreadores expuestos llegó al 54 %. También como parte de esta valoración, un aspecto negativo que se ha de tener en cuenta es su limitación de uso en lugares con escasa altura de la columna de agua, con un hidrodinamismo excesivo o visibles al público. En nuestra experiencia, p. ej., estas limitaciones requirieron la modificación de los puntos concretos del muestreo respecto a los analizados en las campañas de muestreo comentadas en los capítulos anteriores.

4.4.3. Evolución de la técnica

A pesar de todos estos inconvenientes, y dada la dificultad para analizar la fracción realmente disuelta de los contaminantes muy hidrofóbicos, el PSD testado puede considerarse una técnica semi-cuantitativa válida para el monitoreo de PBDE y DDX, al menos en aguas muy contaminadas como efluentes de depuradoras. Para otro tipo de aguas, sin embargo, se ha de utilizar otro tipo de dispositivos, como los SPMD o ciertos muestreadores monofásicos, con los que se obtienen LOD menores.

Los SPMD tienen un área superficial mucho mayor que el Chemcatcher (460 frente a 17 cm²), lo que hace que sus R_s sean mayores (entre los 4 y los 80 L/día para compuestos hidrofóbicos (Huckins *et al.*, 2006). Por este motivo, aunque las R_s también disminuyen con el K_{ow} , estos dispositivos permiten el muestreo de contaminantes hasta un rango de K_{ow} más altos y ser utilizados para tareas de vigilancia por comparación con EQS o el monitoreo de tendencias para analitos con $\log K_{ow}$ de hasta 7.5 (Allan *et al.*, 2006a; Allan *et al.*, 2006b). En cambio, el uso del Chemcatcher para estos contaminantes se vería limitado al monitoreo en lugares donde se espera que las concentraciones sean elevadas como, p. ej., efluentes de aguas residuales.

En años posteriores a la finalización del proyecto STAMPS han continuado apareciendo publicaciones en que se ha utilizado el Chemcatcher, aunque pocas con la versión apolar (Tabla 18). Los SPMD siguen siendo el PSD más avanzado para el muestreo de contaminantes hidrofóbicos en agua y eso se refleja en el número de publicaciones con cada una de esos dispositivos. No obstante, como se comentó en el capítulo 1, en la actualidad existe una tendencia encaminada a la sustitución de los SPMD y, en general, de los muestreadores bifásicos por el uso de sistemas monofásicos, tales como LDPE y silicona de diferentes dimensiones. Los muestreadores monofásicos son de bajo coste y evitan largos procedimientos de limpieza (p. ej., extracción de analitos de la fase receptora de trioleína de elevado peso molecular), y pueden ser más fácilmente

preparados y dopados con PRCs por los investigadores y los usuarios finales. Además, al carecer de membrana de difusión limitante tienen menos tiempo de retardo y, por tanto, una capacidad de respuesta inmediata, lo que los hace mejores en integrar eventos de concentración variable.

Finalmente, y en relación a la aceptación de la técnica, aunque los dispositivos de muestreo pasivo que se utilizan para medir las concentraciones de contaminantes no polares y, en particular, los SPMD, son considerados como una tecnología madura, suficientemente robusta, hasta ahora, su uso por parte de agencias gubernamentales en los programas de vigilancia se ha limitado a estudios ocasionales asociados a proyectos (ITRC, 2006; Smedes *et al.*, 2007) mientras que la mayoría de los usos han tenido lugar en el ámbito investigativo. Una de las cuestiones que ralentizan la adopción de la técnica del muestreo pasivo para la vigilancia de la contaminación en aguas de manera rutinaria es la falta de objetivos claros y de procedimientos o métodos estandarizados con límites adecuados de detección, precisión y exactitud que estén disponibles fácilmente y que transmitan confianza (Allan *et al.*, 2009). No obstante, en los últimos años se han hecho muchos esfuerzos por mejorar la técnica y demostrar que se trata de una técnica suficientemente robusta. Recientemente se han llevado a cabo varios estudios de campo interlaboratorios en Europa (el IPSIC 2010, el proyecto ECLIPSE (2009-2010), el organizado por AQUAREF en 2010 (Miège *et al.*, 2012) o el organizado por NORMAN y el European DG Joint Research Centre en 2011). Un empuje sumamente importante ha venido de la publicación en 2011 de la norma ISO 5667-23:2011 (ISO, 2011), que fue desarrollada a partir de una especificación británica desarrollada en el marco del proyecto STAMPS en 2006 (BSI, 2006). En ella se especifican los procedimientos para la determinación en aguas de concentraciones disueltas ponderadas en el tiempo y concentraciones de equilibrio tanto de sustancias orgánicas como organometálicas e inorgánicas.

Hasta la fecha, no tenemos conocimiento de ningún caso todavía donde ya hayan sido aceptados los PSD para el control del cumplimiento dentro de un marco normativo, como lo son los dispositivos que se utilizan para medir la concentración de los contaminantes atmosféricos. Más aún, las EQS que se han definido en el marco la WFD europea para el monitoreo de la calidad del agua de los contaminantes orgánicos hidrofóbicos se basan en la concentración total del contaminante en el agua, siguiendo un principio contrario a los muestreadores pasivos que miden la fracción verdaderamente disuelta (Allan *et al.*, 2006a). No obstante, en la Directiva 2013/39/EU del Parlamento Europeo de 2013 que enmienda a las Directivas 2000/60/EC (WFD) y 2008/105/EC (Directiva sobre EQS) se hace una mención explícita a los PS: “Nuevos métodos de seguimiento, como el muestreo pasivo y otros instrumentos, resultan prometedores para su futura aplicación, por lo que conviene proseguir su desarrollo.”

En general, y viendo que el número de usuarios finales es cada vez mayor, tanto para estudios en la columna de agua como en sedimento, parece esperable que en el futuro la vigilancia de la contaminación en aguas siga una evolución similar a la que del monitoreo del aire, en que los datos obtenidos de muestreadores pasivos son usados habitualmente para vigilar el cumplimiento de las normativas (Mills *et al.*, 2011). En todo caso, los datos de estos dispositivos pueden ser utilizados junto con los resultados obtenidos a partir de muestreo convencional para mejorar las evaluaciones de riesgo y para informar las decisiones sobre la realización de acciones correctivas potencialmente costosas.

Tabla 18. Configuraciones de Chemcatcher que se han utilizado para contaminantes orgánicos y tasas de muestreo recogidas de la literatura científica.

Análito	Fase aceptora (disco Empore)	Membrana limitante	Tasas de muestreo (L/d)	Referencia
PAH	C18 + n-octanol	LDPE	0,015-0,195	(Vrana <i>et al.</i> , 2005c)
	C18 + n-octanol	LDPE	n.d.-1,379	(Vrana <i>et al.</i> , 2006a)
	C18 + n-octanol	LDPE	0.100-1,400	(Lobpreis <i>et al.</i> , 2008)
	C18 + n-octanol	LDPE	0.003-0,424	(Vrana <i>et al.</i> , 2010)
Clorobencenos	C18 + n-octanol	LDPE	n.d.-0,849	(Vrana <i>et al.</i> 2006a)
	C18 + n-octanol	LDPE	0.019-0,283	(Vrana <i>et al.</i> , 2010)
PBDE	C18 + n-octanol	LDPE	0.251-0,317 (0.055-0,282)	Este trabajo
	C18 + n-octanol	LDPE	0,150-0,580	(Petersen <i>et al.</i> , 2015)
PCB	C18 + n-octanol	LDPE	0.220-0,700	(Jacquet <i>et al.</i> , 2014)
	C18 + n-octanol	LDPE	0,190-0,890	(Petersen <i>et al.</i> , 2015)
OCP	C18 + n-octanol	LDPE	n.d.-0,323	(Vrana <i>et al.</i> , 2006a)
	C18 + n-octanol	LDPE	0,001-0.003 (0.002-0,013)	Este trabajo
	SDB-XC	s/m	0,380-0,420	(Gunold <i>et al.</i> , 2008)
	C18 + n-octanol	LDPE	0.008-0,191	(Vrana <i>et al.</i> , 2010)
	C18 + n-octanol	LDPE	0,400-0,810	(Petersen <i>et al.</i> , 2015)
Pesticidas polares y semipolares	C18	s/m	0,740-1,400	(Stephens <i>et al.</i> , 2005)
	SDB-RPS	s/m	0,600-1,320	
	SDB-RPS	s/m		(Stephens <i>et al.</i> , 2009)
	SDB-XC	s/m	0,120-0,380	(Gunold <i>et al.</i> , 2008)
	SDB-XC	s/m	0,019-0,071	(Schäfer <i>et al.</i> , 2008)
	SDB-XC	PES	0,002-0,035	
	SDB-RPS	s/m	0,460-0,750	(Shaw & Mueller, 2009)
	SDB-RPS	PES	0,070-0,170	
	SDB-RPS	s/m	n.d.-0,670	(Shaw <i>et al.</i> , 2009)
	SDB-RPS	PES	n.d.-0,210	
	SDB-RPS	PES	0,009-0,136	(O'Brien <i>et al.</i> , 2011)
	C18	PES	0,007-0,081	(Camilleri <i>et al.</i> , 2012)
	SDB-XC	s/m	0,090-1,120	(Vermeirssen <i>et al.</i> , 2009)
	SDB-RPS	s/m	0,090-1,010	
	SDB-RPS	PES	0,030-0,130	
	SDB-RPS	PES	0,021-0,098	(Vermeirssen <i>et al.</i> , 2012)
SDB-RPS	s/m	0,070-0,800	(Vermeirssen <i>et al.</i> , 2013)	

Tabla 18. (Continuación)

Analito	Fase aceptora (disco Empore)	Membrana limitante	Tasas de muestreo (L/d)	Referencia
Pesticidas polares y semipolares	SDB-RPS	s/m	0,008-0,023	(Sánchez-Bayo <i>et al.</i> , 2013) (Sánchez-Bayo & Hyne, 2014)
	SDB-RPS	PES	0,051-0,234	(Kaserzon <i>et al.</i> , 2014)
	SDB-XC	PES	0,278-0,679	
	SDB-RPS	s/m	0,260-0,770	(Fernández <i>et al.</i> , 2014)
	SDB-RPS	PES	0,020-0,400	(Moschet <i>et al.</i> , 2015)
Alquilfenoles	C18	PES	0,022	(Camilleri <i>et al.</i> , 2012)
	C18	s/m	0,600-1,300	(Ahkola <i>et al.</i> , 2014)
	SDB-RPS	s/m	0,300-0,980	
	SDB-XC	s/m	0,600-1,280	
Farmacos, drogas y sus metabolitos	SDB-RPS	s/m	0,090-0,250	(Vermeirssen <i>et al.</i> , 2008)
	SDB-XC	s/m	0,080-0,220	(Vermeirssen <i>et al.</i> , 2009)
	SDB-RPS	s/m	0,140-0,180	
	SDB-RPS	PES	0,080-0,090	
	C18 + n-octanol	PES	0,120-0,310	(Kuster <i>et al.</i> , 2010)
	SDB-RPS	PES	0,020-0,098	(Vermeirssen <i>et al.</i> , 2012)
	SDB-RPS	s/m	0,110-0,770	(Vermeirssen <i>et al.</i> , 2013)
	C18	PES	0,062-0,162	(Camilleri <i>et al.</i> , 2012)
	SDB-RPS	PES	0,067-0,194	(Kaserzon <i>et al.</i> , 2014)
	SDB-XC	PES	0,192-0,782	
	SDB-RPS	PES	0,003-0,100	(Moschet <i>et al.</i> , 2015)
Bisfenol A	C18	PES	0,104	(Camilleri <i>et al.</i> , 2012)
3,4-Dicloroaniline	C18	PES	0,005	(Camilleri <i>et al.</i> , 2012)
Filtros UV	C18	PES	0,091	(Camilleri <i>et al.</i> , 2012)
Endulzantes artificiales	SDB-RPS	PES	0,0002-0,030	(Moschet <i>et al.</i> , 2015)
Anticorrosivos	SDB-RPS	s/m	0,050-0,290	(Vermeirssen <i>et al.</i> , 2013)
	SDB-RPS	PES	0,025-0,060	(Vermeirssen <i>et al.</i> , 2012)
	SDB-RPS	PES	0,040-0,050	(Moschet <i>et al.</i> , 2015)

s/m: sin membrana; D: membrana de celulosa de diálisis; PS: Polisulfona; PE: polietileno

5

Conclusiones generales

En base a los objetivos iniciales planteados y a partir de los resultados del trabajo experimental que se llevó a cabo durante la tesis, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

En lo que se refiere a los métodos de análisis convencional:

- Se puso a punto un protocolo analítico de extracción y purificación simultánea mediante SPLE para la determinación de la concentración total de PBDE y DDX en sedimentos. El método desarrollado permitió obtener extractos limpios, listos para el análisis instrumental por GC-MS. Esto supuso una reducción considerable de tiempo de análisis, manipulación de la muestra, uso de disolventes y generación de residuos en comparación con los métodos clásicos. A diferencia de los DDX, analizados mediante EI-MS, para los PBDE el modo de ionización de NCI resultó ser el más adecuado a pesar de la menor selectividad, debido a la presencia en los extractos de compuestos clorados que interferían con algunos congéneres y a la alta sensibilidad obtenida. Para evitar la degradación del BDE-209, además, fue necesario utilizar un programa cromatográfico más corto.
- Los métodos desarrollados permiten cuantificar un total de 40 congéneres de mono- a decaBDE, así como los isómeros o,p'- y p,p'- del DDT y sus metabolitos, con recuperaciones de entre 53 y 102 %, una RSD máxima del 19% y LOD de 6-75 pg/g dw. La mayor variabilidad se obtuvo con el BDE-209, tanto en el análisis GC-MS como en la preparación de muestra, debido a su alta hidrofobicidad y su degradación a congéneres de menor grado de bromación. Además, las condiciones optimizadas demostraron ser eficientes en el análisis de peces, con recuperaciones y variabilidad similares a los sedimentos y LOD de 2 a 204 pg/g ww. Sin embargo, en estudios posteriores se vio que en algunos casos era necesaria una etapa de purificación adicional mediante digestión ácida del extracto.
- La aplicación del método desarrollado demostró por primera vez la presencia ubicua de los PBDE en los sedimentos costeros peninsulares. Los niveles encontrados, dominados por el BDE-209, reflejaban el grado de industrialización de las áreas de estudio, con los valores mayores en la costa de Cataluña (3,2-73 ng/g dw).
- Se llevó a cabo un estudio a lo largo del río Cinca que demostró la aportación que se da en la zona industrial de Monzón a la contaminación de la cuenca aguas abajo, tanto para los PBDE como para los DDX. Los resultados en peces, con concentraciones similares en alburnos y barbos, mostraban un incremento de las concentraciones con la edad que indicaba la existencia de bioacumulación. Sin embargo, mientras que los sedimentos mostraron un patrón de PBDE dominado por el BDE-209 (al igual que ocurría en las muestras costeras), en los peces este congénere no pudo ser detectado. Por el contrario, los BDE-47, BDE-153, BDE-154 y BDE-183, con BSAF de 12-201 g OC / g lw, fueron mucho mayores relativamente en los peces. El p,p'-DDE, mayoritario en sedimentos, es mucho mayor proporcionalmente en los peces, aunque el grado de bioacumulación es mucho menor que los PBDE encontrados.
- La aplicación de la metodología desarrollada mediante la SPLE y la monitorización del ión bromuro por GC-NCI-MS permitió la detección de HBCD en las muestras del río Cinca. El método resultó ser válido para el análisis del HBCD tanto en sedimentos como en peces, con recuperaciones de 83 y 88 %, RSD de 21-23% y LOD de 465 pg/g dw y 570 pg/g ww. No obstante, en el cromatograma de GC-MS, el HBCD aparece como un pico poco resuelto,

mientras que la utilización de LC-MS en estudios posteriores permitió la separación de los isómeros α -, β - y β -HBCD.

- En el estudio de 2004-2005 con LC-MS, se pudo observar que el γ -HBCD dominaba los perfiles isoméricos tanto en sedimento como en peces. El hecho de no encontrar una predominancia del α -HBCD en biota, como sería de esperar, es probablemente debido a una entrada importante de manera continuada, que diluiría el efecto de los mecanismos que favorecen la acumulación de α en biota.

- El hallazgo de HBCD en las muestras del Cinca, por segunda vez en seres vivos, aunque con un BSAF inferior al de PBDE y DDX (0.55 g OC / g lw), evidenció la necesidad de profundizar en el estudio de la distribución, el destino y los efectos de este compuesto y de cuestionar su posible uso como sustituto de los PBDE.

- La variación entre los perfiles de contaminantes en sedimento y biota pone de manifiesto las limitaciones del análisis de matrices abióticas para extrapolar las concentraciones significativas para los organismos vivos.

En lo que se refiere a las técnicas biomiméticas:

- La aplicación de la técnica de extracción acuosa con Tenax a muestras de sedimento permitió abordar por primera vez la accesibilidad de PBDE, DDX y HBCD en este compartimento ambiental, diferenciando la fracción susceptible de pasar a la fase disuelta rápidamente (Frap) (fácilmente disponible para los organismos vivos) de la carga total de PBDE y DDX que se recupera mediante las técnicas de extracción exhaustiva como la SPLE.

- La presencia de una fracción residual de contaminante incluso después de 18 días de extracción acuosa demostró la rapidez con que una parte de la carga de estos contaminantes se asocia de manera casi irreversible con la fase particulada, con la consecuente pérdida de biodisponibilidad.

- Las curvas de desorción del sedimento obtenidas muestran que las diferencias en la fuerza de la unión a la fase particulada del sedimento es una de las causas que contribuyen al patrón usual en biota, ya que los congéneres o los isómeros menos extractables son también aquellos que presentan una relación menor entre las concentraciones en biota y sedimento. Esta secuestro por parte del sedimento es mayor para los PBDE más bromados que para los menos sustituidos, el DDT frente al DDE, los isómeros p,p' - frente a los o,p' -DDX y para el isómero γ -HBCD frente al α -HBCD. La tendencia que muestran estos experimentos sugiere que los PBDE muy bromados tienen una biodisponibilidad muy baja, lo que debe ser tenido en cuenta cuando se evalúa el riesgo que esos contaminantes suponen en el ambiente.

- Las relaciones entre las cantidades extraídas a tiempos de 6 y 24 h y la F_{rap} obtenida a partir de la curva completa de desorción son muy variables en función del analito y del sedimento. Por ello, no es posible obtener una estimación de la F_{rap} a partir de una sola extracción durante un tiempo fijo con una buena precisión. No obstante, una extracción de 24 h es un tiempo suficiente para extraer la F_{rap} para casi todos los analitos en consideración. La revisión bibliográfica de los datos existentes para estos y otros analitos corrobora esta conclusión.

- El estudio que se llevó a cabo para evaluar la aplicabilidad del Chemcatcher® para el muestreo de PBDE y DDX en agua demostró una capacidad de acumulación para estos compues-

tos sensiblemente mayor cuando se usa un disco de C18 saturado con octanol como fase aceptora y LDPE como membrana limitante de difusión.

- Los LOD calculados a partir de los experimentos de exposición en condiciones controladas de laboratorio fueron de entre 1.5 y 59 pg/L para los PBDE y de 0,5-8,4 ng/L para los DDX. En el río Cinca, donde el dispositivo fue expuesto durante dos semanas, no se pudo cuantificar ninguno de estos contaminantes, aun cuando sí estaban presentes en sedimentos y biota. Estos resultados son coherentes con el modelo empírico entre R_s e hidrofobicidad de los analitos para este dispositivo, que predice una menor sensibilidad para analitos tan hidrofóbicos (Vrana et al., 2007) y con estudios que han mostrado la incapacidad del Chemcatcher para el muestreo de compuestos muy apolares en campo, pero no con un estudio más reciente (Petersen et al., 2015). Esta falta de concordancia y la probada variabilidad de las tasas de muestreo en función de las condiciones ambientales harían necesarios experimentos de calibración a diferentes temperaturas y turbulencia del agua, con el fin de extraer conclusiones más definitivas.

- Los resultados obtenidos indican que, pese a que este sistema no puede competir en términos de exactitud y reproducibilidad con el análisis de muestras puntuales en el laboratorio, presenta una serie de ventajas que lo convierten en una técnica semicuantitativa válida para el monitoreo de contaminantes en cuerpos de agua muy contaminados (p. ej., efluentes de depuradoras). Esta posibilidad supone una mejora sobre la evaluación de la contaminación en agua tradicional, tanto sobre el análisis de muestras de agua como sobre biomonitoreo. Para aguas superficiales, sin embargo, se requiere el uso de otro tipo de dispositivos, como SPMD o muestreadores de LPDE, con los que se consiguen LOD menores.

- A pesar de que el uso de muestreadores pasivos supone una simplificación del tratamiento de muestra, la puesta a punto de una metodología de trabajo para su calibración y validación requiere un esfuerzo adicional no exento de dificultades técnicas que ha de valorarse (al menos en cuestión de tiempo) cuando se considera la adopción de esta tecnología en un laboratorio.

Por último, y de manera general, se puede decir que la utilización en el transcurso del trabajo experimental de técnicas enfocadas a la medición de las fracciones de PBDE, DDX y HBCD presentes en los distintos compartimentos del medio acuático (biota, fracción asociada al sedimento y fracción disuelta) permitió ampliar la información disponible sobre el impacto ambiental de estas sustancias. El conocimiento de la distribución en el medioambiente de los contaminantes organohalogenados ha evolucionado mucho desde que se comenzó este trabajo, especialmente en el caso de los PBDE, que en ese momento eran contaminantes emergentes. A día de hoy existe un importante volumen de información sobre concentraciones en distintos compartimentos ambientales y algunas de las sospechas que entonces comenzaban a captar la atención científica hoy son ya evidencias. Sin embargo, sigue existiendo una brecha entre este conocimiento y las medidas utilizadas para la vigilancia ambiental de estos compuestos a nivel administrativo, debido a la dificultad para definir medidas concretas y robustas que aseguren el cumplimiento del principio de precaución.

Los métodos propuestos en la presente tesis constituyen herramientas analíticas que facilitan la incorporación del concepto de biodisponibilidad al control de la calidad de los sistemas acuáticos. La primera metodología desarrollada para el análisis de estos compuestos en sedimentos y biota (capítulo 2) cumple con los criterios legislativos requeridos en cuanto a precisión y exactitud. Las técnicas aplicadas en los capítulos 3 y 4, que se basan en la utilización de materiales capaces de retener los compuestos hidrófobos como sustitutos de la fase lipídica de la biota (más adecuadas para predecir la biodisponibilidad y la exposición real de la biota a los contaminantes) siguen sin ser aceptadas todavía a nivel legislativo para el control de la contaminación ambiental. No obstante, su incorporación parece cada día más cercana conforme se realizan avances que mejoran su robustez y son utilizadas con éxito en estudios de investigación. En cualquier caso, los datos proporcionados por estas técnicas contribuyen a una evaluación más realista de los riesgos, que puede suponer un paso adelante en la disyuntiva coste-beneficio y facilitar la gestión eficaz de los recursos disponibles.

REFERENCIAS

- Abdallah MAE, Ibarra C, Neels H, Harrad S & Covaci A. (2008). Comparative evaluation of liquid chromatography-mass spectrometry versus gas chromatography-mass spectrometry for the determination of hexabromocyclododecanes and their degradation products in indoor dust. *Journal of Chromatography A* 1190, 333-341.
- Abdallah MAE, Drage D & Harrad S. (2013). A one-step extraction/clean-up method for determination of PCBs, PBDEs and HBCDs in environmental solid matrices. *Environmental Science: Processes & Impacts* 15, 2279-2287.
- Abdelouahab N, Suvorov A, Pasquier JC, Langlois MF, Praud JP & Takser L. (2009). Thyroid disruption by low-dose BDE-47 in prenatally exposed lambs. *Neonatology* 96, 120-124.
- Adams RG, Lohmann R, Fernandez LA, MacFarlane JK & Gschwend PM. (2007). Polyethylene devices: Passive samplers for measuring dissolved hydrophobic organic compounds in aquatic environments. *Environmental Science and Technology* 41, 1317-1323.
- Addeck A, Croes K, Van Langenhove K, Denison MS, Elhamalawy A, Elskens M & Baeyens W. (2014). Time-integrated monitoring of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans (PCDD/Fs) in urban and industrial wastewaters using a ceramic toximeter and the CALUX bioassay. *Chemosphere* 94, 27-35.
- Ademollo N, Patrolecco L, Polesello S, Valsecchi S, Wollgast J, Mariani G & Hanke G. (2012). The analytical problem of measuring total concentrations of organic pollutants in whole water. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 36, 71-81.
- Aguilar L, Williams ES, Brooks BW & Usenko S. (2014). Development and application of a novel method for high-throughput determination of PCDD/Fs and PCBs in sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33, 1529-1536.
- Aguilar-Martínez R, Greenwood R, Mills GA, Vrana B, Palacios-Corvillo MA & Gómez-Gómez MM. (2008). Assessment of Chemcatcher passive sampler for the monitoring of inorganic mercury and organotin compounds in water. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 88, 75-90.
- Aguilar-Martínez R, Gómez-Gómez MM, Greenwood R, Mills GA, Vrana B & Palacios-Corvillo MA. (2009). Application of Chemcatcher passive sampler for monitoring levels of mercury in contaminated river water. *Talanta* 77, 1483-1489.
- Ahkola H, Herve S & Knuutinen J. (2014). Study of different Chemcatcher configurations in the monitoring of nonylphenol ethoxylates and nonylphenol in aquatic environment. *Environmental Science and Pollution Research*.
- Akkanen J & Kukkonen JVK. (2001). Effects of water hardness and dissolved organic material on bioavailability of selected organic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 2303-2308.
- Akkanen J, Tuikka A & Kukkonen JVK. (2012). On the borderline of dissolved and particulate organic matter: Partitioning and bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 78, 91-98.
- Alaee M, Backus S & Cannon C. (2001). Potential interference of PBDEs in the determination of PCBs and other organochlorine contaminants using electron capture detection. *Journal of Separation Science* 24, 465-469.
- Alaee M, Sergeant DB, Ikononou MG, Luross JM (2001) A gas chromatography/high-resolution mass spectrometry (GC/HRMS) method for determination of polybrominated diphenyl ethers in fish. *Chemosphere* 44(6), 1489-1495.
- Alañón ME, Ramos L, Díaz-Maroto MC, Pérez-Coello MS & Sanz J. (2009). Extraction of volatile and semi-volatile components from oak wood used for aging wine by miniaturised pressurised liquid technique. *International Journal of Food Science and Technology* 44, 1825-1835.
- Alcock RE, MacGillivray BH & Busby JS. (2011). Understanding the mismatch between the demands of risk assessment and practice of scientists - The case of Deca-BDE. *Environment International* 37, 216-225.
- Alivernini S, Battistelli CL & Turrio-Baldassarri L. (2011). Human milk as a vector and an indicator of exposure to PCBs and PBDEs: Temporal trend of samples collected in Rome. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 87, 21-25.
- Allan IJ, Vrana B, Greenwood R, Mills GA, Knutsson J, Holmberg A, Guigues N, Fouillac AM & Laschi S. (2006a). Strategic monitoring for the European Water Framework Directive. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 25, 704-715.
- Allan IJ, Vrana B, Greenwood R, Mills GA, Roig B & Gonzalez C. (2006b). A "toolbox" for biological and chemical monitoring requirements for the European Union's Water Framework Directive. *Talanta* 69, 302-322.
- Allan IJ, Knutsson J, Guigues N, Mills GA, Fouillac AM & Greenwood R. (2007). Evaluation of the Chemcatcher and DGT passive samplers for monitoring metals with highly fluctuating water concentrations. *Journal of Environmental Monitoring* 9, 672-681.
- Allan IJ, Booij K, Paschke A, Vrana B, Mills GA & Greenwood R. (2009). Field performance of seven passive sampling devices for monitoring of hydrophobic substances. *Environmental Science and Technology* 43, 5383-5390.

- Allen-King RM, Grathwohl P & Ball WP. (2002). New modeling paradigms for the sorption of hydrophobic organic chemicals to heterogeneous carbonaceous matter in soils, sediments, and rocks. *Advances in Water Resources* 25, 985-1016.
- Alvarez D, Perkins S, Nilsen E & Morace J. (2014). Spatial and temporal trends in occurrence of emerging and legacy contaminants in the Lower Columbia River 2008-2010. *Science of the Total Environment* 484, 322-330.
- AMPS Expert Group (2005). Contributions of the Expert Group on Analysis and Monitoring of Priority Substances to the Water Framework Directive Expert Advisory Forum on Priority Substances and Pollution Control, EU Report EUR 21587 EN, European, Communities, 2005, p. 133.
- Anastassiades M, Lehotay SJ, Štajnbaher D & Schenck FJ. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International* 86, 412-431.
- Aneck-Hahn NH, Schulenburg GW, Bornman MS, Farias P & De Jager C. (2007). Impaired semen quality associated with environmental DDT exposure in young men living in a malaria area in the Province, South Africa. *Journal of Andrology* 28, 423-434.
- AOAC (2010). *Official Methods of Analysis, Pesticide and Industrial Chemical Residues*, AOAC International, Arlington, VA, USA, 1995 (Chapter 10).
- Arnot JA & Mackay D. (2008). Policies for chemical hazard and risk priority setting: Can persistence, bioaccumulation, toxicity, and quantity information be combined? *Environmental Science and Technology* 42, 4648-4654.
- Arthur CL & Pawliszyn J. (1990). Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused-silica optical fibers. *Anal Chem* 62, 2145-2148.
- Asante KA, Adu-Kumi S, Nakahiro K, Takahashi S, Isobe T, Sudaryanto A, Devanathan G, Clarke E, Ansa-Asare OD, Dapaah-Siakwan S & Tanabe S. (2011). Human exposure to PCBs, PBDEs and HBCDs in Ghana: Temporal variation, sources of exposure and estimation of daily intakes by infants. *Environment International* 37, 921-928.
- Athanasiadou M, Marsh G, Athanassiadis I, Asplund L & Bergman Å. (2006). Gas chromatography and mass spectrometry of methoxylated polybrominated diphenyl ethers (MeO-PBDEs). *Journal of Mass Spectrometry* 41, 790-801.
- ATSDR (2002). *Toxicological Profile for DDT, DDE, DDD*, US. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Baczynski TP, Pleissner D & Grotenhuis T. (2010). Anaerobic biodegradation of organochlorine pesticides in contaminated soil - Significance of temperature and availability. *Chemosphere* 78, 22-28.
- Ballschmiter K & Zell M. (1980). Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography - Composition of technical aroclor- and Clophen-PCB mixtures. *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie* 302, 20-31.
- Baltussen E, Sandra P, David F & Cramers C. (1999). Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. *Journal of Microcolumn Separations* 11, 737-747.
- Bao LJ, You J, Zeng EY. (2011) Sorption of PBDE in low-density polyethylene film: implications for bioavailability of BDE-209. *Environ Toxicol Chem* 30(8):1731-1738.
- Barker SA. (2007). Matrix solid phase dispersion (MSPD). *J Biochem Biophys Methods* 70(2):151-162.
- Barón E, Giménez J, Verborgh P, Gauffier P, De Stephanis R, Eljarrat E & Barceló D. (2015). Bioaccumulation and biomagnification of classical flame retardants, related halogenated natural compounds and alternative flame retardants in three delphinids from Southern European waters. *Environmental Pollution* 203, 107-115.
- Barontini F, Cozzani V, Cuzzola A & Petarca L. (2001). Investigation of hexabromocyclododecane thermal degradation pathways by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 15, 690-698.
- Barri T, Jönsson JA | 2009 | *Modern Techniques of Analyte Extraction*. En: *Analytical Measurements in Aquatic Environments*. Editado por Namiesnik J, Szefer P. Analytical Chemistry Series. CRC Press, 503 páginas.
- Bayen S, Laak TLL, Buffle J & Hermens JLM. (2009). Dynamic exposure of organisms and passive samplers to hydrophobic chemicals. *Environmental Science and Technology* 43, 2206-2215.
- Bayen S, Lee HK & Obbard JP. (2004). Determination of polybrominated diphenyl ethers in marine biological tissues using microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A* 1035, 291-294.
- Beard J. (2006). DDT and human health. *Science of the Total Environment* 355, 78-89.

- Bendig P & Vetter W. (2013). Improved GC/ECNI-MS sensitivity of decabromodiphenyl ether determination on 30 m columns by increasing the carrier gas flow after a modified gel permeation chromatographic cleanup protocol employing cyclohexane/ethyl acetate as eluent. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 93, 1019-1029.
- Benedict RT, Stapleton HM, Letcher RJ & Mitchelmore CL. (2007). Debromination of polybrominated diphenyl ether-99 (BDE-99) in carp (*Cyprinus carpio*) microflora and microsomes. *Chemosphere* 69, 987-993.
- Berg H, Kiibus M & Kautsky N. (1992). DDT and other insecticides in the Lake Kariba ecosystem, Zimbabwe. *Ambio* 21, 444-450.
- Betts K. (2008). Does a key PBDE break down in the environment? *Environmental Science and Technology* 42, 6781.
- Birnbaum LS & Staskal DF. (2004). Brominated flame retardants: Cause for concern? *Environmental Health Perspectives* 112, 9-17.
- Björklund E, Muller A & von Holst C. (2001). Comparison of fat retainers in accelerated solvent extraction for the selective extraction of PCBs from fat-containing samples. *Analytical Chemistry* 73, 4050-4053.
- Björklund J, Tollbäck P & Östman C. (2003a). Mass spectrometric characteristics of decabromodiphenyl ether and the application of isotopic dilution in the electron capture negative ionization mode for the analysis of polybrominated diphenyl ethers. *Journal of Mass Spectrometry* 38, 394-400.
- Björklund J, Tollbäck P, Dyremark E & Östman C. (2003b). Automated rotary valve injection for polybrominated diphenyl ethers in gas chromatography. *Journal of Separation Science* 26, 594-600.
- Björklund J, Tollbäck P, Hiärne C, Dyremark E & Östman C. (2004). Influence of the injection technique and the column system on gas chromatographic determination of polybrominated diphenyl ethers. *Journal of Chromatography A* 1041, 201-210.
- Blanco SL & Vieites JM. (2010). Single-run determination of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) di- to decabrominated in fish meal, fish and fish feed by isotope dilution: Application of automated sample purification and gas chromatography/ion trap tandem mass spectrometry (GC/ITMS). *Analytica Chimica Acta* 672, 137-146.
- Blom LB, Morrison GM, Kingston J, Mills GA, Greenwood R, Pettersson TJR & Rauch S. (2002). Performance of an in situ passive sampling system for metals in stormwater. *Journal of Environmental Monitoring* 4, 258-262.
- Bodin N, Tapie N, Le Ménach K, Chassot E, Elie P, Rochard E & Budzinski H. (2014). PCB contamination in fish community from the gironde estuary (france): Blast from the past. *Chemosphere* 98, 66-72.
- BOE (1975) Boletín Oficial del Estado Núm 308, December 24th, 1975. Ministerio de Agricultura, Orden del 4 de diciembre por la que se restringe el uso de ciertos plaguicidas.
- Booij K, Zegers BN & Boon JP. (2002). Levels of some polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants along the Dutch coast as derived from their accumulation in SPMDs and blue mussels (*Mytilus edulis*). *Chemosphere* 46, 683-688.
- Booij K, Hofmans HE, Fischer CV & Van Weerlee EM. (2003). Temperature-dependent uptake rates of nonpolar organic compounds by semipermeable membrane devices and low-density polyethylene membranes. *Environmental Science and Technology* 37, 361-366.
- Booij K, Smedes F, Van Weerlee EM & Honkoop PJC. (2006). Environmental monitoring of hydrophobic organic contaminants: The case of mussels versus semipermeable membrane devices. *Environmental Science and Technology* 40, 3893-3900.
- Boopathy R & Manning J. (1999). Surfactant-enhanced bioremediation of soil contaminated with 2,4,6- trinitrotoluene in soil slurry reactors. *Water Environment Research* 71, 119-124.
- Bordajandi LR, Ramos JJ, Sanz J, González MJ & Ramos L. (2008). Comprehensive two-dimensional gas chromatography in the screening of persistent organohalogenated pollutants in environmental samples. *Journal of Chromatography A* 1186, 312-324.
- Borglin S, Wilke A, Jepsen R & Lick W. (1996). Parameters affecting the desorption of hydrophobic organic chemicals from suspended sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 2254-2262.
- Bouwman H, Reinecke AJ, Cooppan RM & Becker PJ. (1990). Factors affecting levels of DDT and metabolites in human breast milk from KwaZulu. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 31, 93-115.
- Bouwman H, van den Berg H & Kylin H. (2011). DDT and malaria prevention: Addressing the paradox. *Environmental Health Perspectives* 119, 744-747.

- Bouwman H, Kylin H, Sereda B & Bornman R. (2012). High levels of DDT in breast milk: Intake, risk, lactation duration, and involvement of gender. *Environmental Pollution* 170, 63-70.
- Brack W, Bandow N, Schwab K, Schulze T & Streck G. (2009). Bioavailability in effect-directed analysis of organic toxicants in sediments. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 28, 543-549.
- Branchi I, Capone F, Alleva E & Costa LG. (2003). Polybrominated diphenyl ethers: Neurobehavioral effects following developmental exposure. *NeuroToxicology* 24, 449-462.
- Brandsma SH. 2015 Tracing organophosphorus and brominated flame retardants and plasticizers in an estuarine food web. *Science of the Total Environment* 505 (2015) 22–31
- Brown RH, Nelson J & Mueller-Harvey I. (2004). Simple and surprisingly effective one-step extraction-cleanup by Soxhlet for DDT and its metabolites from environmental samples. *Journal of Chromatography A* 1061, 1-9.
- BSI (2006). Determination of Priority Pollutants in Surface Water Using Passive Sampling. PAS: 61:2006. British Standards Institution, London.
- Bucheli TD & Gustafsson O. (2000). Qualification of the soot-water distribution coefficient of PAHs provides mechanistic basis for enhanced sorption observations. *Environmental Science and Technology* 34, 5144-5151.
- Budakowski W & Tomy G. (2003). Congener-specific analysis of hexabromocyclododecane by high-performance liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17, 1399-1404.
- Burgess RM. (2012). Guidelines for Using Passive Samplers to Monitor Organic Contaminants at Superfund Sediment Sites. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/600/R-11/115.
- Burtke DE, Wolkin A, Stapleton HM & Miranda ML. (2013). Associations between serum levels of polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants and environmental and behavioral factors in pregnant women. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* 23, 176-182.
- Byrne BA & Aylott RI. (1980). Concentrator for Removing Organic Materials from Aqueous Systems. British Patent 1566253.
- Camilleri J, Morin N, Miège C, Coquery M & Cren-Olivé C. (2012). Determination of the uptake and release rates of multifamilies of endocrine disruptor compounds on the polar C18 Chemcatcher. Three potential performance reference compounds to monitor polar pollutants in surface water by integrative sampling. *Journal of Chromatography A* 1237, 37-45.
- Camino-Sánchez FJ, Zafra-Gómez A, Cantarero-Malagón S & Vílchez JL. (2012). Validation of a method for the analysis of 77 priority persistent organic pollutants in river water by stir bar sorptive extraction in compliance with the European Water Framework Directive. *Talanta* 89, 322-334.
- Canales-Aguirre A, Padilla-Camberos E, Gómez-Pinedo U, Salado-Ponce H, Feria-Velasco A & de Celis R. (2011). Genotoxic effect of chronic exposure to DDT on lymphocytes, oral mucosa and breast cells of female rats. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8, 540-553.
- Cao XW, Shen WJ, Zhu J, Zhang J, Jiang Y, Zhao ZY, Wu B, Yu KY, Liu H, Lian HZ & Shen CY. (2013). A Comparative Study of the Ionization Modes in GC-MS Multi-residue Method for the Determination of Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyls in Crayfish. *Food Analytical Methods* 6, 445-456.
- Carere M, Dulio V, Hanke G & Polesello S. (2012). Guidance for sediment and biota monitoring under the Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 36, 15-24.
- Carroll KM, Harkness MR, Bracco AA & Balcarcel RR. (1994). Application of a permeant/polymer diffusional model to the desorption of polychlorinated biphenyls from Hudson River sediments. *Environmental Science & Technology* 28, 253-258.
- Carson, Rachel (2002) [1a. Pub. Houghton Mifflin, 1962]. *Silent Spring*. Mariner Books. ISBN 0-618-24906-0. *Silent Spring* initially appeared serialized in three parts in the June 16, June 23, and June 30, 1962 issues of *The New Yorker* magazine
- Chang F, Pagano JJ, Crimmins BS, Milligan MS, Xia X, Hopke PK & Holsen TM. (2012). Temporal trends of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in Great Lakes fish, 1999-2009. *Science of the Total Environment* 439, 284-290.
- Chang SS, Lee WJ, Wang LC, Chang-Chien GP & Wu CY. (2013). Energy recovery and emissions of PBDD/Fs and PBDEs from Co-combustion of woodchip and wastewater sludge in an industrial boiler. *Environmental Science and Technology* 47, 12600-12606.

- Chen D & Hale RC. (2010). A global review of polybrominated diphenyl ether flame retardant contamination in birds. *Environment International* 36, 800-811.
- Chen D, La Guardia MJ, Luellen DR, Harvey E, Mainor TM & Hale RC. (2011). Do temporal and geographical patterns of HBCD and PBDE flame retardants in U.S. fish reflect evolving industrial usage? *Environmental Science and Technology* 45, 8254-8261.
- Chen Z, Maartens F, Vega H, Kunene S, Gumede J & Krieger RI. (2009). 2,2-bis(4-chlorophenyl)acetic acid (dda), a water-soluble urine biomarker of DDT metabolism in humans. *International Journal of Toxicology* 28, 528-533.
- Chi X, Streicher-Porte M, Wang MYL & Reuter MA. (2011). Informal electronic waste recycling: A sector review with special focus on China. *Waste Management* 31, 731-742.
- Chin YP, Weber Jr WJ & Eadie BJ. (1990). Estimating the effects of dispersed organic polymers on the sorption of contaminants by natural solids. 2. Sorption in the presence of humic and other natural macromolecules. *Environmental Science and Technology* 24, 837-842.
- Chiou CT, Porter PE & Schmedding DW. (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. *Environmental Science and Technology* 17, 227-231.
- Chiou CT, Kile DE, Rutherford DW, Sheng G & Boyd SA. (2000). Sorption of selected organic compounds from water to a peat soil and its humic-acid and humin fractions: Potential sources of the sorption nonlinearity. *Environmental Science and Technology* 34, 1254-1258.
- CHM (2008) Stockholm Convention on persistent organic pollutants (POPs), What are POPs? <http://chm.pops.int/Convention/ThePOPs/tabid/673/language/en-US/Default.aspx>
- Choi M, Kim YJ, Lee IS & Choi HG. (2014). Development of a one-step integrated pressurized liquid extraction and cleanup method for determining polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments. *Journal of Chromatography A* 1340, 8-14.
- Christensen JR, MacDuffee M, MacDonald RW, Whittar M & Ross PS. (2005). Persistent organic pollutants in British Columbia grizzly bears: Consequence of divergent diets. *Environmental Science and Technology* 39, 6952-6960.
- Christiansson A, Eriksson J, Teclechiel D & Bergman Å. (2009). Identification and quantification of products formed via photolysis of decabromodiphenyl ether. *Environmental Science and Pollution Research* 16, 312-321.
- Chuang JC, Van Emon JM & Schrock ME. (2009). High-throughput screening of dioxins in sediment and soil using selective pressurized liquid extraction with immunochemical detection. *Chemosphere* 77, 1217-1223.
- Cielezsky V & Soós K. (1975). Food-hygienic aspects of the organochlorine restriction program in Hungary. *Environmental quality and safety Supplement* 3, 199-202.
- CIESM (2002) Mediterranean Mussel Watch
- Cincinelli A, Martellini T, Misuri L, Lanciotti E, Sweetman A, Laschi S & Palchetti I. (2012). PBDEs in Italian sewage sludge and environmental risk of using sewage sludge for land application. *Environmental Pollution* 161, 229-234.
- Concha-Graña E, Turnes-Carou MI, Muniategui-Lorenzo S, López-Mahía P, Fernández-Fernández E & Prada-Rodríguez D. (2004). Development of pressurized liquid extraction and cleanup procedures for determination of organochlorine pesticides in soils. *Journal of Chromatography A* 1047, 147-155.
- Cornelissen G, Van Noort PCM & Govers HAJ. (1997). Desorption kinetics of chlorobenzenes, polycyclic aromatic hydrocarbons, and polychlorinated biphenyls: Sediment extraction with Tenax® and effects of contact time and solute hydrophobicity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 1351-1357.
- Cornelissen G, Rigterink H, Ferdinandy MMA & Van Noort PCM. (1998). Rapidly desorbing fractions of PAHs in contaminated sediments as a predictor of the extent of bioremediation. *Environmental Science and Technology* 32, 966-970.
- Cornelissen G, Rigterink H, Ten Hulscher DEM, Vrind BA & Van Noort PCM. (2001). A simple tenax® extraction method to determine the availability of sediment-sorbed organic compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 706-711.
- Cornelissen G, Gustafsson Ö, Bucheli TD, Jonker MTO, Koelmans AA & Van Noort PCM. (2005). Extensive sorption of organic compounds to black carbon, coal, and kerogen in sediments and soils: Mechanisms and consequences for distribution, bioaccumulation, and biodegradation. *Environmental Science and Technology* 39, 6881-6895.
- Covaci A, Voorspoels S & de Boer J. (2003). Determination of brominated flame retardants, with emphasis on polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in environmental and human samples - A review. *Environment International* 29, 735-756.

- Covaci A, Voorspoels S, Ramos L, Neels H & Blust R. (2007). Recent developments in the analysis of brominated flame retardants and brominated natural compounds. *Journal of Chromatography A* 1153, 145-171.
- Cristale J & Lacorte S. (2013a). Development and validation of a multiresidue method for the analysis of polybrominated diphenyl ethers, new brominated and organophosphorus flame retardants in sediment, sludge and dust. *Journal of Chromatography A* 1305, 267-275.
- Cristale J, Katsoyiannis A, Chen C, Jones KC & Lacorte S. (2013b). Assessment of flame retardants in river water using a ceramic dosimeter passive sampler. *Environmental Pollution* 172, 163-169.
- Cui X, Hunter W, Yang Y, Chen Y & Gan J. (2010). Bioavailability of sorbed phenanthrene and permethrin in sediments to *Chironomus tentans*. *Aquatic Toxicology* 98, 83-90.
- Cui X, Mayer P & Gan J. (2013). Methods to assess bioavailability of hydrophobic organic contaminants: Principles, operations, and limitations. *Environmental Pollution* 172, 223-234.
- Cuyppers H, Grotenhuis T, Joziassé J & Rulkens W. (2000). Rapid persulfate oxidation predicts PAH bioavailability in soils and sediments. *Environmental Science and Technology* 34, 2057-2063.
- Cuyppers C, Pancras T, Grotenhuis T & Rulkens W. (2002). The estimation of PAH bioavailability in contaminated sediments using hydroxypropyl- β -cyclodextrin and Triton X-100 extraction techniques. *Chemosphere* 46, 1235-1245.
- D'Amato C, Torres JPM & Malm O. (2002). DDT (Dichlorodiphenyltrichloroethane): Toxicity and environmental contamination - A review. *Quimica Nova* 25, 995-1002.
- Darnerud PO, Eriksen GS, Jóhannesson T, Larsen PB & Viluksela M. (2001). Polybrominated diphenyl ethers: Occurrence, dietary exposure, and toxicology. *Environmental Health Perspectives* 109, 49-68.
- Daso AP, Fatoki OS, Odendaal JP & Okonkwo JO. (2010). A review on sources of brominated flame retardants and routes of human exposure with emphasis on polybrominated diphenyl ethers. *Environmental Reviews* 18, 239-254.
- Daughton CG. (2004). Non-regulated water contaminants: Emerging research. *Environmental Impact Assessment Review* 24, 711-732.
- Davison W & Zhang H. (1994). In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. *Nature* 367, 546-548.
- De Boer J, De Boer K & Boon JP. (2000). Polybrominated biphenyls and diphenylethers. En: Paasivirta, J. (Ed.), *The handbook of Environmental Chemistry, vol.3, Part K, New Types of Persistent Halogenated Compounds*. Springer, Berlin, Germany, pp. 62-95 (Chapter 4), 2000.
- De Boer J, Allchin C, Law R, Zegers B & Boon JP. (2001). Method for the analysis of polybrominated diphenylethers in sediments and biota. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 20, 591-599.
- De Boer J, Wester PG, Van Der Horst A & Leonards PEG. (2003). Polybrominated diphenyl ethers in influents, suspended particulate matter, sediments, sewage treatment plant and effluents and biota from the Netherlands. *Environmental Pollution* 122, 63-74.
- De Boer J & Wells DE. (2006). Pitfalls in the analysis of brominated flame retardants in environmental, human and food samples - Including results of three international interlaboratory studies. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 25, 364-372.
- De La Cal A, Eljarrat E, Grotenhuis T & Barceló D. (2008). Tenax[®] extraction as a tool to evaluate the availability of polybrominated diphenyl ethers, DDT, and DDT metabolites in sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1250-1256.
- De Weert J, De La Cal A, Van Den Berg H, Murk A, Langenhoff A, Rijnaarts H & Grotenhuis T. (2008). Bioavailability and biodegradation of nonylphenol in sediment determined with chemical and bioanalysis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 778-785.
- De Wit CA. (2002). An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere* 46, 583-624.
- De Wit CA, Alaei M & Muir DCG. (2006). Levels and trends of brominated flame retardants in the Arctic. *Chemosphere* 64, 209-233.
- Dean JR & Scott WC. (2004). Recent developments in assessing the bioavailability of persistent organic pollutants in the environment. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 23, 609-618.
- Debrauwer L, Riu A, Jouahri M, Rathahao E, Jouanin I, Antignac JP, Cariou R, Le Bizec B & Zalko D. (2005). Probing new approaches using atmospheric pressure photo ionization for the analysis of brominated flame retardants and their related degradation products by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1082, 98-109.

- Di Toro DM, Zarba CS, Hansen DJ, Berry WJ, Swartz RC, Cowan CE, Pavlou SP, Allen HE, Thomas NA & Paquin PR. (1991). Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10, 1541-1583.
- Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT & Gore AC. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Reviews* 30, 293-342.
- Dirtu AC, Ravindra K, Roosens L, van Grieken R, Neels H, Blust R & Covaci A. (2008). Fast analysis of decabrominated diphenyl ether using low-pressure gas chromatography-electron-capture negative ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1186, 295-301.
- Dirtu AC, Covaci A & Abdallah M. (2013). Advances in the sample preparation of brominated flame retardants and other brominated compounds. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 43, 189-203.
- Do L, Lundstedt S & Haglund P. (2013). Optimization of selective pressurized liquid extraction for extraction and in-cell clean-up of PCDD/Fs in soils and sediments. *Chemosphere* 90, 2414-2419.
- Dobbs AJ & Hunt DTE. (1991). *Methods for Assessing Exposure of Human and Non Human Biota*. Edited by R.G. Tar-diffand B. Goldstein 1991. Published by John Wiley & Sons Ltd. *Sampling and Analysis of Water to Assess Exposure*.
- Domingo JL. (2004). Human exposure to polybrominated diphenyl ethers through the diet. *Journal of Chromatography A* 1054, 321-326.
- Domingo JL. (2012). Polybrominated diphenyl ethers in food and human dietary exposure: A review of the recent scientific literature. *Food and Chemical Toxicology* 50, 238-249.
- Doody JPC, B. S. (2001). An evaluation of environmental dredging for remediation of contaminated sediment. Chapter 4 en: *Handbook of complex environmental remediation problems*. Lehr J, Hyman M, Gass TE, Seever W (eds.), McGraw-Hill Professional, New York, NY, USA.
- Dorneles PR, Lailson-Brito J, Dirtu AC, Weijs L, Azevedo AF, Torres JPM, Malm O, Neels H, Blust R, Das K & Covaci A. (2010). Anthropogenic and naturally-produced organobrominated compounds in marine mammals from Brazil. *Environment International* 36, 60-67.
- Draisci R, Marchiafava C, Ferretti E, Palleschi L, Catellani G & Anastasio A. (1998). Evaluation of musk contamination of freshwater fish in Italy by accelerated solvent extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* 814, 187-197.
- Du G, Xiao Y, Yang HR, Wang L, Song YL & Wang YT. (2012). Rapid determination of pesticide residues in herbs using selective pressurized liquid extraction and fast gas chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 35, 1922-1932.
- EEA (2011). *Hazardous Substances in Europe's Fresh and Marine Waters*. European Environment Agency, Copenhagen, 61 pp.
- Eganhouse RP & Pontolillo J. (2008). DDE in sediments of the Palos Verdes shelf, California: In situ transformation rates and geochemical fate. *Environmental Science and Technology* 42, 6392-6398.
- Eggen T & Majcherczyk A. (2006). Effects of zero-valent iron (Fe⁰) and temperature on the transformation of DDT and its metabolites in lake sediment. *Chemosphere* 62, 1116-1125.
- Eggen T, Moeder M & Arukwe A. (2010). Municipal landfill leachates: A significant source for new and emerging pollutants. *Science of the Total Environment* 408, 5147-5157.
- Eguchi A, Nomiya K, Devanathan G, Subramanian A, Bulbule KA, Parthasarathy P, Takahashi S & Tanabe S. (2012). Different profiles of anthropogenic and naturally produced organohalogen compounds in serum from residents living near a coastal area and e-waste recycling workers in India. *Environment International* 47, 8-16.
- Ehlers GAC & Loibner AP. (2006). Linking organic pollutant (bio)availability with geosorbent properties and biometric methodology: A review of geosorbent characterisation and (bio)availability prediction. *Environmental Pollution* 141, 494-512.
- Eljarrat E, Lacorte S & Barcelo D. (2002). Optimization of congener-specific analysis of 40 polybrominated diphenyl ethers by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 37, 76-84.
- Eljarrat E, De la Cal A & Barceló D. (2003). Potential chlorinated and brominated interferences on the polybrominated diphenyl ether determinations by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1008, 181-192.

- Eljarrat E, De La Cal A, Larrazabal D, Fabrellas B, Fernandez-Alba AR, Borrull F, Marce RM & Barcelo D. (2005a). Occurrence of polybrominated diphenylethers, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and biphenyls in coastal sediments from Spain. *Environmental Pollution* 136, 493-501.
- Eljarrat E, De La Cal A, Raldua D, Duran C & Barcelo D. (2005b). Brominated flame retardants in *Alburnus alburnus* from Cinca River Basin (Spain). *Environmental Pollution* 133, 501-508.
- Eljarrat E, Labandeira A, Marsh G, Raldúa D & Barcelo D. (2007). Decabrominated diphenyl ether in river fish and sediment samples collected downstream an industrial park. *Chemosphere* 69, 1278-1286.
- Eriksson J, Green N, Marsh G & Bergman Å. (2004). Photochemical decomposition of 15 polybrominated diphenyl ether congeners in methanol/water. *Environmental Science and Technology* 38, 3119-3125.
- ESF (2011). *Monitoring Chemical Pollution in Europe's Seas – Programmes, Practices and Priorities for Research*, European Science Foundation, Ostend, p. 104.
- EC (2009). WFD-CIS Guidance Document No. 19. *Guidance on Surface Water Chemical Monitoring under The Water Framework Directive*, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 2009, p. 130.
- EC (2010). WFD-CIS Guidance Document No. 25. *Guidance on chemical monitoring of sediment and biota under the Water Framework Directive*, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 2010, p. 74.
- EC (2011). WFD-CIS Guidance Document No. 27. *Technical Guidance For Deriving Environmental Quality Standards*, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 2011, p. 204. Technical Report - 2011 - 055
- European Court of Justice (2008). *Court proceedings on the Directive 2008/C116/02*; 2008. *Official Journal of the European Union* C 116:2-3, 09.5.2008.
- EU (2002). Directive 2011/65/EU of the European Parliament and of the Council of 8 June 2011 on the restriction of the use of certain hazardous substances in electrical and electronic equipment. *Official Journal of the European Union*, L 37, 19-23. 13.2.2003.
- EU (2003). Directive 2003/11/EC of the European Parliament and of the Council of 6 February 2003 amending for the 24th time Council Directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (pentabromodiphenyl ether, octabromodiphenyl ether). *Official Journal of the European Union* L 42/45, 15.2.2003.
- EU (2006). Regulation (EC) No 1907/2006 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, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. *Official Journal of the European Union* L 136/3, 29.5.2007.
- EU (2008). Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union* L 348/84, 24.12.2008.
- Ezzell JL. (1996). Selective extraction of polychlorinated biphenyls from fish tissue using accelerated solvent extraction. *Am Environ Lab* 8(12), 12-13.
- Farré MI, Pérez S, Kantiani L & Barceló D. (2008). Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 27, 991-1007.
- Fava F, Bertin L, Fedi S & Zannoni D. (2003). Methyl- β -cyclodextrin-enhanced solubilization and aerobic biodegradation of polychlorinated biphenyls in two aged-contaminated soils. *Biotechnology and Bioengineering* 81, 381-390.
- Fernández D., Vermeirssen E.L.M., Bandow N., Muñoz K., Schäfer R.B. (2014). Calibration and field application of passive sampling for episodic exposure to polar organic pesticides in streams. *Environmental Pollution* 194:196-202
- Fernández LA, Lao W, Maruya KA, White C & Burgess RM. (2012). Passive sampling to measure baseline dissolved persistent organic pollutant concentrations in the water column of the Palos Verdes shelf superfund site. *Environmental Science and Technology* 46, 11937-11947.
- Focant JF, Sjödin A & Patterson Jr DG. (2004a). Improved separation of the 209 polychlorinated biphenyl congeners using comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1040, 227-238.

- Focant JF, Sjödin A, Turner WI & Patterson Jr DG. (2004b). Measurement of selected polybrominated diphenyl ethers, polybrominated and polychlorinated biphenyls, and organochlorine pesticides in human serum and milk using comprehensive two-dimensional gas chromatography isotope dilution time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 76, 6313-6320.
- Fontana AR, Wuilloud RG, Martínez LD & Altamirano JC. (2009). Simple approach based on ultrasound-assisted emulsification-microextraction for determination of polibrominated flame retardants in water samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216, 147-153.
- Fontana AR, Camargo A, Martínez LD & Altamirano JC. (2011). Dispersive solid-phase extraction as a simplified clean-up technique for biological sample extracts. Determination of polybrominated diphenyl ethers by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218, 2490-2496.
- Fontanals N, Barri T, Bergström S & Jönsson JA. (2006). Determination of polybrominated diphenyl ethers at trace levels in environmental waters using hollow-fiber microporous membrane liquid-liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1133, 41-48.
- Foreman WT & Gates PM. (1997). Matrix-enhanced degradation of p,p'-DDT during gas chromatographic analysis: A consideration. *Environmental Science and Technology* 31, 905-910.
- Fowles JR, Fairbrother A, Baecher-Steppan L & Kerkvliet NI. (1994). Immunologic and endocrine effects of the flame-retardant pentabromodiphenyl ether (DE-71) in C57BL/6J mice. *Toxicology* 86, 49-61.
- Frederiksen M, Thomsen M, Vorkamp K & Knudsen LE. (2009). Patterns and concentration levels of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in placental tissue of women in Denmark. *Chemosphere* 76, 1464-1469.
- Friedman CL, Burgess RM, Perron MM, Cantwell MG, Ho KT & Lohmann R. (2009). Comparing polychaete and polyethylene uptake to assess sediment resuspension effects on PCB bioavailability. *Environmental Science and Technology* 43, 2865-2870.
- Fromberg A, Granby K, Højgård A, Fagt S & Larsen JC. (2011). Estimation of dietary intake of PCB and organochlorine pesticides for children and adults. *Food Chemistry* 125, 1179-1187.
- Fuerhacker M (2009) EU Water Framework Directive and Stockholm Convention: can we reach the targets for priority substances and persistent organic pollutants? *Environ Sci Pollut Res Int. Suppl* 1:S92-7.
- Gago-Ferrero P, Díaz-Cruz MS & Barceló D. (2011). Fast pressurized liquid extraction with in-cell purification and analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of UV filters and their degradation products in sediments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400, 2195-2204.
- Gajski G, MRavlić, SCapuder, ZGaraj-Vrhovac, V. (2012). Presence of Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) in Croatia and Evaluation of Its Genotoxicity. , *Insecticides – Pest Engineering*, Dr. Farzana Perveen (Ed.), ISBN: 978-953-307-895-3, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/insecticides-pest-engineering/presence-of-dichlorodiphenyltrichloroethaneddt-in-croatia-and-evaluation-of-its-genotoxicity>.
- García Pinto C, Herrero Martín S, Pérez Pavón JL & Moreno Cordero B. (2011). A simplified Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe approach for the determination of trihalomethanes and benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in soil matrices by fast gas chromatography with mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta* 689, 129-136.
- Gevao B, Muzaini S & Helaleh M. (2008). Occurrence and concentrations of polybrominated diphenyl ethers in sewage sludge from three wastewater treatment plants in Kuwait. *Chemosphere* 71, 242-247.
- Gfrer M & Lankmayr E. (2005). DDT degradation during enhanced solid-liquid extractions: A consideration. *Journal of Chromatography A* 1072, 117-125.
- Ghosh R, Hageman KJ & Björklund E. (2011). Selective pressurized liquid extraction of three classes of halogenated contaminants in fish. *Journal of Chromatography A* 1218, 7242-7247.
- Glynn A, Lignell S, Darnerud PO, Aune M, Halldin Ankarberg E, Bergdahl IA, Barregård L & Bensryd I. (2011). Regional differences in levels of chlorinated and brominated pollutants in mother's milk from primiparous women in Sweden. *Environment International* 37, 71-79.
- Gobas FAPCZ, X. (1994). Interactions of organic chemicals with particulate dissolved organic matter in the aquatic environment. J.L. Hamlink, P.F. Landrum, H.L. Bergman, W.H. Benson (Eds.), *Bioavailability-Physical, Chemical and Biological Interactions*, Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Special Publication Series, Lewis Publication, Boca Raton, pp. 83-91.
- Goldberg ED. (1975). The mussel watch - A first step in global marine monitoring. *Marine Pollution Bulletin* 6, 111.

- Gómara B, Herrero L & González MJ. (2006). Survey of polybrominated diphenyl ether levels in Spanish commercial foodstuffs. *Environmental Science and Technology* 40, 7541-7547.
- Gómez-Ariza JL, Bujalance M, Giráldez I, Velasco A & Morales E. (2002). Determination of polychlorinated biphenyls in biota samples using simultaneous pressurized liquid extraction and purification. *Journal of Chromatography A* 946, 209-219.
- Gomez-Lahoz C & Ortega-Calvo JJ. (2005). Effect of slow desorption on the kinetics of biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science and Technology* 39, 8776-8783.
- Gonçalves C & Alpendurada MF. (2004). Solid-phase micro-extraction-gas chromatography-(tandem) mass spectrometry as a tool for pesticide residue analysis in water samples at high sensitivity and selectivity with confirmation capabilities. *Journal of Chromatography A* 1026, 239-250.
- González-Gago A, Brandsma SH, Leonards PEG, De Boer J, Marchante-Gayón JM & Garcia Alonso JI. (2011). Determination of ultra-trace levels of priority PBDEs in water samples by isotope dilution GC(ECNI)MS using ⁸¹Br-labelled standards. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 401, 2639-2649.
- Gordon CS & Lowe JT. (1927). USA Patent 1644014.
- Gouin T & Harner T. (2003). Modelling the environmental fate of the polybrominated diphenyl ethers. *Environment International* 29, 717-724.
- Gouin T. (2010). The precautionary principle and environmental persistence: prioritizing the decision-making process. *Environmental Science and Policy* 13, 175-184.
- Grathwohl P. (1990). Influence of organic matter from soils and sediments from various origins on the sorption of some chlorinated aliphatic hydrocarbons: Implications on K(oc) correlations. *Environmental Science and Technology* 24, 1687-1693.
- Grathwohl P. (1999). German Patent DE19830413-A1; Dosimeter.
- Greenberg MS, Burton Jr GA, Landrum PF, Leppänen MT & Kukkonen JVK. (2005). Desorption kinetics of fluoranthene and trifluralin from Lake Huron and Lake Erie, USA, sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 31-39.
- Greenwood R, Mills GA, Vrana B, Allan I, Aguilar-Martínez R & Morrison G. (2007). Chapter 9 Monitoring of priority pollutants in water using chemcatcher passive sampling devices, pp. 199-229.
- Greenwood R, Mills GA & Vrana B. (2009). Potential applications of passive sampling for monitoring non-polar industrial pollutants in the aqueous environment in support of REACH. *Journal of Chromatography A* 1216, 631-639.
- Guerra P, de la Torre A, Martínez MA, Eljarrat E, Barceló D. (2008). Identification and trace level determination of brominated flame retardants by liquid chromatography/quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2008 Apr;22(7):916-24. doi: 10.1002/rcm.3443.
- Guerra P, de la Cal A, Marsh G, Eljarrat E & Barceló D. (2009). Transfer of hexabromocyclododecane from industrial effluents to sediments and biota: Case study in Cinca river (Spain). *Journal of Hydrology* 369, 360-367.
- Guillén D, Ginebreda A, Farré M, Darbra RM, Petrovic M, Gros M & Barceló D. (2012). Prioritization of chemicals in the aquatic environment based on risk assessment: Analytical, modeling and regulatory perspective. *Science of the Total Environment* 440, 236-252.
- Gunold R, Schäfer RB, Paschke A, Schüürmann G & Liess M. (2008). Calibration of the Chemcatcher® passive sampler for monitoring selected polar and semi-polar pesticides in surface water. *Environmental Pollution* 155, 52-60.
- Guzzella L, Roscioli C & Binelli A. (2008). Contamination by polybrominated diphenyl ethers of sediments from the Lake Maggiore basin (Italy and Switzerland). *Chemosphere* 73, 1684-1691.
- Haglund P, Sparring S, Wiberg K & Björklund E. (2007). Shape-selective extraction of PCBs and dioxins from fish and fish oil using in-cell carbon fractionation pressurized liquid extraction. *Analytical Chemistry* 79, 2945-2951.
- Haglund P, Korytár P, Danielsson C, Diaz J, Wiberg K, Leonards P, Brinkman UAT & De Boer J. (2008). GC×GC-ECD: A promising method for the determination of dioxins and dioxin-like PCBs in food and feed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390, 1815-1827.
- Hale RC, La Guardia MJ, Harvey EP, Gaylor MO, Mainor TM & Duff WH. (2001). Persistent pollutants in land-applied sludges. *Nature* 412, 140-141.
- Hale RC, La Guardia MJ, Harvey E & Matt Mainor T. (2002). Potential role of fire retardant-treated polyurethane foam as a source of brominated diphenyl ethers to the US environment. *Chemosphere* 46, 729-735.

- Hale RC, La Guardia MJ, Harvey E, Gaylor MO & Mainor TM. (2006). Brominated flame retardant concentrations and trends in abiotic media. *Chemosphere* 64, 181-186.
- Hale SE, Tomaszewski JE, Luthy RG & Werner D. (2009). Sorption of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and its metabolites by activated carbon in clean water and sediment slurries. *Water Research* 43, 4336-4346.
- Hale RC, La Guardia MJ, Harvey E, Chen D, Mainor TM & Luellen DR. (2012). Polybrominated diphenyl ethers in U.S. sewage sludges and biosolids: Temporal and geographical trends and uptake by corn following land application. *Environmental Science and Technology* 46, 2055-2063.
- Hamers T, Kamstra JH, Sonneveld E, Murk AJ, Kester MHA, Andersson PL, Legler J & Brouwer A. (2006). In vitro profiling of the endocrine-disrupting potency of brominated flame retardants. *Toxicological Sciences* 92, 157-173.
- Hammer GD. (2011). *Adrenocortical carcinoma: Basic science and clinical concepts*. Else T Eds. | 2011 | XV 546p Springer.
- Hanke G, Mariani G, Comero S, Loos R, Bidoglio G, Polesello S, Valsecchi S, Rusconi M, Wollgast J, Castro-Jiménez J, Patrolecco L & Ademollo N. (2012). Chemical-monitoring on-site exercises to harmonize analytical methods for priority substances in the European Union. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 36, 25-35.
- Hardy ML. (2002). The toxicology of the three commercial polybrominated diphenyl oxide (ether) flame retardants. *Chemosphere* 46, 757-777.
- Harley KG, Marks AR, Chevrier J, Bradman A, Sjödin A & Eskenazi B. (2010). PBDE concentrations in women's serum and fecundability. *Environmental Health Perspectives* 118, 699-704.
- Harmsen J. (2007). Measuring bioavailability: From a scientific approach to standard methods. *Journal of Environmental Quality* 36, 1420-1428.
- Harwood AD, Landrum PF & Lydy MJ. (2012). Can SPME fiber and tenax methods predict the bioavailability of biotransformed insecticides? *Environmental Science and Technology* 46, 2413-2419.
- Hassanin A, Breivik K, Meijer SN, Steinnes E, Thomas GO & Jones KC. (2004). PBDEs in European Background Soils: Levels and Factors Controlling Their Distribution. *Environmental Science and Technology* 38, 738-745.
- Haug LS, Thomsen C, Liane VH & Becher G. (2008). Comparison of GC and LC determinations of hexabromocyclododecane in biological samples - Results from two interlaboratory comparison studies. *Chemosphere* 71, 1087-1092.
- Hawthorne SB, Poppendieck DG, Grabanski CB & Loehr RC. (2002). Comparing PAH availability from manufactured gas plant soils and sediments with chemical and biological tests. 1. PAH release during water desorption and supercritical carbon dioxide extraction. *Environmental Science and Technology* 36, 4795-4803.
- Hayward SJ, Lei YD, Wania F. 2006. Comparative evaluation of three high-performance liquid chromatography-based Kow estimation methods for highly hydrophobic organic compounds: polybrominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecane. *Environ Toxicol Chem* 25:2018-2027. Huang et al., 1997) langmuir desorcion
- Hela DG & Papadopoulos VD. (2013). Estimating uncertainty in matrix solid phase extraction methodology for the determination of chlorinated compounds in fish. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 93, 1676-1697.
- Heltsley RM, Cope WG, Shea D, Bringolf RB, Kwak TJ & Malindzak EG. (2005). Assessing organic contaminants in fish: Comparison of a nonlethal tissue sampling technique to mobile and stationary passive sampling devices. *Environmental Science and Technology* 39, 7601-7608.
- Henny CJ, Grove RA, Kaiser JL, Johnson BL, Furl CV & Letcher RJ. (2011). Wastewater dilution index partially explains observed polybrominated diphenyl ether flame retardant concentrations in osprey eggs from Columbia River Basin, 2008-2009. *Ecotoxicology* 20, 682-697.
- Henry M, Béguin M, Requier F, Rollin O, Odoux JF, Aupinel P, Aptel J, Tchamitchian S & Decourtye A. (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336, 348-350.
- Heringa MB & Hermens JLM. (2003). Measurement of free concentrations using negligible depletion-solid phase microextraction (nd-SPME). *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 22, 575-587.
- Hermans JH, Smedes F, Hofstraat JW & Coffno WP. (1992). A method for estimation of chlorinated biphenyls in surface waters: Influence of sampling method on analytical results. *Environmental Science Technology* 26, 2028-2035.
- Hickman ZA & Reid BJ. (2005). Towards a more appropriate water based extraction for the assessment of organic contaminant availability. *Environmental Pollution* 138, 299-306.
- Hilber I, Bucheli TD, Wyss GS & Schulin R. (2009). Assessing the phytoavailability of dieldrin residues in charcoal-amended soil using tenax extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 4293-4298.

- Hinck JE, Norstrom RJ, Orazio CE, Schmitt CJ & Tillitt DE. (2009). Persistence of organochlorine chemical residues in fish from the Tombigbee River (Alabama, USA): Continuing risk to wildlife from a former DDT manufacturing facility. *Environmental Pollution* 157, 582-591.
- Hites RA. (2008). Electron impact and electron capture negative ionization mass spectra of polybrominated diphenyl ethers and methoxylated polybrominated diphenyl ethers. *Environmental Science and Technology* 42, 2243-2252.
- Hubert A, Wenzel KD, Manz M, Weissflog L, Engewald W & Schüürmann G. (2000). High extraction efficiency for POPs in real contaminated soil samples using accelerated solvent extraction. *Analytical Chemistry* 72, 1294-1300.
- Huckins JN, Tubergen MW & Manuweera GK. (1990). Semipermeable membrane devices containing model lipid: A new approach to monitoring the bioavailability of lipophilic contaminants and estimating their bioconcentration potential. *Chemosphere* 20, 533-552.
- Huckins JN, Petty JD, Lebo JA, Almeida FV, Booij K, Alvarez DA, Cranor WL, Clark RC & Mogensen BB. (2002). Development of the permeability/performance reference compound approach for in situ calibration of semipermeable membrane devices. *Environmental Science and Technology* 36, 85-91.
- Huckins JN, Petty JD & Booij K. (2006). Monitors of organic chemicals in the environment: Semipermeable membrane devices.
- Humphries MS. (2013). DDT residue contamination in sediments from Lake Sibaya in northern KwaZulu-Natal, South Africa: Implications for conservation in a World Heritage Site. *Chemosphere* 93, 1494-1499.
- Hunziker R, Gonsior S, MacGregor J, Desjardins D, Ariano J, Friederich U. Fate and effect of hexabromocyclododecane in the environment. *Organohalogen Compd.* 2004;66:2300–2305. Kebede et al. 2011). Gc 209 considera el inconveniente más significativo en el caso de análisis de congéneres altamente bromados
- Hussen A, Westbom R, Megersa N, Mathiasson L & Björklund E. (2007). Selective pressurized liquid extraction for multi-residue analysis of organochlorine pesticides in soil. *Journal of Chromatography A* 1152, 247-253.
- Hwang IK, Kang HH, Lee IS & Oh JE. (2012). Assessment of characteristic distribution of PCDD/Fs and BFRs in sludge generated at municipal and industrial wastewater treatment plants. *Chemosphere* 88, 888-894.
- Hyötyläinen T. (2009). Critical evaluation of sample pretreatment techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394, 743-758.
- IAGA (2008). ANUNCIO del Instituto Aragonés de Gestión Ambiental por el que se publica la modificación de la resolución de 27 de marzo de 2008 del Instituto Aragonés de Gestión Ambiental, por la que se otorga la autorización ambiental integrada de una fábrica de productos químicos existente en Monzón (Huesca), promovido por Montecinca, S.A. (Expte.: INAGA/500301/02.2006/9363).
- IARC (2011). Agents reviewed by the IARC monographs, Volumes 1-101, IARC, Lyon, France.
- Ilyas M, Sudaryanto A, Setiawan IE, Riyadi AS, Isobe T, Ogawa S, Takahashi S & Tanabe S. (2011). Characterization of polychlorinated biphenyls and brominated flame retardants in surface soils from Surabaya, Indonesia. *Chemosphere* 83, 783-791.
- Ingersoll CG. (1995). 1995 | Sediment tests. Chapter 8 en: *Aquatic Toxicology* (2nd ed.), Rand GM (ed.), Taylor & Francis, Bristol, PA, USA, pp. 231-255.
- IRDC (1977). Octabromodiphenyl ether. Thirteen week feeding study in rats. International Research and Development Corporation. Submitted to the U.S. Environmental Protection Agency under TSCA Section 8D. OTS0522297 Flame retardant polyolefine mixtures United Kingdom Patent 874006-A Huels Chemische Werke, August 2, 1961: GB874006-A Wettenrauer-2012-toxicity
- ISO (2008). Soil quality - Requirements and guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability of contaminants in soil and soil materials, International Organization for Standardization, ISO 17402, ISO, 2008.
- ISO (2011). Water quality - Sampling - Part 23: Guidance on passive sampling in surface waters. International Organization for Standardization, Geneva, ISO 5667-23:2011(E).
- Isosaari P, Lundebye AK, Ritchie G, Lie Ø, Kiviranta H & Vartiainen T. (2005). Dietary accumulation efficiencies and biotransformation of polybrominated diphenyl ethers in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Food Additives and Contaminants* 22, 829-837.
- Iwate H, Tanabe S, Sakai N & Tatsukawa R. (1993). Distribution of persistent organochlorines in the oceanic air and surface seawater and the role of ocean on their global transport and fate. *Environmental Science & Technology* 27, 1080-1098.

- Jacob J. (2013). A Review of the Accumulation and Distribution of Persistent Organic Pollutants in the Environment. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, Vol. 3, No. 6, November 2013.
- Jacquet R, Miège C, Smedes F, Tixier C, Tronczynski J, Togola A, Berho C, Valor I, Llorca J, Barillon B, Marchand P & Coquery M. (2014). Comparison of five integrative samplers in laboratory for the monitoring of indicator and dioxin-like polychlorinated biphenyls in water. *Chemosphere* 98, 18-27.
- Janák K, Covaci A, Voorspoels S & Becher G. (2005). Hexabromocyclododecane in marine species from the Western Scheldt Estuary: Diastereoisomer- and enantiomer-specific accumulation. *Environmental Science and Technology* 39, 1987-1994.
- Jandacek RJ & Tso P. (2001). Factors affecting the storage and excretion of toxic lipophilic xenobiotics. *Lipids* 36, 1289-1305.
- Jantunen APK, Tuikka A, Akkanen J & Kukkonen JVK. (2008). Bioaccumulation of atrazine and chlorpyrifos to *Lumbricus variegatus* from lake sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 860-868.
- Jiang R & Pawliszyn J. (2012). Thin-film microextraction offers another geometry for solid-phase microextraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 39, 245-253.
- Johnson-Restrepo B & Kannan K. (2009). An assessment of sources and pathways of human exposure to polybrominated diphenyl ethers in the United States. *Chemosphere* 76, 542-548.
- Jonker MTO & Koelmans AA. (2001). Polyoxymethylene solid phase extraction as a partitioning method for hydrophobic organic chemicals in sediment and soot. *Environmental Science and Technology* 35, 3742-3748.
- Jonker MTO & Koelmans AA. (2002). Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls to soot and soot-like materials in the aqueous environment: Mechanistic considerations. *Environmental Science and Technology* 36, 3725-3734.
- Josefsson S, Leonardsson K, Gunnarsson JS & Wiberg K. (2010). Bioturbation-driven release of buried PCBs and PBDEs from different depths in contaminated sediments. *Environmental Science and Technology* 44, 7456-7464.
- Kan AT, Gongmin F & Tomson MB. (1994). Adsorption/desorption hysteresis in organic pollutant and soil/sediment interaction. *Environmental Science & Technology* 28, 859-867.
- Kang JH, Choi SD, Park H, Baek SY, Hong S & Chang YS. (2009). Atmospheric deposition of persistent organic pollutants to the East Rongbuk Glacier in the Himalayas. *Science of the Total Environment* 408, 57-63.
- Kang YS, Yamamuro M, Masunaga S & Nakanishi J. (2002). Specific biomagnification of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in tufted ducks (*Aythya fuligula*), common cormorants (*Phalacrocorax carbo*) and their prey from Lake Shinji, Japan. *Chemosphere* 46, 1373-1382.
- Kania-Korwel I, Zhao H, Norstrom K, Li X, Hornbuckle KC & Lehmler HJ. (2008). Simultaneous extraction and clean-up of polychlorinated biphenyls and their metabolites from small tissue samples using pressurized liquid extraction. *Journal of Chromatography A* 1214, 37-46.
- Karapanagioti HK, Kleinedam S, Sabatini DA, Grathwohl P & Ligouis B. (2000). Impacts of heterogeneous organic matter on phenanthrene sorption: Equilibrium and kinetic studies with aquifer material. *Environmental Science and Technology* 34, 406-414.
- Karickhoff SW, Brown DS & Scott TA. (1979). Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Water Research* 13, 241-248.
- Karickhoff SW & Morris KR. (1985). Sorption dynamics of hydrophobic pollutants in sediment suspensions. *Environmental Toxicology and Chemistry* 4, 469-479.
- Karlsson H, Muir DCG, Teixeira CF, Burniston DA, Strachan WMJ, Hecky RE, Mwita J, Bootsma HA, Grift NP, Kidd KA & Rosenberg B. (2000). Persistent chlorinated pesticides in air, water, and precipitation from the Lake Malawi area, Southern Africa. *Environmental Science and Technology* 34, 4490-4495.
- Kaserzon S.L., Hawker D.W., Kennedy K., Bartkow M., Carter S., Booij K., Mueller J.F. (2014). 'Characterisation and comparison of the uptake of ionizable and polar pesticides, pharmaceuticals and personal care products by POCIS and Chemcatchers'. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 16:2517-2526.
- Katsoyiannis A & Samara C. (2007). The fate of Dissolved Organic Carbon (DOC) in the wastewater treatment process and its importance in the removal of wastewater contaminants. *Environmental Science and Pollution Research* 14, 284-292.

- Kazda R, Hajšlová J, Poustka J & Čajka T. (2004). Determination of polybrominated diphenyl ethers in human milk samples in the Czech Republic: Comparative study of negative chemical ionisation mass spectrometry and time-of-flight high-resolution mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 520, 237-243.
- Kelce WR, Stone CR, Laws SC, Gray LE, Kempainen JA & Wilson EM. (1995). Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature* 375, 581-585.
- Kierkegaard A, Balk L, Tjärnlund U, De Wit CA & Jansson B. (1999). Dietary uptake and biological effects of decabromodiphenyl ether in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Science and Technology* 33, 1612-1617.
- Kim UJ, Lee IS, Kim HS & Oh JE. (2011). Monitoring of PBDEs concentration in umbilical cord blood and breast milk from Korean population and estimating the effects of various parameters on accumulation in humans. *Chemosphere* 85, 487-493.
- Kingston JK, Greenwood R, Mills GA, Morrison GM & Persson LB. (2000). Development of a novel passive sampling system for the time-averaged measurement of a range of organic pollutants in aquatic environments. *Journal of Environmental Monitoring* 2, 487-495.
- Knezovich JP, Harrison FL & Wilhelm RG. (1987). The bioavailability of sediment-sorbed organic chemicals: A review. *Water, Air, and Soil Pollution* 32, 233-245.
- Koistinen J, Kiviranta H, Ruokojärvi P, Parmanne R, Verta M, Hallikainen A & Vartiainen T. (2008). Organohalogen pollutants in herring from the northern Baltic Sea: Concentrations, congener profiles and explanatory factors. *Environmental Pollution* 154, 172-183.
- Kolic TM, Shen L, MacPherson K, Fayez L, Gobran T, Helm PA, Marvin CH, Arsenaault G & Reiner EJ. (2009). The analysis of halogenated flame retardants by GC-HRMS in environmental samples. *Journal of Chromatographic Science* 47, 83-91.
- Korytár P, Covaci A, De Boer J, Gelbin A & Brinkman UAT. (2005a). Retention-time database of 126 polybrominated diphenyl ether congeners and two Bromkal technical mixtures on seven capillary gas chromatographic columns. *Journal of Chromatography A* 1065, 239-249.
- Korytár P, Covaci A, Leonards PEG, De Boer J & Brinkman UAT. (2005b). Comprehensive two-dimensional gas chromatography of polybrominated diphenyl ethers. *Journal of Chromatography A* 1100, 200-207.
- Korytár P, Haglund P, De Boer J & Brinkman UAT. (2006). Comprehensive two-dimensional gas chromatography for the analysis of organohalogenated micro-contaminants. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 25, 373-396.
- Kraaij R, Ciarelli S, Tolls J, Kater BJ & Belfroid A. (2001). Bioavailability of lab-contaminated and native polycyclic aromatic hydrocarbons to the amphipod *Corophium volutator* relates to chemical desorption. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 1716-1724.
- Kraaij R, Seinen W, Tolls J, Cornelissen G & Belfroid AC. (2002a). Direct evidence of sequestration in sediments affecting the bioavailability of hydrophobic organic chemicals to benthic deposit-feeders. *Environmental Science and Technology* 36, 3525-3529.
- Kraaij RH, Tolls J, Sijm D, Cornelissen G, Heikens A & Belfroid A. (2002b). Effects of contact time on the sequestration and bioavailability of different classes of hydrophobic organic chemicals to benthic oligochaetes (tubificidae). *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 752-759.
- Kreisselmeier A & Dürbeck HW. (1997). Determination of alkylphenols, alkylphenoxyethoxylates and linear alkylbenzenesulfonates in sediments by accelerated solvent extraction and supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A* 775, 187-196.
- Kronholm J, Hartonen K & Riekkola ML. (2007). Analytical extractions with water at elevated temperatures and pressures. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 26, 396-412.
- Kukkonen JVK, Landrum PF, Mitra S, Gossiaux DC, Gunnarsson J & Weston D. (2003). Sediment characteristics affecting desorption kinetics of select PAH and PCB congeners for seven laboratory spiked sediments. *Environmental Science and Technology* 37, 4656-4663.
- Kukkonen JVK, Landrum PF, Mitra S, Gossiaux DC, Gunnarsson J & Weston D. (2004). The role of desorption for describing the bioavailability of select polycyclic aromatic hydrocarbon and polychlorinated biphenyl congeners for seven laboratory-spiked sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1842-1851.
- Kupper T, de Alencastro LF, Gatsigazi R, Furrer R, Grandjean D & Tarradellas J. (2008). Concentrations and specific loads of brominated flame retardants in sewage sludge. *Chemosphere* 71, 1173-1180.
- Kuriyama SN, Talsness CE, Grote K & Chahoud I. (2005). Developmental exposure to low-dose PBDE-99: Effects on male fertility and neurobehavior in rat offspring. *Environmental Health Perspectives* 113, 149-154.

- Kuster M, De La Cal A, Eljarrat E, López De Alda MJ & Barceló D. (2010). Evaluation of two aquatic passive sampling configurations for their suitability in the analysis of estrogens in water. *Talanta* 83, 493-499.
- La Guardia MJ, Hale RC, Harvey E, Mainor TM & Ciparis S. (2012). In situ accumulation of HBCD, PBDEs, and several alternative flame-retardants in the bivalve (*Corbicula fluminea*) and Gastropod (*Elimia proxima*). *Environmental Science and Technology* 46, 5798-5805.
- Labadie P, Alliot F, Bourges C, Desportes A & Chevreuil M. (2010a). Determination of polybrominated diphenyl ethers in fish tissues by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry: Case study on European eel (*Anguilla anguilla*) from Mediterranean coastal lagoons. *Analytica Chimica Acta* 675, 97-105.
- Labadie P, Tlili K, Alliot F, Bourges C, Desportes A & Chevreuil M. (2010b). Development of analytical procedures for trace-level determination of polybrominated diphenyl ethers and tetrabromobisphenol A in river water and sediment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396, 865-875.
- Lacorte S & Guillamon M. (2008). Validation of a pressurized solvent extraction and GC-NCI-MS method for the low level determination of 40 polybrominated diphenyl ethers in mothers' milk. *Chemosphere* 73, 70-75.
- Lagalante AF & Oswald TD. (2008). Analysis of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) by liquid chromatography with negative-ion atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometry (LC/NI-APPI/MS/MS): Application to house dust. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391, 2249-2256.
- Lamoureux EM & Brownawell BJ. (2004). Influence of soot on hydrophobic organic contaminant desorption and assimilation efficiency. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 2571-2577.
- Landrum PF, Robinson SD, Gossiaux DC, You J, Lydy MJ, Mitra S & Ten Hulscher TEM. (2007). Predicting bioavailability of sediment-associated organic contaminants for *Diporeia* spp. and oligochaetes. *Environmental Science and Technology* 41, 6442-6447.
- Lanno R, Wells J, Conder J, Bradham K & Basta N. (2004). The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57, 39-47.
- Latawiec AE, Swindell AL & Reid BJ. (2008). Environmentally friendly assessment of organic compound bioaccessibility using sub-critical water. *Environmental Pollution* 156, 467-473.
- Lavin KS & Hageman KJ. (2012). Selective pressurised liquid extraction of halogenated pesticides and polychlorinated biphenyls from pine needles. *Journal of Chromatography A* 1258, 30-36.
- Law K, Halldorson T, Danell R, Stern G, Gewurtz S, Alae M, Marvin C, Whittle M & Tomy G. (2006a). Bioaccumulation and trophic transfer of some brominated flame retardants in a Lake Winnipeg (Canada) food web. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 2177-2186.
- Law K, Palace VP, Halldorson T, Danell R, Wautier K, Evans B, Alae M, Marvin C & Tomy GT. (2006b). Dietary accumulation of hexabromocyclododecane diastereoisomers in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) I: Bioaccumulation parameters and evidence of bioisomerization. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 1757-1761.
- Lei L, Suidan MT, Khodadoust AP & Tabak HH. (2004). Assessing the Bioavailability of PAHs in Field-Contaminated Sediment Using XAD-2 Assisted Desorption. *Environmental Science and Technology* 38, 1786-1793.
- Leonard AW, Hyne RV & Pablo F. (2002). Trimethylpentane-containing passive samplers for predicting time-integrated concentrations of pesticides in water: Laboratory and field studies. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 2591-2599.
- Lepom P, Brown B, Hanke G, Loos R, Quevauviller P & Wollgast J. (2009). Needs for reliable analytical methods for monitoring chemical pollutants in surface water under the European Water Framework Directive. *Journal of Chromatography A* 1216, 302-315.
- Leppänen MT, Landrum PF, Kukkonen JVK, Greenberg MS, Burton Jr GA, Robinson SD & Gossiaux DC. (2003). Investigating the role of desorption on the bioavailability of sediment-associated 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl in benthic invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 2861-2871.
- Leppänen MT & Kukkonen JVK. (2006). Evaluating the role of desorption in bioavailability of sediment-associated contaminants using oligochaetes, semipermeable membrane devices and Tenax extraction. *Environmental Pollution* 140, 150-163.
- Leslie HA, Ter Laak TL, Busser FJM, Kraak MHS & Hermens JLM. (2002). Bioconcentration of organic chemicals: Is a solid-phase microextraction fiber a good surrogate for biota? *Environmental Science and Technology* 36, 5399-5404.

- Leung AOW, Luksemburg WJ, Wong AS & Wong MH. (2007). Spatial distribution of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in soil and combusted residue at Guiyu, an electronic waste recycling site in southeast China. *Environmental Science and Technology* 41, 2730-2737.
- Li A, Rockne KJ, Sturchio N, Song W, Ford JC, Buckley DR & Mills WJ. (2006). Polybrominated diphenyl ethers in the sediments of the Great Lakes. 4. Influencing factors, trends, and implications. *Environmental Science and Technology* 40, 7528-7534.
- Li K, Bélanger JMR, Llompart MP, Turpin RD, Singhvi R & Paré JRJ. (1997). Evaluation of rapid solid sample extraction using the Microwave-Assisted Process (MAP™) under closed-vessel conditions. *Spectroscopy* 13, 1-13.
- Li X, Huang J, Zhang W, Yu G, Deng S & Wang S. (2011). Determination of 41 polybrominated diphenyl ethers in soil using a pressurised solvent extraction and GC-NCI-MS method. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 91, 1135-1150.
- Li Y, Wei G & Wang X. (2007). Determination of decabromodiphenyl ether in water samples by single-drop microextraction and RP-HPLC. *Journal of Separation Science* 30, 2698-2702.
- Liang X, Zhu S, Chen P, Zhu L. (2010). Bioaccumulation and bioavailability of polybrominated diphenyl ethers [corrected] (PBDEs) in soil. *Environ Pollut* 158(7):2387-2392.
- Liguori L, Bjørsvik HR. (2012). Extraction, isolation, and purification of analytes from samples of marine origin--a multivariate task. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 910:46-53.
- Lin T, Hu Z, Zhang G, Li X, Xu W, Tang J & Li J. (2009). Levels and mass burden of DDTs in sediments from fishing harbors: The importance of DDT-containing antifouling paint to the coastal environment of China. *Environmental Science and Technology* 43, 8033-8038.
- Lind Y, Darnerud PO, Atuma S, Aune M, Becker W, Bjerselius R, Cnattingius S & Glynn A. (2003). Polybrominated diphenyl ethers in breast milk from Uppsala County, Sweden. *Environmental Research* 93, 186-194.
- Litten S, Mead B & Hassett J. (1993). Application of passive samplers (PISCES) to locating a source of PCBs on the Black River, New York. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12, 639-647.
- Liu YP, Li JG, Zhao YF, Wu YN & Zhu LY. (2009). Rapid determination of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in fish using selective pressurized liquid extraction (SPLE) combined with automated online gel permeation chromatography-gas chromatography mass spectrometry (GPC-GC/MS). *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 26, 1180-1184.
- Liu YP, Li JG, Zhao YF, Zhang L, Zhou R, Wu YN & Zhu LY. (2010). Fast analysis of polybrominated diphenyl ethers in eggs using selective pressurized liquid extraction coupled with online GPC-GC/MS. *Journal of AOAC International* 93, 1308-1312.
- Liu M, Tian S, Chen P & Zhu L. (2011a). Predicting the bioavailability of sediment-associated polybrominated diphenyl ethers using a 45-d sequential Tenax extraction. *Chemosphere* 85, 424-431.
- Liu YP, Li JG, Zhao YF, Wen S, Huang FF & Wu YN. (2011b). Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and indicator polychlorinated biphenyls (PCBs) in marine fish from four areas of China. *Chemosphere* 83, 168-174.
- Llompart M, Lores M, Lourido M, Sánchez-Prado L & Cela R. (2003). On-fiber photodegradation after solid-phase microextraction of p,p'-DDT and two of its major photoproducts, p,p'-DDE and p,p'-DDD. *Journal of Chromatography A* 985, 175-183.
- Llorca J, Gutiérrez C, Capilla E, Tortajada R, Sanjuán L, Fuentes A & Valor I. (2009). Constantly stirred sorbent and continuous flow integrative sampler. New integrative samplers for the time weighted average water monitoring. *Journal of Chromatography A* 1216, 5783-5792.
- Llorca M, Farré M, Picó Y & Barceló D. (2011). Analysis of perfluorinated compounds in sewage sludge by pressurized solvent extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218, 4840-4846.
- Llorca-Porcel J, Martínez-Sánchez G, Álvarez B, Cobollo MA & Valor I. (2006). Analysis of nine polybrominated diphenyl ethers in water samples by means of stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 569, 113-118.
- Lobpreis T, Vrana B, Dominiak E, Dercová K, Mills GA & Greenwood R. (2008). Effect of housing geometry on the performance of Chemcatcher™ passive sampler for the monitoring of hydrophobic organic pollutants in water. *Environmental Pollution* 153, 706-710.
- Loganathan BG & Kannan K. (1994). Global organochlorine contamination trends: an overview. *Ambio* 23, 187-191.

- Lohmann R, Booij K, Smedes F & Vrana B. (2012). Use of passive sampling devices for monitoring and compliance checking of POP concentrations in water. *Environmental Science and Pollution Research* 19, 1885-1895.
- Longnecker MP, Klebanoff MA, Zhou H & Brock JW. (2001). Association between maternal serum concentration of the DDT metabolite DDE and preterm and small-for-gestational-age babies at birth. *Lancet* 358, 110-114.
- Losada S, Santos FJ & Galceran MT. (2009). Selective pressurized liquid extraction of polybrominated diphenyl ethers in fish. *Talanta* 80, 839-845.
- Losada S, Parera J, Abalos M, Abad E, Santos FJ & Galceran MT. (2010a). Suitability of selective pressurized liquid extraction combined with gas chromatography-ion-trap tandem mass spectrometry for the analysis of polybrominated diphenyl ethers. *Analytica Chimica Acta* 678, 73-81.
- Losada S, Santos FJ, Covaci A & Galceran MT. (2010b). Gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry method for the analysis of methoxylated polybrominated diphenyl ethers in fish. *Journal of Chromatography A* 1217, 5253-5260.
- Luellen DR & Shea D. (2002). Calibration and field verification of semipermeable membrane devices for measuring polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Environmental Science and Technology* 36, 1791-1797.
- Lundstedt S, Haglund P & Öberg L. (2006). Simultaneous extraction and fractionation of polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxygenated derivatives in soil using selective pressurized liquid extraction. *Analytical Chemistry* 78, 2993-3000.
- Luque-García JL & Luque De Castro MD. (2003). Comparison of the static, dynamic and static-dynamic pressurised liquid extraction modes for the removal of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons from soil with on-line filtration-preconcentration. *Journal of Chromatography A* 1010, 129-140.
- Lüthje K, Hyötyläinen T & Riekkola ML. (2004). Comparison of different trapping methods for pressurised hot water extraction. *Journal of Chromatography A* 1025, 41-49.
- Luthy, R. D.; Aiken, G. R.; Brusseau, M. L.; Cunningham, D. S.; Gschwend, P. M.; Pignatello, J. J.; Reinhard, M.; Traina, S. J.; Weber, W. J., Jr.; Westall, J. C. Sequestration of Hydrophobic Organic Contaminants by Geosorbents. *Environ. Sci. Technol.* 1997, 31, 3341.
- Lydy MJ, Landrum PF, Oen AM, Allinson M, Smedes F, Harwood AD, Li H, Maruya KA & Liu J. (2014). Passive sampling methods for contaminated sediments: state of the science for organic contaminants. *Integrated environmental assessment and management* 10, 167-178.
- Lydy MJ, Harwood AD, Nutile SA & Landrum PF. (2015). Tenax extraction of sediments to estimate desorption and bioavailability of hydrophobic contaminants: A literature review. *Integrated Environmental Assessment and Management* 11, 208-220.
- Ma Q, Wang C, Bai H, Xi HW, Xi GC, Ren XM, Yang Y & Guo LH. (2011). Comprehensive two-dimensional separation of hydroxylated polybrominated diphenyl ethers by ultra-performance liquid chromatography coupled with ion mobility-mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 22, 1851-1861.
- Ma WL, Yun S, Bell EM, Druschel CM, Caggana M, Aldous KM, Buck Louis GM & Kannan K. (2013). Temporal trends of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in the blood of newborns from New York State during 1997 through 2011: Analysis of dried blood spots from the newborn screening program. *Environmental Science and Technology* 47, 8015-8021.
- Macgregor K, Oliver IW, Harris L & Ridgway IM. (2010). Persistent organic pollutants (PCB, DDT, HCH, HCB & BDE) in eels (*Anguilla anguilla*) in Scotland: Current levels and temporal trends. *Environmental Pollution* 158, 2402-2411.
- Mackintosh SA, Pérez-Fuentetaja A, Zimmerman LR, Pacepavicius G, Clapsadl M, Alae M & Aga DS. (2012). Analytical performance of a triple quadrupole mass spectrometer compared to a high resolution mass spectrometer for the analysis of polybrominated diphenyl ethers in fish. *Analytica Chimica Acta* 747, 67-75.
- MAGRAMA (2008). Nota de prensa del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Se prohíbe la producción de Dicofol en el último centro industrial que lo usaba en España. http://www.magrama.gob.es/imagenes/es/nota_dicofol_abr08_tcm7-53757.pdf.
- Mai B, Chen S, Luo X, Chen L, Yang Q, Sheng G, Peng P, Fu J & Zeng EY. (2005). Distribution of polybrominated diphenyl ethers in sediments of the Pearl River Delta and adjacent South China Sea. *Environmental Science and Technology* 39, 3521-3527.
- Malavia J, Santos FJ & Galceran MT. (2011). Simultaneous pressurized liquid extraction and clean-up for the analysis of polybrominated biphenyls by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 84, 1155-1162.

- Marsh G, Athanasiadou M, Bergman Å & Asplund L. (2004). Identification of Hydroxylated and Methoxylated Polybrominated Diphenyl Ethers in Baltic Sea Salmon (*Salmo salar*) Blood. *Environmental Science and Technology* 38, 10-18.
- Martínez MP, Carrillo JD & Tena MT. (2010). Determination of brominated diphenyl ethers (from mono- to hexa-congeners) in indoor dust by pressurised liquid extraction with in-cell clean-up and gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397, 257-267.
- Martínez-Moral MP & Tena MT. (2011). Focused ultrasound solid-liquid extraction and selective pressurised liquid extraction to determine bisphenol A and alkylphenols in sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 34, 2513-2522.
- Martos PA & Pawliszyn J. (1999). Time-weighted average sampling with solid-phase microextraction device: Implications for enhanced personal exposure monitoring to airborne pollutants. *Analytical Chemistry* 71, 1513-1520.
- Mascolo G, Locaputo V & Mininni G. (2010). New perspective on the determination of flame retardants in sewage sludge by using ultrahigh pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry with different ion sources. *Journal of Chromatography A* 1217, 4601-4611.
- Matamoros V, Jover E & Bayona JM. (2010). Part-per-Trillion determination of pharmaceuticals, pesticides, and related organic contaminants in river water by solid-phase extraction followed by comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 82, 699-706.
- Mayer P, Vaes WHJ, Wijnker F, Legierse KCHM, Kraaij R, Tolls J & Hermens JLM. (2000). Sensing dissolved sediment porewater concentrations of persistent and bioaccumulative pollutants using disposable solid-phase microextraction fibers. *Environmental Science and Technology* 34, 5177-5183.
- McDonald TA. (2005). Polybrominated diphenylether levels among United States residents: daily intake and risk of harm to the developing brain and reproductive organs. *Integrated environmental assessment and management* 1, 343-354.
- McGlynn KA, Quraishi SM, Graubard BI, Weber JP, Rubertone MV & Erickson RL. (2008). Persistent organochlorine pesticides and risk of testicular germ cell tumors. *Journal of the National Cancer Institute* 100, 663-671.
- McKinney MA, Stirling I, Lunn NJ, Peacock E & Letcher RJ. (2010). The role of diet on long-term concentration and pattern trends of brominated and chlorinated contaminants in western Hudson Bay polar bears, 1991-2007. *Science of the Total Environment* 408, 6210-6222.
- McLaughlin M, J. & Lanno R. (2014). Use of "Bioavailability" as a term in Ecotoxicology. *Integrated Environmental Assessment and Management* 10.
- Meadows JC, Echols KR, Huckins JN, Borsuk FA, Carline RF & Tillitt DE. (1998). Estimation of uptake rate constants for PCB congeners accumulated by semipermeable membrane devices and brown trout (*Salmo trutta*). *Environmental Science and Technology* 32, 1847-1852.
- Mechlińska A, Wolska L & Namieśnik J. (2010). Isotope-labeled substances in analysis of persistent organic pollutants in environmental samples. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 29, 820-831.
- Meloche LM, Debruyne AMH, Otton SV, Ikonou MG & Gobas FAPC. (2009). Assessing exposure of sediment biota to organic contaminants by thin-film solid phase extraction. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 247-253.
- Menchai P, Van Zwieten L, Kimber S, Ahmad N, Rao PSC & Hose G. (2008). Bioavailable DDT residues in sediments: Laboratory assessment of ageing effects using semi-permeable membrane devices. *Environmental Pollution* 153, 110-118.
- Merino R, Bordajandi LR, Abad E, Rivera J & Jiménez B. (2005). Evaluation of organochlorine compounds in peregrine falcon (*Falco peregrinus*) and their main prey (*Columba livia*) inhabiting central Spain. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 2088-2093.
- Meyer VR & Majors RE. (2002). Minimizing the effect of sample preparation on measurement uncertainty. *LC-GC North America* 20, 106-112.
- Miège C, Schiavone S, Dabrin A, Coquery M, Mazzella N, Berho C, Ghestem JP, Togola A, Gonzalez C, Gonzalez JL, Lalere B, Lardy-Fontan S, Lepot B, Munaron D & Tixier C. (2012). An in situ intercomparison exercise on passive samplers for monitoring metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and pesticides in surface waters. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 36, 128-143.
- Mills GA, Greenwood R, Vrana B, Allan IJ, Ocelka T. (2011). Measurement of environmental pollutants using passive sampling devices--a commentary on the current state of the art. *J Environ Monit.* 13(11):2979-82.

- Ministerio de Agricultura. (1975). Boletín Oficial del Estado (BOE) Núm 308, December 24th, 1975. Orden del 4 de diciembre por la que se restringe el uso de ciertos plaguicidas.
- Mmualefe LC, Torto N, Huntsman-Mapila P & Mbongwe B. (2009). Headspace solid phase microextraction in the determination of pesticides in water samples from the Okavango Delta with gas chromatography-electron capture detection and time-of-flight mass spectrometry. *Microchemical Journal* 91, 239-244.
- Mo L, Wu JP, Luo XJ, Zou FS & Mai BX. (2012). Bioaccumulation of polybrominated diphenyl ethers, decabromodiphenyl ethane, and 1,2-bis(2,4,6-tribromophenoxy) ethane flame retardants in kingfishers (*Alcedo atthis*) from an electronic waste-recycling site in South China. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31, 2153-2158.
- Moermond CTA, Roozen FCJM, Zwolsman JJG & Koelmans AA. (2004). Uptake of sediment-bound bioavailable polychlorobiphenyls by benthivorous carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Science and Technology* 38, 4503-4509.
- Mongillo TM, Holmes EE, Noren DP, VanBlaricom GR, Punt AE, O'Neill SM, Ylitalo GM, Bradley Hanson M & Ross PS. (2012). Predicted polybrominated diphenyl ether (PBDE) and polychlorinated biphenyl (PCB) accumulation in southern resident killer whales. *Marine Ecology Progress Series* 453, 263-277.
- Monirith I, Ueno D, Takahashi S, Nakata H, Sudaryanto A, Subramanian A, Karuppiyah S, Ismail A, Muchtar M, Zheng J, Richardson BJ, Prudente M, Hue ND, Tana TS, Tkalin AV & Tanabe S. (2003). Asia-Pacific mussel watch: Monitoring contamination of persistent organochlorine compounds in coastal waters of Asian countries. *Marine Pollution Bulletin* 46, 281-300.
- Morris S, Allchin CR, Zegers BN, Haftka JJH, Boon JP, Belpaire C, Leonards PEG, Van Leeuwen SPJ & De Boer J. (2004). Distribution and fate of HBCD and TBBPA brominated flame retardants in North Sea estuaries and aquatic food webs. *Environmental Science and Technology* 38, 5497-5504.
- Morrison DE, Robertson BK & Alexander M. (2000). Bioavailability to earthworms of aged DDT, DDE, DDD, and dieldrin in soil. *Environmental Science and Technology* 34, 709-713.
- Moschet C., Vermeirssen E., Singer H., Stamm C., Hollender J. (2015). 'Evaluation of in-situ calibration of Chemcatcher passive samplers for 322 micropollutants in agricultural and urban affected rivers'. *Water Research*, 71:306-317.
- Mudroch A & MacKnight SD. (1994). Introduction. Chapter 1 in: *Handbook of Techniques for Aquatic Sediments Sampling* (2nd ed.), Mudroch, A. and MacKnight, S.D. (eds.), Lewis Publishers / CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, USA, pp. 1-3.
- Mueller JF, Mortimer MR, O'Brien J, Komarova T & Carter S. (2011). A cleaner river: Long term use of semipermeable membrane devices demonstrate that concentrations of selected organochlorines and PAHs in the Brisbane River estuary, Queensland have reduced substantially over the past decade. *Marine Pollution Bulletin* 63, 73-76.
- Muir D & Sverko E. (2006). Analytical methods for PCBs and organochlorine pesticides in environmental monitoring and surveillance: A critical appraisal. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 386, 769-789.
- Muir DCG, Whittle DM, De Vault DS, Bronte CR, Karlsson H, Backus S & Teixeira C. (2004). Bioaccumulation of toxaphene congeners in the lake superior food web. *Journal of Great Lakes Research* 30, 316-340.
- Muir DCG & de Wit CA. (2010). Trends of legacy and new persistent organic pollutants in the circumpolar arctic: Overview, conclusions, and recommendations. *Science of the Total Environment* 408, 3044-3051.
- Müller L, Górecki T & Pawliszyn J. (1999). Optimization of the SPME device design for field applications. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 364, 610-616.
- Müller JF, Manomanii K, Mortimer MR & McLachlan MS. (2001). Partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons in the polyethylene/water system. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 371, 816-822.
- Muñoz-Arnanz J & Jiménez B. (2011). New DDT inputs after 30 years of prohibition in Spain. A case study in agricultural soils from south-western Spain. *Environmental Pollution* 159, 3640-3646.
- Muscalu AM, Reiner EJ, Liss SN & Chen T. (2010). Determination of polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, chlorobenzenes in sludge and sediment samples by GC × GC-μECD. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 90, 1-13.
- Namięnik J. (2001). Modern Trends in Monitoring and Analysis of Environmental Pollutants *Polish Journal of Environmental Studies* Vol. 10, No. 3 (2001), 127-140
- Neilson AHA, A. S. Remberger, M. (1985). Biodegradation and transformation of recalcitrant compounds, p.29-86. In O. Hutzinger, (ed.) *The handbook of environmental chemistry*, vol. 2, part C. Springer-Verlag KG, Berlin.
- Nicola GG, Parra I, Sáez M, Almodóvar A & Jiménez B. (2014). Evaluation of PCBs and DDTs in endemic iberian barbel *barbus bocagei* (steindachner, 1864) populations. *Science of the Total Environment* 479-480, 221-226.

- NIEHS (1985). Substance Profiles, Dichlorodiphenyltrichloroethane, DDT, Report on carcinogens, 11th edition.
- Nilsen E, Zaugg S, Alvarez D, Morace J, Waite I, Counihan T, Hardiman J, Torres L, Patiño R, Mesa M & Grove R. (2014). Contaminants of legacy and emerging concern in largescale suckers (*Catostomus macrocheilus*) and the food-web in the lower Columbia River, Oregon and Washington, USA. *Science of the Total Environment* 484, 344-352.
- Nording M, Sparring S, Wiberg K, Björklund E & Haglund P. (2005). Monitoring dioxins in food and feedstuffs using accelerated solvent extraction with a novel integrated carbon fractionation cell in combination with a CAFLUX bioassay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381, 1472-1475.
- Nording M, Nickkova M, Spinnel E, Persson Y, Gee SJ, Hammock BD & Haglund P. (2006). Rapid screening of dioxin-contaminated soil by accelerated solvent extraction/purification followed by immunochemical detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385, 357-366.
- Norén K & Meironyté D. (2000). Certain organochlorine and organobromine contaminants in Swedish human milk in perspective of past 20-30 years. *Chemosphere* 40, 1111-1123.
- NRC (2003) Bioavailability of contaminants in soils and sediments: Processes, tools and applications. Prepared by Committee on Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediments, National Research Council. Washington, DC: National Academies Press.
- NTP (1986) Toxicology and Carcinogenesis Studies of Decabromodiphenyl Oxide (CAS no. 1163-19-5) En F344/N and B6c3F1 Mice (Fed Studies) National Toxicology Program; Research Triangle Park, NC: 1986. NTP TR 309.
- O'Brien D, Bartkow M & Mueller JF. (2011). Determination of deployment specific chemical uptake rates for SDB-RPD Empore disk using a passive flow monitor (PFM). *Chemosphere* 83, 1290-1295.
- Oen AMP, Schaanning M, Ruus A, Cornelissen G, Källqvist T & Breedveld GD. (2006). Predicting low biota to sediment accumulation factors of PAHs by using infinite-sink and equilibrium extraction methods as well as BC-inclusive modeling. *Chemosphere* 64, 1412-1420.
- Ogram AV, Jessup RE, Ou LT & Rao PSC. (1985). Effects of sorption on biological degradation rates of (2,4-dichlorophenoxy)acetic acid in soils. *Applied and Environmental Microbiology* 49, 582-587.
- Olofsson U, Bignert A & Haglund P. (2012). Time-trends of metals and organic contaminants in sewage sludge. *Water Research* 46, 4841-4851.
- Olsen J, Björklund E, Krogh KA & Hansen M. (2012). Development of an analytical methodology for the determination of the antiparasitic drug toltrazuril and its two metabolites in surface water, soil and animal manure. *Analytica Chimica Acta* 755, 69-76.
- Onofrejevá L, Vašíčková J, Klejduš B, Stratil P, Mišurcová L, Kráčmar S, Kopecký J & Vacek J. (2010). Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51, 464-470.
- Oros DR, Hoover D, Rodigari F, Crane D & Sericano J. (2005). Levels and distribution of polybrominated diphenyl ethers in water, surface sediments, and bivalves from the San Francisco. *Environmental Science and Technology* 39, 33-41.
- Ouyang G, Zhao W, Bragg L, Qin Z, Alae M & Pawliszyn J. (2007). Time-weighted average water sampling in Lake Ontario with solid-phase microextraction passive samplers. *Environmental Science and Technology* 41, 4026-4031.
- Páleníková A & Hrouzková S. (2014). Microextraction in packed syringe: Solvent-minimized sample preparation technique. *Monatshefte für Chemie* 145, 537-549.
- PAN (1998). DDT Factsheet. Pesticides News, No. 40, pp 18-20. Pesticide Action Network, UK. <http://www.pan-uk.org/pestnews/Actives/ddt.htm> (Accessed 18 May 2010).
- Parkerton TF, Stone MA & Letinski DJ. (2000). Assessing the aquatic toxicity of complex hydrocarbon mixtures using solid phase microextraction. *Toxicology Letters* 112-113, 273-282.
- Pawliszyn J. (2003). Sample preparation: Quo vadis? *Analytical Chemistry* 75, 2543-2558.
- Pawliszyn J. (2006). Why move analysis from laboratory to on-site? TrAC - Trends in Analytical Chemistry 25, 633-634.
- Pawliszyn J & Lord HL. (2011). Handbook of Sample Preparation.
- Pawliszyn J. (2012). Solid-Phase Microextraction in Perspective. In Handbook of Solid Phase Microextraction, pp. 1-12.
- Pehkonen S, You J, Akkanen J, Kukkonen JV & Lydy MJ. (2010). Influence of black carbon and chemical planarity on bioavailability of sediment-associated contaminants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 1976-1983.

- Peled M, Scharia R, Sondack D | 1995 | Thermal rearrangement of -hexabromocyclododecane (HBCD). en: Desmurs JR, Gerard B, Goldstein MJ (Eds.), *Advances in Organobromine Chemistry II*. Elsevier, pp. 92-99.
- Pena MT, Casais MC, Mejuto MC & Cela R. (2010). Development of a sample preparation procedure of sewage sludge samples for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons based on selective pressurized liquid extraction. *Journal of Chromatography A* 1217, 425-435.
- Pena-Abaurrea M, Ramos JJ, Gonzalez MJ, Ramos L | 2013 | Miniaturized selective pressurized liquid extraction of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers from feedstuffs. *J Chromatogr A* 1273, 18-25.
- Pérez RA, Tadeo JL, Albero B, Miguel E, Sánchez-Brunete C. (2013). Gas chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry for analysis of selected polyhalogenated pollutants in plants. Comparison of extraction methods. *Anal Bioanal Chem* 405(1):389-400.
- Petersen J, Paschke A, Gunold R & Schüürmann G. (2015). Calibration of Chemcatcher® passive sampler for selected highly hydrophobic organic substances under fresh and sea water conditions. *Environ Sci: Water Res Technol* 1, 218-226.
- Petrovic M, Eljarrat E, Lopez De Alda MJ & Barceló D. (2004). Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: A survey on new monitoring strategies and occurrence data. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378, 549-562.
- Petrovic M, Farré M, Eljarrat E, DÁaz-Cruz MS & Barceló D. (2013). Environmental Analysis: Emerging Pollutants. In *Liquid Chromatography: Applications*, pp. 389-410.
- Petty JD, Huckins JN, Martin DB, Adornato TG. (1995). Use of semipermeable membrane devices (SPMDS) to determine bioavailable organochlorine pesticide residues in streams receiving irrigation drainwater *Chemosphere* 30(10): 1891-1903
- Petty Jd, Huckins JN, Prest HF, Clark RC, Alvarez DA, Oranzio CE, Lebo JA, Cranor WL and Johnson BT (2000a). A guide for the use of semipermeable membrane devices (SPMDs) as sampler of waterborne hydrophobic organic contaminants, Publication No. 4690, American Petroleum Institute, Washington DC, 2000.
- Petty JD, Orazio CE, Huckins JN, Gale RW, Lebo JA, Meadows JC, Echols KR & Cranor WL. (2000b). Considerations involved with the use of semipermeable membrane devices for monitoring environmental contaminants. *Journal of Chromatography A* 879, 83-95.
- Pignatello JJ. (1991). Desorption of tetrachloroethene and 1,2-dibromo-3-chloropropane from aquifer sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10, 1399-1404.
- Pignatello JJ & Xing B. (1996). Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environmental Science and Technology* 30, 1-11.
- Pinto MI, Micaelo C, Vale C, Sontag G, Noronha JP (2014). Screening of priority pesticides in *Ulva* sp. seaweeds by selective pressurized solvent extraction before gas chromatography with electron capture detector analysis. *Arch Environ Contam Toxicol* 67(4):547-556.
- Pirard C, De Pauw E & Focant JF. (2003). New strategy for comprehensive analysis of polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and polychlorinated biphenyls by gas chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 998, 169-181.
- Polo M, Gómez-Noya G, Quintana JB, Llompart M, García-Jares C & Cela R. (2004). Development of a Solid-Phase Microextraction Gas Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Method for Polybrominated Diphenyl Ethers and Polybrominated Biphenyls in Water Samples. *Analytical Chemistry* 76, 1054-1062.
- Poot A, Jonker MTO, Gillissen F & Koelmans AA. (2014). Explaining PAH desorption from sediments using Rock Eval analysis. *Environmental Pollution* 193, 247-253.
- Porter RD & Wiemeyer SN. (1969). Dieldrin and DDT: Effects on sparrow hawk eggshells and reproduction. *Science* 165, 199-200.
- Prieto A, Schrader S & Moeder M. (2010). Determination of organic priority pollutants and emerging compounds in wastewater and snow samples using multiresidue protocols on the basis of microextraction by packed sorbents coupled to large volume injection gas chromatography-mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography A* 1217, 6002-6011.
- Puglisi E, Murk AJ, Van Den Berg HJ & Grotenhuis T. (2007). Extraction and bioanalysis of the ecotoxicologically relevant fraction of contaminants in sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 2122-2128.
- Qiu X, Zhu T, Yao B, Hu J & Hu S. (2005). Contribution of dicofol to the current DDT pollution in China. *Environmental Science and Technology* 39, 4385-4390.

- Qiu X & Zhu T. (2010). Using the o,p'-DDT/p,p'-DDT ratio to identify DDT sources in China. *Chemosphere* 81, 1033-1038.
- Rahm S, Green N, Norrgran J & Bergman Å. (2005). Hydrolysis of environmental contaminants as an experimental tool for indication of their persistency. *Environmental Science and Technology* 39, 3128-3133.
- Ramos JJ, Dietz C, González MJ & Ramos L. (2007a). Miniaturised selective pressurised liquid extraction of polychlorinated biphenyls from foodstuffs. *Journal of Chromatography A* 1152, 254-261.
- Ramos JJ, Gómara B, Fernández MA & González MJ. (2007b). A simple and fast method for the simultaneous determination of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in small volumes of human serum. *Journal of Chromatography A* 1152, 124-129.
- Ramsey CA & Hewitt AD. (2005). A methodology for assessing sample representativeness. *Environmental Forensics* 6, 71-75.
- Ramu K, Isobe T, Takahashi S, Kim EY, Min BY, We SU & Tanabe S. (2010). Spatial distribution of polybrominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecanes in sediments from coastal waters of Korea. *Chemosphere* 79, 713-719.
- Rand GMW, P. G. McCarty, L. S. (1995). Introduction to aquatic toxicology. En: Rand GM. (eds) "Fundamental of aquatic toxicology". Taylor and Francis, Washinton, DC. Pages: 3-66. En: *Aquatic Toxicology* (2nd ed.), Rand, G.M. (ed.), Taylor & Francis, Bristol, PA, USA, pp. 3-67.
- Rantalainen AL, Cretney WJ & Ikonou MG. (2000). Uptake rates of semipermeable membrane devices (SPMDS) for pcdds, PCDFS and PCBS in water and sediment. *Chemosphere* 40, 147-158.
- Rashid A, Nawaz S, Barker H, Ahmad I & Ashraf M. (2010). Development of a simple extraction and clean-up procedure for determination of organochlorine pesticides in soil using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217, 2933-2939.
- Ratola N, Santos L, Herbert P & Alves A. (2006). Uncertainty associated to the analysis of organochlorine pesticides in water by solid-phase microextraction/gas chromatography-electron capture detection-Evaluation using two different approaches. *Analytica Chimica Acta* 573-574, 202-208.
- Rayne S & Ikonou MG. (2002). Reconstructing source polybrominated diphenyl ether congener patterns from semipermeable membrane devices in the Fraser River, British Columbia, Canada: Comparison to commercial mixtures. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 2292-2300.
- Reichenberg F & Mayer P. (2006). Two complementary sides of bioavailability: Accessibility and chemical activity of organic contaminants in sediments and soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 1239-1245.
- Reichenberg F, Smedes F, Jönsson JA & Mayer P. (2008). Determining the chemical activity of hydrophobic organic compounds in soil using polymer coated vials. *Chemistry Central Journal* 2.
- Reid BJ, Jones KC & Semple KT. (2000). Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments - A perspective on mechanisms, consequences and assessment. *Environmental Pollution* 108, 103-112.
- Reid BJJ, K. C. Semple, K. T. (1999). Can bioavailability of PAHs be assessed by a chemical means? In: Leeson, A., Alleman, B. (Eds.), *Proceedings for the Fifth In Situ and On-Site Bioremediation International Symposium*, vol. 8. Battelle Press, Columbus, OH, pp. 253-258.
- Rezaee M, Assadi Y, Milani Hosseini MR, Aghae E, Ahmadi F & Berijani S. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A* 1116, 1-9.
- Rhodes AH, McAllister LE & Semple KT. (2010). Linking desorption kinetics to phenanthrene biodegradation in soil. *Environmental Pollution* 158, 1348-1353.
- Richardson SD & Ternes TA. (2014). Water analysis: Emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry* 86, 2813-2848.
- Richter BE, Jones BA, Ezzell JL, Porter NL, Avdalovic N & Pohl C. (1996). Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Analytical Chemistry* 68, 1033-1039.
- Ricking M & Schwarzbauer J. (2012). DDT isomers and metabolites in the environment: An overview. *Environmental Chemistry Letters* 10, 317-323.
- Rico-Rico Á, Droge STJ & Hermens JLM. (2010). Predicting sediment sorption coefficients for linear alkylbenzenesulfonate congeners from polyacrylate - Water partition coefficients at different salinities. *Environmental Science and Technology* 44, 941-947.
- Ridgway J & Shimmield G. (2002). Estuaries as repositories of historical contamination and their impact on shelf seas. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 55, 903-928.

- Robinson EM, Trumble SJ, Subedi B, Sanders R & Usenko S. (2013). Selective pressurized liquid extraction of pesticides, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in a whale earplug (earwax): A novel method for analyzing organic contaminants in lipid-rich matrices. *Journal of Chromatography A* 1319, 14-20.
- Robles-Molina J, Gilbert-López B, García-Reyes JF & Molina-Díaz A. (2010). Determination of organic priority pollutants in sewage treatment plant effluents by gas chromatography high-resolution mass spectrometry. *Talanta* 82, 1318-1324.
- Robrock KR, Korytár P & Alvarez-Cohen L. (2008). Pathways for the anaerobic microbial denomination of polybrominated diphenyl ethers. *Environmental Science and Technology* 42, 2845-2852.
- Rodil R, Carro AM, Lorenzo RA & Torrijos RC. (2005). Selective extraction of trace levels of polychlorinated and polybrominated contaminants by supercritical fluid-solid-phase microextraction and determination by gas chromatography/mass spectrometry. Application to aquaculture fish feed and cultured marine species. *Analytical Chemistry* 77, 2259-2265.
- Rorije E, Verbruggen EMJ, Hollander A, Traas TP & Janssen MPM. (2011). Identifying potential POP and PBT substances Development of a new Persistence/Bioaccumulation-score RIVM Report 601356001/2011.
- Ross PS, Couillard CM, Ikononou MG, Johannessen SC, Lebeuf M, Macdonald RW & Tomy GT. (2009). Large and growing environmental reservoirs of Deca-BDE present an emerging health risk for fish and marine mammals. *Marine Pollution Bulletin* 58, 7-10.
- Ruiz-Matute AI, Ramos L, Martínez-Castro I & Sanz ML. (2008). Fractionation of honey carbohydrates using pressurized liquid extraction with activated charcoal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 8309-8313.
- Rusina TP. (2009). PhD Thesis.
- Rusina TP, Smedes F, Koblizkova M & Klanova J. (2010). Calibration of silicone rubber passive samplers: Experimental and modeled relations between sampling rate and compound properties. *Environmental Science and Technology* 44, 362-367.
- Ruus A, Green NW, Maage A, Amundsen CE, Schøyen M & Skei J. (2010). Post World War II orcharding creates present day DDT-problems in The Sørfjord (Western Norway) - A case study. *Marine Pollution Bulletin* 60, 1856-1861.
- Salgado-Petinal C, Garcia-Chao M, Llompart M, Garcia-Jares C & Cela R. (2006). Headspace solid-phase microextraction gas chromatography tandem mass spectrometry for the determination of brominated flame retardants in environmental solid samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385, 637-644.
- Salgueiro-González N, Turnes-Carou I, Muniategui-Lorenzo S, López-Mahía P & Prada-Rodríguez D. (2012). Fast and selective pressurized liquid extraction with simultaneous in cell clean up for the analysis of alkylphenols and bisphenol A in bivalve molluscs. *Journal of Chromatography A* 1270, 80-87.
- Sánchez-Avila J, Fernandez-Sanjuan M, Vicente J & Lacorte S. (2011). Development of a multi-residue method for the determination of organic micropollutants in water, sediment and mussels using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218, 6799-6811.
- Sánchez-Bayo F, Hyne RV, Kibria G & Doble P. (2013). Calibration and field application of chemcatcher® passive samplers for detecting amitrole residues in agricultural drain waters. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 90, 635-639.
- Sánchez-Bayo F. and Hyne R.V. (2014). 'Detection and analysis of neonicotinoids in river waters - Development of a passive sampler for three commonly used insecticides'. *Chemosphere*, 99:143-151.
- Santín G, Barón E, Eljarrat E & Barceló D. (2013). Emerging and historical halogenated flame retardants in fish samples from Iberian rivers. *Journal of Hazardous Materials* 263, 116-121.
- Schäfer RB, Paschke A & Liess M. (2008). Aquatic passive sampling of a short-term thiacloprid pulse with the Chemcatcher: Impact of biofouling and use of a diffusion-limiting membrane on the sampling rate. *Journal of Chromatography A* 1203, 1-6.
- Schantz MM, Nichols JJ & Wise SA. (1997). Evaluation of Pressurized Fluid Extraction for the Extraction of Environmental Matrix Reference Materials. *Analytical Chemistry* 69, 4210-4219.
- Schechter A, Harris TR, Shah N, Musumba A & Pöpke O. (2008). Brominated flame retardants in US food. *Molecular Nutrition and Food Research* 52, 266-272.
- Schechter A, Colacino J, Sjödin A, Needham L & Birnbaum L. (2010). Partitioning of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in serum and milk from the same mothers. *Chemosphere* 78, 1279-1284.

- Schwarzbauer J. (2006). Organic contaminants in riverine and groundwater systems: Aspects of the anthropogenic contribution.
- Schwarzenbach RPG, P. M. Imboden, D. M. (1993). Environmental organic chemistry. New York: John Wiley & Sons.
- Sellström U, Kierkegaard A, De Wit C & Jansson BO. (1998). Polybrominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecane in sediment and fish from a Swedish River. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 1065-1072.
- Sellström U, Bignert A, Kierkegaard A, Haggberg L, De Wit CA, Olsson M & Jansson B. (2003). Temporal Trend Studies on Tetra- and Pentabrominated Diphenyl Ethers and Hexabromocyclododecane in Guillemot Egg from the Baltic Sea. *Environmental Science and Technology* 37, 5496-5501.
- Semple KT, Morriss AWJ & Paton GI. (2003). Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: Fundamental concepts and techniques for analysis. *European Journal of Soil Science* 54, 809-818.
- Semple KT, Doick KJ, Jones KC, Burauel P, Craven A & Harms H. (2004). Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environmental Science and Technology* 38, 228A-231A.
- Shanmuganathan D, Megharaj M, Chen Z & Naidu R. (2011). Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in marine foodstuffs in Australia: Residue levels and contamination status of PBDEs. *Marine Pollution Bulletin* 63, 154-159.
- Shaw M. and Mueller J.F. (2009). 'Time Integrative Passive Sampling: How Well Do Chemcatchers Integrate Fluctuating Pollutant Concentrations?' *Environmental Science and Technology*, 43 (5):1443-1448.
- Shaw M., Eaglesham G. and Mueller J.F. (2009). 'Uptake and release of polar compounds in SDB-RPS Empore disks; implications for their use as passive samplers'. *Chemosphere*, 75 (1):1-7.
- Shi T, Chen SJ, Luo XJ, Zhang XL, Tang CM, Luo Y, Ma YJ, Wu JP, Peng XZ & Mai BX. (2009). Occurrence of brominated flame retardants other than polybrominated diphenyl ethers in environmental and biota samples from southern China. *Chemosphere* 74, 910-916.
- Shor LM, Rockne KJ, Taghon GL, Young LY & Kosson DS. (2003). Desorption kinetics for field-aged polycyclic aromatic hydrocarbons from sediments. *Environmental Science and Technology* 37, 1535-1544.
- Siddique S, Xian Q, Abdelouahab N, Takser L, Phillips SP, Feng YL, Wang B & Zhu J. (2012). Levels of dechlorane plus and polybrominated diphenylethers in human milk in two Canadian cities. *Environment International* 39, 50-55.
- Sjödín A, Patterson Jr DG & Bergman Åke Å. (2003). A review on human exposure to brominated flame retardants - Particularly polybrominated diphenyl ethers. *Environment International* 29, 829-839.
- Sjödín A, Jones RS, Caudill SP, Wong LY, Turner WE & Calafat AM. (2014). Polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, and persistent pesticides in serum from the national health and nutrition examination survey: 2003-2008. *Environmental Science and Technology* 48, 753-760.
- Skarphedinsdóttir H, Gunnarsson K, Gudmundsson GA & Nfon E. (2010). Bioaccumulation and biomagnification of organochlorines in a marine food web at a pristine site in Iceland. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 58, 800-809.
- Smedes F. (1994). Sampling and Partition of Neutral Organic Contaminants in Surface Waters With Regard to Legislation, Environmental Quality and Flux Estimations. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 57, 215-229.
- Smedes F & De Boer J. (1997). Determination of chlorobiphenyls in sediments - Analytical methods. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 16, 503-517.
- Smedes F. (2007a). Chapter 19 Monitoring of chlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons by passive sampling in concert with deployed mussels. In *Comprehensive Analytical Chemistry*, pp. 407-448.
- Smedes F, Van der Zande T & Davies I, M. (2007b). ICES passive sampling trial survey for water and sediment (PSTS) 2006-2007. Part 3: preliminary interpretation of field data, <http://www.ices.dk/products/cmdocs/cm-2007/j/j0407.pdf>.
- Smedes F, Geertsma RW, Van Der Zande T & Booij K. (2009). Polymer-water partition coefficients of hydrophobic compounds for passive sampling: Application of cosolvent models for validation. *Environmental Science and Technology* 43, 7047-7054.
- Smedes F & Booij K. (2012). Guidelines for passive sampling of hydrophobic contaminants in water using silicone rubber samplers. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences* No. 52. 20 pp.
- Smit M, Steinbusch K & Grotenhuis T. (2004). Fate of drins in sediment with anaerobic granular sludge. In *Remediation of Contaminated Sediments - 2003: Proceedings of the Second International Conference on Remediation of Contaminated Sediments*, pp. 559-566.

- Söderström G, Sellström U, De Wit CA & Tysklind M. (2004). Photolytic Debromination of Decabromodiphenyl Ether (BDE 209). *Environmental Science and Technology* 38, 127-132.
- Söderström H, Lindberg RH & Fick J. (2009). Strategies for monitoring the emerging polar organic contaminants in water with emphasis on integrative passive sampling. *Journal of Chromatography A* 1216, 623-630.
- Song Y, Wang F, Yang X, Liu C, Kengara FO, Jin X & Jiang X. (2011). Chemical extraction to assess the bioavailability of chlorobenzenes in soil with different aging periods. *Journal of Soils and Sediments* 11, 1345-1354.
- Sormunen AJ, Koistinen J, Leppänen MT & Kukkonen JVK. (2008a). Desorption of sediment-associated polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, diphenyl ethers and hydroxydiphenyl ethers from contaminated sediment. *Chemosphere* 72, 1-7.
- Sormunen AJ, Leppänen MT & Kukkonen JVK. (2008b). Influence of sediment ingestion and exposure concentration on the bioavailable fraction of sediment-associated tetrachlorobiphenyl in oligochaetes. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 854-863.
- Sormunen AJ, Leppänen MT & Kukkonen JVK. (2009a). Desorption and bioavailability of spiked pentabromo Diphenyl Ether and Tetrachlorodibenzo(p)dioxin in contaminated sediments. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 56, 670-679.
- Sormunen AJ, Leppänen MT & Kukkonen JVK. (2009b). Examining the role of temperature and sediment-chemical contact time on desorption and bioavailability of sediment-associated tetrabromo diphenyl ether and benzo(a)pyrene. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 1234-1241.
- Sormunen AJ, Tuikka AI, Akkanen J, Leppänen MT & Kukkonen JVK. (2010). Predicting the bioavailability of sediment-associated spiked compounds by using the polyoxymethylene passive sampling and Tenax® extraction methods in sediments from three river basins in Europe. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 59, 80-90.
- Sosa-Ferrera Z, Mahugo-Santana C & Santana-Rodríguez JJ. (2013). Analytical methodologies for the determination of endocrine disrupting compounds in biological and environmental samples. *BioMed Research International* 2013.
- Sporring S, Wiberg K, Björklund E & Haglund P. (2003). Combined extraction/Clean-up strategies for fast determination of PCDD/Fs and WHO PCBs in food and feed samples using accelerated solvent extraction, *Organohalogen Compounds*, 60-65, Dioxin 2003, Boston.
- Sporring S & Björklund E. (2004). Selective pressurized liquid extraction of polychlorinated biphenyls from fat-containing food and feed samples: Influence of cell dimensions, solvent type, temperature and flush volume. *Journal of Chromatography A* 1040, 155-161.
- Sporring S, Von Holst C & Björklund E. (2006). Selective pressurized liquid extraction of PCB's from food and feed samples: Effects of high lipid amounts and lipid type on fat retention. *Chromatographia* 64, 553-557.
- Sprovieri M, Feo ML, Prevedello L, Manta DS, Sammartino S, Tamburrino S & Marsella E. (2007). Heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in surface sediments of the Naples harbour (southern Italy). *Chemosphere* 67, 998-1009.
- Standardization IOF. (2008). Soil quality - Requirements and guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability of contaminants in soil and soil materials.
- Stapleton HM, Alaee M, Letcher RJ & Baker JE. (2004a). Debromination of the Flame Retardant Decabromodiphenyl Ether by Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*) following Dietary Exposure. *Environmental Science and Technology* 38, 112-119.
- Stapleton HM, Letcher RJ & Baker JE. (2004b). Debromination of Polybrominated Diphenyl Ether Congeners BDE 99 and BDE 183 in the Intestinal Tract of the Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Science and Technology* 38, 1054-1061.
- Stapleton HM, Brazil B, Holbrook RD, Mitchelmore CL, Benedict R, Konstantinov A & Potter D. (2006). In vivo and in vitro debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209) by juvenile rainbow trout and common carp. *Environmental Science and Technology* 40, 4653-4658.
- Stapleton HM, Keller JM, Schantz MM, Kucklick JR, Leigh SD & Wise SA. (2007). Determination of polybrominated diphenyl ethers in environmental standard reference materials. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387, 2365-2379.
- Stapleton HM & Dodder NG. (2008). Photodegradation of decabromodiphenyl ether in house dust by natural sunlight. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 306-312.
- Stapleton HM, Eagle S, Sjödin A & Webster TF. (2012). Serum PBDEs in a North Carolina toddler cohort: Associations with handwipes, house dust, and socioeconomic variables. *Environmental Health Perspectives* 120, 1049-1054.

- Stephansen DA, Svendsen TC, Vorkamp K & Frier JO. (2012). Changes in patterns of persistent halogenated compounds through a pelagic food web in the Baltic Sea. *Marine Environmental Research* 73, 17-24.
- Stephens BS, Kapernick A, Eaglesham G & Mueller J. (2005). Aquatic passive sampling of herbicides on naked particle loaded membranes: Accelerated measurement and empirical estimation of kinetic parameters. *Environmental Science and Technology* 39, 8891-8897.
- Stephens BS, Kapernick AP, Eaglesham G & Mueller JF. (2009). Event monitoring of herbicides with naked and membrane-covered Empore disk integrative passive sampling devices. *Marine Pollution Bulletin* 58, 1116-1122.
- Streets SS, Henderson SA, Stoner AD, Carlson DL, Simcik MF & Swackhamer DL. (2006). Partitioning and bioaccumulation of PBDEs and PCBs in Lake Michigan. *Environmental Science and Technology* 40, 7263-7269.
- Subedi B, Mottaleb MA, Chambliss CK & Usenko S. (2011). Simultaneous analysis of select pharmaceuticals and personal care products in fish tissue using pressurized liquid extraction combined with silica gel cleanup. *Journal of Chromatography A* 1218, 6278-6284.
- Subedi B & Usenko S. (2012). Enhanced pressurized liquid extraction technique capable of analyzing polychlorodibenzo-p-dioxins, polychlorodibenzofurans, and polychlorobiphenyls in fish tissue. *Journal of Chromatography A* 1238, 30-37.
- Subedi B, Aguilar L, Williams ES, Brooks BW & Usenko S. (2014). Selective pressurized liquid extraction technique capable of analyzing dioxins, furans, and pcbs in clams and crab tissue. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 92, 460-465.
- Sukola K, Koziel J, Augusto F & Pawliszyn J. (2001). Diffusion-based calibration for SPME analysis of aqueous samples. *Analytical Chemistry* 73, 13-18.
- Sutton NB, Atashgahi S, van der Wal J, Wijn G, Grotenhuis T, Smidt H & Rijnaarts HHM. (2015). Microbial dynamics during and after in situ chemical oxidation of chlorinated solvents. *Groundwater* 53, 261-270.
- Tadeo JL, Sánchez-Brunete C, Albero B, García-Valcárcel AI & Pérez RA. (2012). Analysis of emerging organic contaminants in environmental solid samples. *Central European Journal of Chemistry* 10, 480-520.
- Talsness CE, Shakibaei M, Kuriyama SN, Grande SW, Sterner-Kock A, Schnitker P, De Souza C, Grote K & Chahoud I. (2005). Ultrastructural changes observed in rat ovaries following in utero and lactational exposure to low doses of a polybrominated flame retardant. *Toxicology Letters* 157, 189-202.
- Tang J, Robertson BK & Alexander M. (1999). Chemical-extraction methods to estimate bioavailability of DDT, DDE, and DDD in soil. *Environmental Science and Technology* 33, 4346-4351.
- Tao S, Guo LQ, Wang XJ, Liu WX, Ju TZ, Dawson R, Cao J, Xu FL & Li BG. (2004). Use of sequential ASE extraction to evaluate the bioavailability of DDT and its metabolites to wheat roots in soils with various organic carbon contents. *Science of the Total Environment* 320, 1-9.
- Ten Hulscher TEM, Postma J, Den Besten PJ, Stroomberg GJ, Belfroid A, Wegener JW, Faber JH, Van Der Pol JJC, Jan Hendriks A & Van Noort PCM. (2003). Tenax extraction mimics benthic and terrestrial bioavailability of organic compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 2258-2265.
- Teuten EL, Xu L & Reddy CM. (2005). Two abundant bioaccumulated halogenated compounds are natural products. *Science* 307, 917-920.
- Thermo Application Note (1996). Dionex Corporation. Selective Extraction of PCBs from Fish Tissue Using Accelerated Solvent Extraction (ASE). Application Note 322; LPN 0764. Sunnyvale, CA, 1996.
- Thomas JE, Ou LT & Al-Agely A. (2008). DDE remediation and degradation. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, pp. 55-69.
- Thomsen C, Småstuen Haug L, Leknes H, Lundanes E, Becher G & Lindström G. (2002). Comparing electron ionization high-resolution and electron capture low-resolution mass spectrometric determination of polybrominated diphenyl ethers in plasma, serum and milk. *Chemosphere* 46, 641-648.
- Thornton SF, Lerner DN & Banwart SA. (2001). Assessing the natural attenuation of organic contaminants in aquifers using plume-scale electron and carbon balances: Model development with analysis of uncertainty and parameter sensitivity. *Journal of Contaminant Hydrology* 53, 199-232.
- Tittlemier SA & Tomy GT. (2001). Vapor pressures of six brominated diphenyl ether congeners. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 146-148.
- Tollbäck P, Björklund J & Östman C. (2003). Large-volume programmed-temperature vaporiser injection for fast gas chromatography with electron capture and mass spectrometric detection of polybrominated diphenyl ethers. *Journal of Chromatography A* 991, 241-253.

- Toms LML, Guerra P, Eljarrat E, Barceló D, Harden FA, Hobson P, Sjodin A, Ryan E & Mueller JF. (2012). Brominated flame retardants in the Australian population: 1993-2009. *Chemosphere* 89, 398-403.
- Tomy GT, Palace VP, Halldorson T, Braekevelt E, Danell R, Wautier K, Evans B, Brinkworth L & Fisk AT. (2004). Bioaccumulation, Biotransformation, and Biochemical Effects of Brominated Diphenyl Ethers in Juvenile Lake Trout (*Salvelinus namaycush*). *Environmental Science and Technology* 38, 1496-1504.
- Tomy GT, Pleskach K, Oswald T, Halldorson T, Helm PA, Macinnis G & Marvin CH. (2008). Enantioselective bioaccumulation of hexabromocyclododecane and congener-specific accumulation of brominated diphenyl ethers in an eastern Canadian Arctic marine food web. *Environmental Science and Technology* 42, 3634-3639.
- Törnkvist A, Glynn A, Aune M, Darnerud PO & Ankarberg EH. (2011). PCDD/F, PCB, PBDE, HBCD and chlorinated pesticides in a Swedish market basket from 2005 - Levels and dietary intake estimations. *Chemosphere* 83, 193-199.
- Torres Padrón ME, Sosa Ferrera Z & Santana Rodríguez JJ. (2006). Optimisation of solid-phase microextraction coupled to HPLC-UV for the determination of organochlorine pesticides and their metabolites in environmental liquid samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 386, 332-340.
- Trumble SJ, Robinson EM, Noren SR, Usenko S, Davis J & Kanatous SB. (2012). Assessment of legacy and emerging persistent organic pollutants in Weddell seal tissue (*Leptonychotes weddellii*) near McMurdo Sound, Antarctica. *Science of the Total Environment* 439, 275-283.
- Uhle ME, Chin YP, Aiken GR & McKnight DM. (1999). Binding of polychlorinated biphenyls to aquatic humic substances: The role of substrate and sorbate properties on partitioning. *Environmental Science and Technology* 33, 2715-2718.
- UNEP (1995). Governing Council Decision 18/32: Persistent Organic Pollutants, Nairobi, May 1995.
- UNEP (2001). Final Act of the Conference of Plenipotentiaries on The Stockholm Convention On Persistent Organic Pollutants. UNEP/POPS/CONF/4, United Nations Environment Programme, Geneva, Switzerland, available online at http://www.pops.int/documents/meetings/dipcon/25june2001/conf4_finalact/en/FINALACT-English.PDF
- UNEP (2013). Persistent Organic Pollutants Review Committee. Ninth meeting, Rome, 14-18 October 2013 UNEP/POPS/POPRC.9/13.
- UNEP (2015): <http://chm.pops.int>. Acceso en agosto de 2015.
- USEPA (1995a) Method 3545, Pressurised fluid extraction, test methods for evaluating solid waste, 3rd ed., Update III; EPA SW-846: U.S. GPO, Washington DC, July 1995.
- USEPA (1996a) Method 3550C, Ultrasonic extraction. Revision 3. December 1996. Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods (SW-846).
- USEPA (1996b) Method 3660B, Sulfur Cleanup. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, 1996.
- USEPA (1996c) Method 3665A, Sulfuric acid/Permanganate Cleanup, December 1996, Revision 01, 5 p.
- USEPA (1998) Contaminated sediment management strategy. EPA 823-R-98-001. Office of Water, Washington, DC.
- USEPA (2000) Bioaccumulation testing and interpretation for the purpose of sediment quality assessment. EPA-823-R-00-001, U.S. EPA Office of Water, Office of Solid Waste: Washington, DC, 2000.
- USEPA (2007) Method 1614: Brominated Diphenyl Ethers in Waste Soil, Sediment and Tissue by HRGC/HRMS, US Environmental Protection Agency, Office of Water, Office of Science and Technology Engineering and Analysis Division, Washington, DC, 2007 (EPA-821-R-07-005).
- USEPA (2010) Method 1614A, Brominated Diphenyl Ethers in Water, Soil, Sediment, and Tissue by HRGC/HRMS. 2010.
- Valsaraj KT & Thibodeaux LJ. (2010). On the physicochemical aspects of the global fate and long-range atmospheric transport of persistent organic pollutants. *Journal of Physical Chemistry Letters* 1, 1694-1700.
- Van Ael E, Covaci A, Blust R & Bervoets L. (2012). Persistent organic pollutants in the Scheldt estuary: Environmental distribution and bioaccumulation. *Environment International* 48, 17-27.
- Van den Berg H. (2009). Global status of DDT and its alternatives for use in vector control to prevent disease. *Environmental Health Perspectives* 117, 1656-1663.

- Van den Berg M, Michael S. Denison, Linda S. Birnbaum, Michael J. DeVito, Heidelore Fiedler, Jerzy Falandysz, Martin Rose, Dieter Schrenk, Stephen Safe, Chiharu Tohyama, Angelika Tritscher, Mats Tysklind, and Richard E. Peterson. (2013) Polybrominated Dibenzop-Dioxins, Dibenzofurans, and Biphenyls: Inclusion in the Toxicity Equivalency Factor Concept for Dioxin-Like Compounds. *Toxicol Sci.* 133(2): 197–208.
- Van der Velde EG, de Haan W & Liem AKD. (1992). Supercritical fluid extraction of polychlorinated biphenyls and pesticides from soil. Comparison with other extraction methods. *Journal of Chromatography A* 626, 135-143.
- Van der Ven LTM, van de Kuil T, Verhoef A, Leonards PEG, Slob W, Cantón RF, Germer S, Hamers T, Visser TJ, Litens S, Håkansson H, Fery Y, Schrenk D, van den Berg M, Piersma AH & Vos JG. (2008). A 28-day oral dose toxicity study enhanced to detect endocrine effects of a purified technical pentabromodiphenyl ether (pentaBDE) mixture in Wistar rats. *Toxicology* 245, 109-122.
- Van Dyk JC, Bouwman H, Barnhoorn IEJ & Bornman MS. (2010). DDT contamination from indoor residual spraying for malaria control. *Science of the Total Environment* 408, 2745-2752.
- Van Emon JM & Chuang JC. (2012). Development of a simultaneous extraction and cleanup method for pyrethroid pesticides from indoor house dust samples. *Analytica Chimica Acta* 745, 38-44.
- Van Emon JM, Chuang JC, Bronshtein A & Altstein M. (2013). Determination of polychlorinated biphenyls in soil and sediment by selective pressurized liquid extraction with immunochemical detection. *Science of the Total Environment* 463-464, 326-333.
- Van Noort PCM, Cornelissen G, Ten Hulscher TEM, Vrind BA, Rigterink H & Belfroid A. (2003). Slow and very slow desorption of organic compounds from sediment: Influence of sorbate planarity. *Water Research* 37, 2317-2322.
- van Noort PCM, Poot A & Koelmans AA. (2014). Analysis of organic contaminant desorption kinetic data for sediments and soils: Implications for the Tenax extraction time for the determination of bioavailable concentrations. *Science of the Total Environment* 490, 235-238.
- Vecchiato M, Argiriadis E, Zambon S, Barbante C, Toscano G, Gambaro A & Piazza R. (2015). Persistent Organic Pollutants (POPs) in Antarctica: Occurrence in continental and coastal surface snow. *Microchemical Journal* 119, 75-82.
- Vega D, Sosa Z & Santana-Rodríguez JJ. (2008). Application of microwave-assisted micellar extraction combined with solid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography with UV detection for the determination of organochlorine pesticides in different mud samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 88, 185-197.
- Veljanoska-Sarafloska EM, Jordanoski M & Stafilov T. (2013). Presence of DDT metabolites in water, sediment and fish muscle tissue from Lake Prespa, Republic of Macedonia. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* 48, 548-558.
- Verhaar HJM, Busser FJM & Hermens JLM. (1995). Surrogate parameter for the baseline toxicity content of contaminated water: simulating the bioconcentration of mixtures of pollutants and counting molecules. *Environmental Science & Technology* 29, 726-734.
- Vermeirssen ELM, Asmin J, Escher BI, Kwon JH, Steimen I & Hollender J. (2008). The role of hydrodynamics, matrix and sampling duration in passive sampling of polar compounds with Empore™ SDB-RPS disks. *Journal of Environmental Monitoring* 10, 119-128.
- Vermeirssen ELM, Bramaz N, Hollender J, Singer H & Escher BI. (2009). Passive sampling combined with ecotoxicological and chemical analysis of pharmaceuticals and biocides - evaluation of three Chemcatcher™ configurations. *Water Research* 43, 903-914.
- Vermeirssen ELM, Dietschweiler C, Escher BI, Van Der Voet J & Hollender J. (2012). Transfer kinetics of polar organic compounds over polyethersulfone membranes in the passive samplers pocis and chemcatcher. *Environmental Science and Technology* 46, 6759-6766.
- Vermeirssen ELM, Dietschweiler C, Escher BI, Van Der Voet J & Hollender J. (2013). Uptake and release kinetics of 22 polar organic chemicals in the Chemcatcher passive sampler. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405, 5225-5236.
- Verreault J, Gabrielsen GW, Chu S, Muir DCG, Andersen M, Hamaed A & Letcher RJ. (2005). Flame retardants and methoxylated and hydroxylated polybrominated diphenyl ethers in two Norwegian arctic top predators: Glaucous gulls and polar bears. *Environmental Science and Technology* 39, 6021-6028.
- Vetter W & Rosenfelder N. (2008). Gas chromatography retention data of environmentally relevant polybrominated compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392, 489-504.
- Vilaplana F, Karlsson P, Ribes-Greus A, Ivarsson P & Karlsson S. (2008). Analysis of brominated flame retardants in styrenic polymers. Comparison of the extraction efficiency of ultrasonication, microwave-assisted extraction and pressurised liquid extraction. *Journal of Chromatography A* 1196-1197, 139-146.

- Vilaplana F, Ribes-Greus A & Karlsson S. (2009). Microwave-assisted extraction for qualitative and quantitative determination of brominated flame retardants in styrenic plastic fractions from waste electrical and electronic equipment (WEEE). *Talanta* 78, 33-39.
- Vinturella AE, Burgess RM, Coull BA, Thompson KM, Shine JP. (2004). Use of passive samplers to mimic uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by benthic polychaetes. *Environ Sci Technol.* 38(4):1154-1160.
- Volkering F, Quist J, Van Velsen A, Thomassen P & Olijve M. (1998). A rapid method for predicting the residual concentration after biological treatment of oil-polluted soils. En: *Contaminated Soil 1998*, vol. 1. Thomas Telford, London, pp. 251-259.
- Vonderheide AP, Mueller-Spitz SR, Meija J, Welsh GL, Mueller KE, Kinkle BK, Shann JR & Caruso JA. (2006). Rapid breakdown of brominated flame retardants by soil microorganisms. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 21, 1232-1239.
- Vonderheide AP, Mueller KE, Meija J & Welsh GL. (2008). Polybrominated diphenyl ethers: Causes for concern and knowledge gaps regarding environmental distribution, fate and toxicity. *Science of the Total Environment* 400, 425-436.
- Vonderheide AP. (2009). A review of the challenges in the chemical analysis of the polybrominated diphenyl ethers. *Microchemical Journal* 92, 49-57.
- Voparil IM & Mayer LM. (2000). Dissolution of sedimentary polycyclic aromatic hydrocarbons into the lugworm's (*Arenicola marina*) digestive fluids. *Environmental Science and Technology* 34, 1221-1228.
- Voparil IM & Mayer LM. (2004). Commercially available chemicals that mimic a deposit feeder's (*Arenicola marina*) digestive solubilization of lipids. *Environmental Science and Technology* 38, 4334-4339.
- Vorkamp K, Bester K & Rigét FF. (2012). Species-specific time trends and enantiomer fractions of hexabromocyclododecane (HBCD) in biota from east greenland. *Environmental Science and Technology* 46, 10549-10555.
- Vrana B, Popp P, Paschke A & Schüürmann G. (2001). Membrane-enclosed sorptive coating. An integrative passive sampler for monitoring organic contaminants in water. *Analytical Chemistry* 73, 5191-5200.
- Vrana B, Allan IJ, Greenwood R, Mills GA, Dominiak E, Svensson K, Knutsson J & Morrison G. (2005a). Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 24, 845-868.
- Vrana B, Mills G, Greenwood R, Knutsson J, Svensson K & Morrison G. (2005b). Performance optimisation of a passive sampler for monitoring hydrophobic organic pollutants in water. *Journal of Environmental Monitoring* 7, 612-620.
- Vrana B, Paschke H, Paschke A, Popp P & Schüürmann G. (2005c). Performance of semipermeable membrane devices for sampling of organic contaminants in groundwater. *Journal of Environmental Monitoring* 7, 500-508.
- Vrana B, Mills GA, Dominiak E & Greenwood R. (2006a). Calibration of the Chemcatcher passive sampler for the monitoring of priority organic pollutants in water. *Environmental Pollution* 142, 333-343.
- Vrana B, Paschke A & Popp P. (2006b). Calibration and field performance of membrane-enclosed sorptive coating for integrative passive sampling of persistent organic pollutants in water. *Environmental Pollution* 144, 296-307.
- Vrana B, Mills GA, Kotterman M, Leonards P, Booij K & Greenwood R. (2007). Modelling and field application of the Chemcatcher passive sampler calibration data for the monitoring of hydrophobic organic pollutants in water. *Environmental Pollution* 145, 895-904.
- Vrana B, Mills GA, Leonards PEG, Kotterman M, Weideborg M, Hajlová J, Kocourek V, Tomaniová M, Pulkrabová J, Suchanová M, Hájková K, Herve S, Ahkola H & Greenwood R. (2010). Field performance of the Chemcatcher passive sampler for monitoring hydrophobic organic pollutants in surface water. *Journal of Environmental Monitoring* 12, 863-872.
- Vryzas Z, Vassiliou G, Alexoudis C & Papadopoulou-Mourkidou E. (2009). Spatial and temporal distribution of pesticide residues in surface waters in northeastern Greece. *Water Research* 43, 1-10.
- Wang Y, Li A, Liu H, Zhang Q, Ma W, Song W & Jiang G. (2006). Development of quantitative structure gas chromatographic relative retention time models on seven stationary phases for 209 polybrominated diphenyl ether congeners. *Journal of Chromatography A* 1103, 314-328.
- Wang B, Yu G, Huang J, Hu H, Yu Y & Wang L. (2009). Tiered aquatic ecological risk assessment of organochlorine pesticides and their mixture in Jiangsu reach of Huaihe River, China. *Environmental Monitoring and Assessment* 157, 29-42.
- Wang B, Yu G, Huang J, Wang T & Hu H. (2011). Probabilistic ecological risk assessment of DDTs in the Bohai Bay based on a food web bioaccumulation model. *Science of the Total Environment* 409, 495-502.

- Wania F & Mackay D. (1996). Tracking the distribution of persistent organic pollutants. *Environmental Science and Technology* 30, 390A-397A.
- Webster L., Tronczynski J, Bersuder P., Vorkamp K., Lepomices P. (2009) Techniques in marine environmental sciences No.46 NOVEMBER 2009 Determination of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in sediment and biota
- Wei H, Dassanayake PS & Li A. (2010). Parametric evaluation for programmable temperature vaporisation large volume injection in gas chromatographic determination of polybrominated diphenyl ethers. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 90, 535-547.
- Welch CJ, Wu N, Biba M, Hartman R, Brkovic T, Gong X, Helmy R, Schafer W, Cuff J, Pirzada Z & Zhou L. (2010). Greening analytical chromatography. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 29, 667-680.
- Wenzel KD, Hubert A, Manz M, Weissflog L, Engewald W & Schüürmann G. (1998). Accelerated solvent extraction of semivolatile organic compounds from biomonitoring samples of pine needles and mosses. *Analytical Chemistry* 70, 4827-4835.
- Westbom R, Hussen A, Megersa N, Retta N, Mathiasson L & Björklund E. (2008a). Assessment of organochlorine pesticide pollution in Upper Awash Ethiopian state farm soils using selective pressurised liquid extraction. *Chemosphere* 72, 1181-1187.
- Westbom R, Sparring S, Cederberg L, Linderoth LO & Björklund E. (2008b). Selective pressurized liquid extraction of polychlorinated biphenyls in sediment. *Analytical Sciences* 24, 531-533.
- Wetterauer B, Ricking M, Otte JC, Hallare AV, Rastall A, Erdinger L, Schwarzbauer J, Braunbeck T & Hollert H. (2012). Toxicity, dioxin-like activities, and endocrine effects of DDT metabolites-DDA, DDMU, DDMS, and DDCN. *Environmental Science and Pollution Research* 19, 403-415.
- Wheeler CM | 1946 | Control of Typhus in Italy 1943-1944 by Use of DDT. *Am J Public Health Nations Health* 36(2), 119-129. You J, Landrum PF, Lydy MJ | 2006 | Comparison... *Environ Sci Technol* 40, 6348-6353.
- Whitworth KW, Bornman RMS, Archer JI, Kudumu MO, Travlos GS, Wilson RE & Longnecker MP. (2014). Predictors of plasma DDT and DDE concentrations among women exposed to indoor residual spraying for malaria control in the South African study of women and babies (SOWB). *Environmental Health Perspectives* 122, 545-552.
- WHO (1994) INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 162 - BROMINATED DIPHENYL ETHERS
- WHO (1995) Lucha antivectorial aplicada al paludismo y a otras enfermedades O.M.S. Serie de Informes Tecnicos 857.
- WHO (2006) Position Statement. Indoor residual spraying. Use of indoor residual spraying for scaling up global malaria control and elimination.
- Wiberg K, Sparring S, Haglund P & Björklund E. (2007). Selective pressurized liquid extraction of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and dioxin-like polychlorinated biphenyls from food and feed samples. *Journal of Chromatography A* 1138, 55-64.
- Wiseman SB, Wan Y, Chang H, Zhang X, Hecker M, Jones PD & Giesy JP. (2011). Polybrominated diphenyl ethers and their hydroxylated/methoxylated analogs: Environmental sources, metabolic relationships, and relative toxicities. *Marine Pollution Bulletin* 63, 179-188.
- Wolska L. (2008). Determination (monitoring) of PAHs in surface waters: Why an operationally defined procedure is needed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391, 2647-2652.
- Wong CS, Mabury SA, Whittle DM, Backus SM, Teixeira C, Devault DS, Bronte CR & Muir DCG. (2004). Organochlorine Compounds in Lake Superior: Chiral Polychlorinated Biphenyls and Biotransformation in the Aquatic Food Web. *Environmental Science and Technology* 38, 84-92.
- Wu RSS, Chan AKY, Richardson BJ, Au DWT, Fang JKH, Lam PKS & Giesy JP. (2008). Measuring and monitoring persistent organic pollutants in the context of risk assessment. *Marine Pollution Bulletin* 57, 236-244.
- Wu SF & Ding WH. (2010). Fast determination of synthetic polycyclic musks in sewage sludge and sediments by microwave-assisted headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217, 2776-2781.
- Xiao Q, Hu B, Duan J, He M & Zu W. (2007). Analysis of PBDEs in Soil, Dust, Spiked Lake Water, and Human Serum Samples by Hollow Fiber-Liquid Phase Microextraction Combined with GC-ICP-MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 18, 1740-1748.
- Xin J, Liu X, Liu W, Jiang L, Wang J & Niu J. (2011). Production and use of DDT containing antifouling paint resulted in high DDTs residue in three paint factory sites and two shipyard sites, China. *Chemosphere* 84, 342-347.

- Xing B & Pignatello JJ. (1997). Dual-mode sorption of low-polarity compounds in glassy poly(vinyl chloride) and soil organic matter. *Environmental Science and Technology* 31, 792-799.
- Xu Y, Spurlock F, Wang Z & Gan J. (2007). Comparison of five methods for measuring sediment toxicity of hydrophobic contaminants. *Environmental Science and Technology* 41, 8394-8399.
- Xue N, Li F, Hou H & Li B. (2008). Occurrence of endocrine-disrupting pesticide residues in wetland sediments from Beijing, China. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1055-1062.
- Yang X, Wang F, Gu C & Jiang X. (2010). Tenax TA extraction to assess the bioavailability of DDTs in cotton field soils. *Journal of Hazardous Materials* 179, 676-683.
- Yang R, Wei H, Guo J & Li A. (2012). Emerging brominated flame retardants in the sediment of the Great Lakes. *Environmental Science and Technology* 46, 3119-3126.
- You J, Pehkonen S, Landrum PF & Lydy MJ. (2007). Desorption of hydrophobic compounds from laboratory-spiked sediments measured by tenax absorbent and matrix solid-phase microextraction. *Environmental Science and Technology* 41, 5672-5678.
- Zegers BN, Mets A, Van Bommel R, Minkenberg C, Hamers T, Kamstra JH, Pierce GJ & Boon JP. (2005). Levels of hexabromocyclododecane in harbor porpoises and common dolphins from western European seas, with evidence for stereoisomer-specific biotransformation by cytochrome P450. *Environmental Science and Technology* 39, 2095-2100.
- Zhang XL, Luo XJ, Liu HY, Yu LH, Chen SJ & Mai BX. (2011a). Bioaccumulation of several brominated flame retardants and dechlorane plus in waterbirds from an e-waste recycling region in south China: Associated with trophic level and diet sources. *Environmental Science and Technology* 45, 400-405.
- Zhang Z, Ohiozebau E & Rhind SM. (2011b). Simultaneous extraction and clean-up of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls from sheep liver tissue by selective pressurized liquid extraction and analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218, 1203-1209.
- Zhang Z, Rhind SM, Kerr C, Osprey M & Kyle CE. (2011c). Selective pressurized liquid extraction of estrogenic compounds in soil and analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 685, 29-35.
- Zhang Q, Liang T, Wang L & Cao H. (2012). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil samples using selective pressurized liquid extraction. *Analytical Methods* 4, 2441-2446.
- Zhang B, Li H, Wei Y & You J. (2013). Bioaccumulation kinetics of polybrominated diphenyl ethers and decabromodiphenyl ethane from field-collected sediment in the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32, 2711-2718.
- Zhao D & Pignatello JJ. (2004). Model-aided characterization of Tenax®-TA for aromatic compound uptake from water. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1592-1599.
- Zhao H, Xue X, Xu Q, Zhang F & Liang X. (2006). Gas chromatographic peak identification for polybrominated diphenyl ethers under different temperature programs. *Journal of Chromatography A* 1107, 248-256.
- Zhao G, Wang Z, Dong MH, Rao K, Luo J, Wang D, Zha J, Huang S, Xu Y & Ma M. (2008). PBBs, PBDEs, and PCBs levels in hair of residents around e-waste disassembly sites in Zhejiang Province, China, and their potential sources. *Science of the Total Environment* 397, 46-57.
- Zhou Q, Xiao J & Wang W. (2006). Using multi-walled carbon nanotubes as solid phase extraction adsorbents to determine dichlorodiphenyltrichloroethane and its metabolites at trace level in water samples by high performance liquid chromatography with UV detection. *Journal of Chromatography A* 1125, 152-158.
- Zhou P, Lin K, Zhou X, Zhang W, Huang K, Liu L, Guo J & Xu F. (2012). Distribution of polybrominated diphenyl ethers in the surface sediments of the Taihu Lake, China. *Chemosphere* 88, 1375-1382.
- Zhu C-Y, Bao P, Ba Y-X, Hua J, Liu X-N, Hou G-H, Liu C-Z & Hu Z-Y. (2013). Remediation of Dicofol Type Ddts-Contaminated Sediments by Ferrous Activated Sodium Persulfate Oxidation. *Environment and Pollution*; Vol. 2, No. 3; 2013.
- Zou MY, Ran Y, Gong J, Mai BX & Zeng EY. (2007). Polybrominated diphenyl ethers in watershed soils of the Pearl River Delta, China: Occurrence, inventory, and fate. *Environmental Science and Technology* 41, 8262-8267.
- Zuloaga O, Etxebarria N, Fernandez LA, Madariaga JM | 2001 | Comparison of some different extraction techniques for some organic pollutants in contaminated soils. *Quim Anal* 20(3), 131-137.
- Zumbado M, Goethals M, Álvarez-León EE, Luzardo OP, Cabrera F, Serra-Majem L & Domínguez-Boada L. (2005). Inadvertent exposure to organochlorine pesticides DDT and derivatives in people from the Canary Islands (Spain). *Science of the Total Environment* 339, 49-62.

ANEXO
Publicaciones adicionales

Además de los artículos científicos que sirven de eje de la memoria, el trabajo realizado dentro del período de realización de la tesis dio lugar a otras publicaciones que no han sido incluidas y algunos de cuyos resultados son mencionados en las discusiones de los capítulos 2, 3 y 4:

- *Potential chlorinated and brominated interferences on the polybrominated diphenyl ether determinations by gas chromatography-mass spectrometry*

E. Eljarrat, A. de la Cal, D. Barceló

J. Chromatogr. A (2003) 1008(2):181-192

- *Occurrence of polybrominated diphenylethers, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and biphenyls in coastal sediments from Spain*

E. Eljarrat, A. de la Cal, D. Larrazábal, B. Fabrellas, A.R. Fernández-Alba, F. Borrull, R.M. Marcé, D. Barceló

Environ. Pollut. (2005) 136(3):493-501

- *Brominated flame retardants in *Alburnus alburnus* from Cinca River Basin (Spain)*

E. Eljarrat, A. de la Cal, D. Raldúa, C. Durán, D. Barceló

Environ. Pollut. (2005) 133(3):501-508

- *Transfer of hexabromocyclododecane from industrial effluents to sediments and biota: Case study in Cinca river (Spain)*

P. Guerra, A. de la Cal, G. Marsh, D. Raldúa, C. Barata, E. Eljarrat, D. Barceló

J. Hydrol. (2009) 369: 360-367

- *Bioavailability and biodegradation of nonylphenol in sediment determined with chemical and bioanalysis*

J. de Weert J, A. de la Cal, H. van den Berg, A. Murk, A. Langenhoff, H. Rijnaarts, T. Grotenhuis

Environ. Toxicol. Chem. (2008) 27(4):778-785

- *Evaluation of two aquatic passive sampling configurations for their suitability in the analysis of estrogens in water*

M. Kuster, A. de la Cal, E. Eljarrat, M.J. López de Alda, D. Barceló

Talanta (2010) 83(2):493-499

