



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudi de plastificants en mostres d'aigua i begudes

Gabino Bolívar i Subirats

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.

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

Estudi de plastificants en mostres d'aigua i begudes

Memòria presentada per optar al títol de
Doctor per la Universitat de Barcelona
per

Gabino Bolívar i Subirats

Barcelona, setembre 2015

Dra. Silvia Lacorte i Bruguera
Professora d'Investigació
Dep. Química Ambiental
IDAEA-CSIC
Directora de Tesi

Dra. Maria Teresa Galceran i Huguet
Catedràtica d'Universitat
Dep. Química Analítica
Facultat de Química (UB)
Tutora de Tesi

La Dra. Silvia Lacorte i Bruguera, professora titular del IDAEA-CSIC, i la Dra. Maria Teresa Galceran i Huguet, catedràtica de Química Analítica de la Universitat de Barcelona,

FAN CONSTAR:

Que la present memòria titulada "**Estudi de plastificants en mostres d'aigua i begudes**" ha estat realitzada sota la nostra direcció per Gabino Bolívar i Subirats en el IDAEA-CSIC al Departament de medi ambient i que tots els resultats presentats són fruit de les experiències realitzades pel citat doctorand.

I per a que així es faci constar, expedim i firmem el present certificat.

Barcelona, setembre de 2015

Dra. Sílvia Lacorte i Bruguera

Dra. Maria Teresa Galceran i Huguet

“Ferpectament!”

Obèlix, *Els llores del Cèsar*

“Quant major és el caos, més a prop està la solució”

Arrigo Sacchi

Agraïments

En primer lloc, vull agrair a la Dra. Silvia Lacorte tot el seu suport i ajuda per desenvolupar aquest treball. A part de viure intensament la ciència i dedicar-s'hi sempre amb moltes ganes, sempre també té en compte el costat més humà del laboratori. Gràcies també a la Dra. Maria Teresa Galceran, per haver tutoritzat la tesi i pels seus consells, ja des d'abans d'entrar al CSIC.

Vull agrair a altres persones del CSIC, com el Dr. Romà Tauler, el Dr. Carlos Barata, la Dra. Cinta Porte i el Dr. Francesc Ventura, així com a Bruno Campos, Claudia Rivetti, Elisabet Pérez, Mireia Farrés i a Elba Garreta i Eva Gorrochategui, que també van passar pel laboratori de la Silvia, tots els seus ànims així com col·laboracions que han permès ampliar els coneixements d'altres matèries que d'una altra forma no hagués estat possible. Al servei d'espectrometria de masses: Roser Chaler i Dori Fanjul. També a Antoni Borrell, Rosa Boleda i Olga Jáuregui, els quals m'han sabut orientar en alguns problemes.

I sobretot a tot el laboratori i tots els membres que estan o han passat per ell, on he passat pràcticament tot el temps. Al Juan, amb qui vaig coincidir poc temps, però sempre animava, a la Joyce i el Cristian, sempre disposats a ajudar-me i a crear el millor clima de treball possible. També la Montse Cortina, cada dimarts. A l'Alejandro, que va començar una setmana més tard que jo i m'ha acompanyat fins el darrer moment, ajudant-me en el que fos. I a molts alumnes de pràctiques, com el Bruno, l'Alberto, el Ruben, l'Alba, la Clàudia, l'Allen, la Georgina, el Guillem, el Pere i la Sònia.

Als meus amics, que veig poc, però sempre m'esperen amb els braços oberts, com en Xesc a Barcelona, però també en Borja, Pau, Mateu, Vicent, Massi, Anna i

Lara, a Menorca. Pes futbols a Punta Prima, ses cerveses (que hem de fer més artesanals) i totes ses estones de show que passam junts.

I molt especialment vull dedicar la meva Tesi a la meva família. Als meus pares, que culpa del treball no me poden veure tan com voldríem: a mon pare, que siempre me das tu respaldo en todo, i a mo mare, que ha passat tanta o més pena que jo amb sa tesi. També a s'àvia, i als avis que els hi hagués fet molta il·lusió. També al Joan Carles i la Susanna que em cuiden molt a Barcelona, i al Gerard i l'Anna, amb qui hem de tornar a córrer, que no puc més de seure davant la pantalla!

Finalment, a tu Lena! Per tenir paciència aquests darrers mesos que tan he hagut d'escriure i quedar més per casa, però que també hem aprofitat per fer uns dies d'estiu brutals! Com cada dia amb tu, que em dones la força necessària i fas que em desperti amb un somriure.

Índex d'acrònims

2SBP	2-sec-butilfenol
2TBP	2-tert-butilfenol
4SBP	4-sec-butilfenol
4TBP	4-tert-butilfenol
ACN	Acetonitril
APs	Alquilfenols
ATBC	Acetil tributil citrat
BBP	Benzil butil ftalat
BPA	Bisfenol A
DBP	Dibutil ftalat
DEHA	Dietil hexil adipat
DEHP	Dietil hexil ftalat
DEP	Dietil ftalat
DMP	Dimetil ftalat
DP	Dodecilfenol
DTBP	2,6-di-tert-butilfenol
EC ₅₀	Concentració d'exposició 50
ECHA	Agència europea de substàncies químiques
EDAR	Estació depuradora d'aigua residual
EPA	Agència de Protecció Mediambiental
ESI	Ionització electrospai
eV	Electronvolt
<i>f</i>	Factor de seguretat
GC	Cromatografia de gasos
H	Constant d'Henry
HP	Heptilfenol
BP	Benzofenona
HPLC	Cromatografia de líquids d'elevada eficàcia
HRMS	Espectrometria de masses d'elevada resolució
IDL	Límit de detecció instrumental
Km	kilòmetre
Kow	Constant octanol-aigua
LC	Cromatografia de líquids
LC ₅₀	Concentració letal 50
LLE	Extracció líquid-líquid
<i>m/z</i>	Relació massa càrrega

MDL	Límit de detecció metodològic
MEC	Concentració ambiental mesurada
min	minut
MS	Espectrometria de masses
MS/MS	Espectrometria de masses en tàndem
nd	No detectat
NP	Nonilfenol
OP	Octilfenol
PAEs	Ésters d'àcid ftàlic, ftalats
QqQ	Triple quadrupol
RQ	Coefficient de risc
RSD	Desviació estàndard relativa
SPE	Extracció en fase sòlida
TAP	tert-Amylfenol
TDI	Ingesta diària tolerable
TOC	Carboni orgànic total
CP	Cumilfenol
TTBP	2,4,6-tri-tert-butilfenol
UE	Unió Europea
UHPLC	Cromatografia de líquids d'ultra elevada eficàcia
UV	Radiació ultraviolada

Índex

Resum	15
1. Introducció	21
1.1 Compostos estudiats	25
1.1.1 Ftalats	25
1.1.2 Bisfenol A.....	29
1.1.3 Benzofenona.....	30
1.1.4 Alquilfenols.....	31
1.2 Propietats fisicoquímiques	33
1.3 Impacte dels plastificants en aigües de riu	36
1.3.1 Concentracions de plastificants en rius.....	36
1.3.2 Ecotoxicitat	52
1.3.3 Legislació	56
1.4 Impacte dels plastificants en aigua potable i begudes.....	62
1.4.1 Aigua potable.....	62
1.4.2 Presència en begudes refrescants.....	69
1.4.3 Efectes tòxics	78
1.4.4 Legislació aplicable a la migració i TDI.....	80
1.5 Metodologia analítica.....	83
1.5.1 Extracció i anàlisi	84
1.5.2 Paràmetres de qualitat	94
2. Objectius.....	99
3. Desenvolupament analític.....	103
3.1 Materials i reactius	106
3.2 Caracterització per cromatografia de líquids i espectrometria de masses.....	107
3.3 Procediments d'extracció.....	116
3.3.1 Aigua de riu i potable	117
3.3.2 Paràmetres de qualitat.....	120
3.3.3 Begudes	124
3.3.4 Paràmetres de qualitat.....	125

4. Monitorització de rius.....	129
4.1 El Riu Besòs.....	131
4.1.1 Presa de mostra.....	133
4.1.2 Nivells detectats.....	138
4.1.3 Avaluació de la toxicitat.....	145
4.1.4 Estudi de risc.....	151
4.2 Potabilitzadora de Sant Joan Despí.....	155
4.2.1 Descripció i mostreig.....	156
4.2.2 Nivells detectats.....	159
5. Degradació del BPA.....	167
5.1 Condicions de fotodegradació.....	169
5.2 Identificació de fotoproductes.....	171
5.3 Resultats i discussió.....	172
6. Monitorització de begudes.....	185
6.1 Presa de mostra.....	187
6.2 Nivells detectats.....	189
6.3 Toxicitat.....	196
7. Conclusions.....	209
8. Annex.....	215
9. Bibliografia.....	255

Resum

Els plastificants són additius o monòmers dels plàstics que s'empren durant la fabricació d'aquests per modificar propietats fisicoquímiques, com la durabilitat i la flexibilitat i s'utilitzen en sectors com la indústria, la construcció i el consum. Poden arribar al medi ambient a partir de focus industrials, ja que són produïts en grans quantitats, així com per l'ús quotidià dels plàstics i abocaments d'aigües residuals. A part, degut que s'utilitzen en envasos alimentaris, poden migrar d'aquests als aliments que hi estan en contacte i aquest procés depèn de la temperatura i temps. Alguns d'ells, com el BPA, es consideren disruptors endocrins, i poden afectar el sistema hormonal dels éssers vius i suposar un risc per a la salut humana. Els objectius d'aquesta tesi van ser desenvolupar un mètode basat en la cromatografia de líquids acoblada a l'espectrometria de masses per tal d'analitzar bisfenol A, benzofenona, 12 alquilfenols (amb ramificacions de 4 a 12 carbonis), 5 ftalats (dimetil ftalat, dietil ftalat, butil benzil ftalat, dibutil ftalat i dietil hexil ftalat), acetil tributil citrat i dietil hexil adipat i optimitzar el mètode d'extracció en fase sòlida i extracció líquid-líquid. S'han estudiat aigües de riu, aigua potable i begudes refrescants. Per tal d'avaluar el risc es va estudiar la toxicitat d'aquests compostos utilitzant *Daphnia magna* com a mètode per determinar l'impacte ambiental i cèl·lules humanes de placenta cancerígenes (JEG-3) per determinar els efectes sobre la salut humana. Finalment, es va avaluar la degradabilitat del BPA, el plastificant (monòmer) més utilitzat per tal d'avaluar la seva estabilitat en el medi i identificar els fotoproductes generats i la seva toxicitat.

Es va monitoritzar el riu Besòs per tal de determinar el nivell de plastificants, degut que és un dels rius amb més impacte antropogènic a Barcelona, on rep també una forta pressió industrial al seu curs mitjà. Es va analitzar 19 punts de mostreig al llarg de tota la seva conca durant 3 mostres realitzats en diferents èpoques de l'any. Els plastificants detectats van ser el DEHP, NP, DBP, BPA, OP i BP, a nivells totals de 20000 ng L⁻¹. Pels alquilfenols, BPA i BP, la concentració va

augmentar de les capçaleres (en zones de parc natural) cap al mar, a excepció del punt proper a la desembocadura, que degut a la intrusió salina va disminuir. Els ftalats, en canvi, van tenir major presència en els trams centrals del riu, prop de les zones industrials. Pel que fa a la variació estacional, tots els plastificants es van trobar a major concentració durant el mes de novembre, a excepció del BPA, que va tenir el seu màxim al juliol. Per tal de determinar el risc ambiental dels nivells detectats, es va estudiar l'ecotoxicitat utilitzant la *D. magna* i calculant les LC_{50} per a cada plastificant. El compost més tòxic dintre els alquilfenols va ser el DP i els menys tòxics els de cadena de 4 carbonis, sent així la toxicitat directament proporcional a la llargada de la ramificació. En el cas dels ftalats, el BPA i la BP, el DEHP i el DEHA, de major pes molecular, van ser els més tòxics. Aplicant aquests valors juntament amb els nivells detectats, es va calcular el coeficient de risc. D'aquesta forma, el DEHP i el NP, malgrat tenir diferents concentracions, van produir riscos similars, superiors a 10 en alguns casos (a partir de 1 es considera risc). En segon lloc, DBP i OP van ser lleugerament tòxics en alguns punts, amb valors superiors a 1, i finalment, BPA i BP no van presentar cap tipus de risc. Per tant, s'han identificat els compostos i els trams del riu on els plastificants generen un gran impacte.

Per determinar si la presència de plastificants en rius pot representar un problema de contaminació i afectar la qualitat de l'aigua potable, es va monitoritzar el riu Llobregat a l'entrada de la potabilitzadora situada a Sant Joan Despí així com l'aigua un cop tractada. En el riu es van detectar el DEHP, BPA, DBP, NP, BP i OP, de major a menor concentració, mentre que a la sortida, la concentració de tots els compostos va disminuir, mostrant l'eficiència de la planta per eliminar-los. El BPA, OP i BP es van eliminar de forma completa, mentre que pel DEHP, el DBP i el NP, les eliminacions van ser al voltant del 80%. L'eliminació es deu a l'eficàcia dels tractaments que s'apliquen a les aigües, com pot ser la

cloració, l'exposició a llum UV i l'osmosi inversa, capaç d'interaccionar amb els analits i degradar-los.

El BPA es va escollir per realitzar un estudi de fotodegradació degut que és el monòmer més emprat en la fabricació de plàstics, especialment PVC i resines epoxi. Es van calcular les cinètiques de degradació en diferents medis, com aigua milli-Q, aigua de riu i aigua amb àcids húmics a 5 mg L^{-1} , i es va demostrar que la presència de matèria orgànica podia modificar la constant cinètica, augmentant el temps de vida mitjana del BPA. Mitjançant la tècnica LC-HRMS es van identificar 5 fotoproductes i es va avaluar la seva toxicitat aguda utilitzant *D. magna*. Els valors de LC_{50} van ser de 18 mg L^{-1} a temps 10 i 40 minuts, lleugerament més tòxics que a $t=0$ on només hi havia el BPA (LC_{50} de 21 mg L^{-1}) i això s'atribueix a l'elevada toxicitat que generen alguns fotoproductes.

Finalment, es va monitoritzar la presència de plastificants en begudes refrescants envasades en ampolles de polietilè i llaunes d'alumini per avaluar els seus nivells i els efectes a nivell de salut humana. Es van analitzar 50 mostres de begudes refrescants de diferents tipus i envasos i es van detectar el NP, el BPA i la BP en un 50, 22 i 20% de les mostres, respectivament. Les llaunes van ser l'envàs amb major presència de BPA. Els nivells detectats en les mostres es van comparar amb els valors legiscats de TDI, els quals van estar molt per sota i per tant, segons aquest criteri els nivells detectats no suposen un risc per la salut. Paral·lelament, per determinar els efectes potencials sobre la salut, es van calcular les LC_{50} dels compostos utilitzant cèl·lules humanes i mostrant que els valors estan entre 4,64 i 130 mg L^{-1} , molt inferiors als nivells de concentració de begudes.

Els resultats obtinguts demostren que els plastificants es troben de forma ubiqua al medi ambient i als rius analitzats, on algunes concentracions arriben a superar els màxims legiscats per la Unió Europea. Per altra banda, en el cas d'aigua de riu que s'utilitza pel consum humà, després dels tractaments de purificació, van

aconseguir eliminar de forma eficient la presència d'aquests compostos. En el cas de les begudes, el propi envàs pot ser causant de plastificants a través de la migració, encara que els nivells detectats estant molt per sota dels valors d'ingesta diària tolerable. Aquests compostos, degut al seu elevat ús i descàrrega continuada al medi ambient i a les seves propietats i efectes, han de ser avaluats de forma extensa per assegurar que no suposen un risc ni pel medi ambient ni per la salut humana.

1. Introducció

En els darrers anys, la presència de productes químics en àmbits tan amplis com l'alimentació i el medi ambient ha produït una creixent preocupació social i s'ha convertit en un tema d'interès analític i ambiental. Entre altres, els compostos capaços de produir alteracions al sistema endocrí dels éssers vius, coneguts com alteradors endocrins ("endocrine disruptors", EDs) són alguns pels que s'ha mostrat més interès davant la falta d'estudis, que contrasta amb l'elevat ús que es fa d'aquests compostos. La raó principal d'aquesta preocupació és l'observació d'efectes adversos que produeixen en els éssers vius, especialment pel que fa al sistema reproductor dels organismes. Hi ha molts compostos que presenten aquestes característiques, com per exemple els pesticides, herbicides, alquilfenols i plastificants i alguns medicaments, entre d'altres (Sánchez-Avila et al., 2009). Alguns d'aquests compostos han estat recentment legislat, però molts d'ells encara s'utilitzen en grans quantitats sense existir un marc legal.

Aquesta tesi es centra en l'estudi de plastificants i monòmers utilitzats en la fabricació del plàstic. Els plàstics, com el polietilè, polipropilè, clorur de polivinil, poliestirè o policarbonat, s'utilitzen en nombroses aplicacions en sectors com la indústria (automòbils, aparells elèctrics, aïllants, etc), la construcció (canonades, impermeabilitzants, escumes) i consum (joguines, caixes, fibres, tèxtils, articles esportius, mobles, etc). També s'empren en la indústria alimentària, en el processat i envasat d'aliments (Bentayeb et al., 2007; Nerlich et al., 2002). Malgrat els components d'aquests polímers estan ben caracteritzats, els additius que s'empren per convertir-los en materials adequats per a usos concrets, com l'alimentari, no ho estan. Els plastificants són additius que s'utilitzen en la fabricació del plàstic i tenen la capacitat de conferir determinades propietats al plàstic per adaptar-los a diferents àmbits d'aplicació. Dels més de 300 additius que estan descrits, els ftalats (que augmenten la flexibilitat del plàstic), els alquilfenols (estabilitzadors en determinats polímers) i la benzofenona (protector de la llum ultraviolada) han suscitat un gran interès perquè són compostos

utilitzats en grans quantitats en la indústria del plàstic i han esdevingut contaminants ambientals i alimentaris. Per altra banda, el bisfenol A no és un plastificant com a tal però també s'empra en grans quantitats com a monòmer del policarbonat i de les resines epoxi. Aquests compostos presenten activitat de disrupció endocrina (Fawell i Chipman, 2001; Guenther et al., 2002; Waring i Harris, 2005). A més, alguns ftalats poden tenir efectes tòxics en humans (Babich et al., 2004). Els EDs es caracteritzen per tenir un gran efecte biològic a molt baixes concentracions, el que pot dificultar la seva detecció en aigües així com la predicció dels possibles efectes (Céspedes et al., 2004; Kuch i Ballschmiter, 2001). Altres plastificants comuns són els adipats, trimetilats, maleats, beonzats, sulfonamides i citrats.

Es ben palès que els abocaments d'aigües residuals, urbanes i d'efluents de depuradora poden afectar la qualitat de les aigües superficials ja que són una font important de contaminants al medi. A més, la quantitat d'envasos i altres tipus d'objectes plàstics que es poden trobar als rius contribueixen a l'alliberació dels plastificants cap a l'aigua, a través del procés que s'anomena migració. Això produeix que molts plastificants o monòmers del plàstic es trobin distribuïts en tots tipus d'aigua, ja sigui al riu, al mar o a les aigües de depuradora, i poden trobar-se en les aigües de consum. Això té greus repercussions pel medi ambient ja que molts d'aquests compostos són tòxics pels organismes.

Per altra banda, l'ús de plastificants utilitzats en la fabricació d'envasos de begudes refrescants o en canonades utilitzades en la indústria de l'envàs o en el sistema de potabilització i distribució d'aigua produeix que aquests compostos es puguin detectar a l'aigua potable o en aigües envasades i begudes refrescants, ja que la majoria poden migrar dels envasos que estaran en contacte amb els aliments (Brocca et al., 2002). Per tots aquests motius, existeix un interès important per l'estudi d'aquests compostos tant en matrius ambientals com alimentàries.

1.1 Compostos estudiats

Els plastificants es defineixen com additius que s'afegeixen durant la fabricació de plàstics per tal de modificar algunes de les seves propietats fisicoquímiques i mecàniques, especialment la seva flexibilitat i durabilitat. Aquests compostos queden adherits a les cadenes polimèriques, separant els monòmers principals i creant un volum lliure, disminuint així la temperatura de transició vítria i per tant, suavitzant el plàstic, amb un increment de la flexibilitat (Maeda i Paul, 1987). Dels diversos plastificants més utilitzats en la indústria, en aquesta tesi s'estudien els ftalats i els alquilfenols, així com el bisfenol A (BPA), la benzofenona (BP), l'acetil tributil citrat (ATBC) i el dietilhexil adipat (DEHA). Excepte el BPA, tots són additius i s'utilitzen com a plastificants, antioxidants o estabilitzadors de UV. Per altra banda, el BPA és utilitzat com a monòmer en la fabricació del policarbonat i resines epoxi. A continuació es descriuen les característiques principals de cada família.

1.1.1 Ftalats

Els ftalats són ésters de l'àcid ftàlic ("acid phthalic esters" o PAEs), tal com s'observa a la Figura 1, i són una família de substàncies químiques molt emprada a la indústria, especialment en la fabricació de productes com suavitzants, adhesius, dissolvents, ajustadors de viscositat, estabilitzants, dispersants, lubricants, agents emulsionants i formadors de pel·lícules de plàstic. El seu ús principal és en el procés de síntesi dels polímers, on s'utilitza com a additiu en la fabricació del clorur de polivinil ("polivinyll chloride", o PVC) i d'altres polímers. Per les seves propietats, també s'utilitzen en pintures, tintes d'impressora, cosmètics, materials de construcció, instrumentació mèdica, detergents, joguines, ceres, tèxtils i argiles per modelar. Una altra de les aplicacions està relacionada

amb la fabricació de càpsules polimèriques de molts medicaments (Rudel i Perovich, 2009).

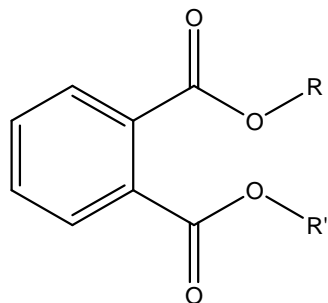


Figura 1. Estructura dels ésters d'àcid ftàlic.

En aquesta tesi s'han estudiat 5 ftalats, els quals són els utilitzats en grans quantitats i tenen un potencial tòxic elevat. Alguns estan legislats dins de normatives ambientals mentre que altres es consideren contaminants emergents per la poca informació que es disposa en relació al seu comportament mediambiental, presència en aigües de consum o begudes, toxicitat i risc potencial per a les persones.

El benzil butil ftalat (BBP) és un plastificant que normalment s'afegeix als polímers per tal de modificar propietats com la lleugeresa i la flexibilitat, especialment del PVC. També s'empra en algunes tintes utilitzades en els recobriments d'envasos alimentaris (Bolgar et al., 2008). La legislació (EU, 2011a) indica que el BBP s'utilitza com a plastificant en materials d'un sol ús i en articles en contacte amb menjars de baix contingut en greix (exceptuant aliments per infants o menjars processats amb cereals i aliments per nadons). També s'empra com un agent de suport tècnic en concentracions properes al 0,1 % en el producte final, així com en adhesius i alguns guants de vinil. Segons l'Agència Química Europea (ECHA), la seva producció està entre 1.000 i 10.000 tones anuals.

El dibutil ftalat (DBP) és emprat com a plastificant en resines i polímers, sobretot el PVC, al qual li dóna propietats com durabilitat i flexibilitat. També s'empra en tintes d'impressió, adhesius, agents segelladors, pintures de nitrocel·lulosa i fibres de vidre. En la indústria alimentària s'empra en articles en contacte amb aliments de baix contingut en greix i com un agent de suport tècnic en poliolefines a concentracions no majors de 0,05 % en el producte final. L'ECHA estableix l'ús de DBP com un polímer i plastificant industrial i la seva producció està entre 1.000 i 10.000 tones l'any.

El dietilhexil ftalat (DEHP) és un plastificant que pot ser emprat en molts productes polimèrics, sobretot en el PVC flexible i en articles en contacte amb aliments de baix contingut en greix, així com agent de suport tècnic (en un màxim de 0,1 % en el producte final). També pot ser emprat com plastificant de resines i elastòmers que s'utilitzen en aplicacions molt diverses, com xumets, joguines, cortines de dutxa, impermeables, adhesius, recobriments polimèrics, guants de vinil, etc. Una altra aplicació són els productes mèdics, com les bosses per sang i equips de diàlisi. És el plastificant de més elevada producció, ja que l'ECHA estima que es produeixen entre 100.000 i 1.000.000 tones a l'any. De tota la producció, el 90% del DEHP es destina a la fabricació del PVC.

El dietil ftalat (DEP) és emprat bàsicament com un plastificant per tal de millorar la flexibilitat plàstica, i s'utilitza en articles com raspalls de dents, peces d'automòbils, eines, joguines i material d'envàs alimentari. També s'utilitza en plàstics d'èster de cel·lulosa com el paper fotogràfic, l'envàs dels medicaments i cintes per enganxar. Altres aplicacions inclouen l'ús com a solvent de compostos volàtils en productes de cosmètica. L'ECHA xifra la seva producció entre 1.000 i 10.000 tones anuals.

El dimetil ftalat (DMP) és un compost utilitzat com a plastificant per la fabricació d'adhesius. Els isòmers del DMP (dimetil isoftalat i dimetil terftalat) també són

materials polimèrics. És el segon ftalat amb més producció de la Unió Europea, entre 10.000 i 100.000 tones a l'any. A part de la seva funció com plastificant, també s'empra com a pesticida i repel·lent d'insectes.

Per altra banda, el dietilhexil adipat (DEHA) no és un ftalat, però s'utilitza com a plastificant emprat bàsicament en la fabricació d'envasos alimentaris i en materials de construcció. Es considera un substitut del DEHP. També pot ser emprat en la formulació de plàstics, com a plastificant en la producció de PVC, acrilats, nitrocel·lulosa i productes de goma, per fabricar gomes, tintes i adhesius, i com un dissolvent en la fabricació de cosmètics. La seva producció es troba entre 10.000 i 100.000 tones a l'any, segons l'ECHA.

Per acabar, l'acetil tributil citrat (ATBC) no és pròpiament un ftalat, ja que no prové de l'àcid ftàlic, sinó de l'àcid cítric, però s'utilitza com a plastificant i darrerament també substitueix el DEHP. Les seves aplicacions més comunes són en plàstics per aplicacions mèdiques, productes en contacte amb aliments i contenidors, lubricants, compostos de cel·lulosa, així com joguines i tintes. Segons l'ECHA, la seva producció es troba entre 10.000 i 100.000 tones a l'any. Totes les estructures esmentades es poden observar a la Figura 2.

A part d'aquests ftalats, l'adipat i el citrat, existeixen molts altres derivats de l'àcid ftàlic, encara que s'utilitzen en menor mesura. Per exemple, és comú el diisonilftalat, emprat en materials de construcció, el diisodecilftalat, usat en aïllament de cables elèctrics, i el di-n-octilftalat, utilitzat en alguns explosius. Dintre dels adipats, que s'empen en objectes exposats a baixes temperatures, són comuns el dimetiladipat, el monometil adipat i el dioctil adipat. Dels citrats, el trioctilcitrat és utilitzat en algunes medicines, i l'acetil trioctil citrat, emprat en tintes d'impressió.

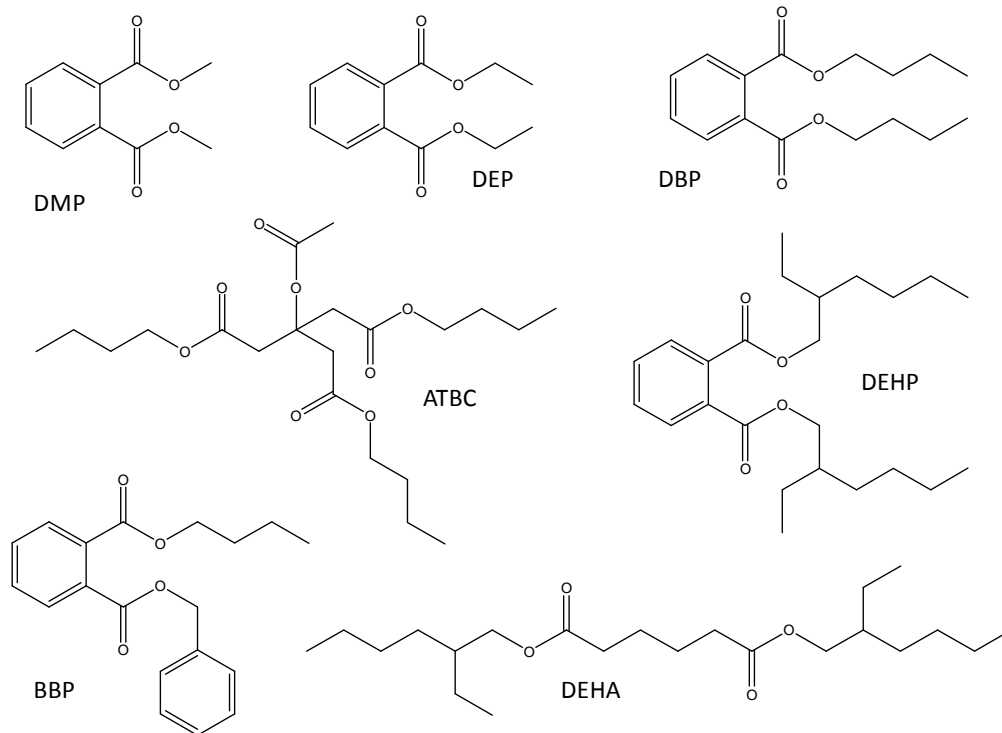


Figura 2. Estructura dels ftalats, adipat i citrat.

1.1.2 Bisfenol A

El bisfenol A (2,2-bis-(4-hidroxifenil)propà, BPA) és el compost de la família dels bisfenols més utilitzat en la síntesi de resines epoxi i plàstics policarbonats, que s'empren de forma extensa en la indústria. També s'utilitza com antioxidant en el PVC i com inhibidor de la polimerització en l'etapa final de síntesis del PVC. El BPA fou sintetitzat l'any 1905 pel científic alemany Thomas Zincke per mitjà de la reacció orgànica entre el fenol i l'acetona, i va estudiar les seves propietats físiques, composició molecular i solubilitat en diversos solvents, sense trobar-hi cap aplicació a la indústria. Cap a l'any 1953, i de forma independent, les empreses Bayer d'Alemanya i General Electric d'Estats Units, van començar a

Introducció

utilitzar-lo per a la fabricació del policarbonat, on el BPA és el compost de partida. Hi ha diverses aplicacions del BPA, com ara les ampolles d'aigua tipus "coolers" i biberons, equipaments esportius, instruments mèdics, discs compactes, recobriments d'envasos d'aliments i begudes, i alguns polímers de segelladors dentals i compòsits. La seva producció anual és la més alta dels plastificants i arriba a situar-se entre 1.000.000 i 10.000.000 tones per any, segons l'ECHA. A la Figura 3 es mostra la seva estructura.

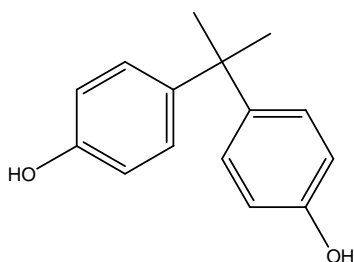


Figura 3. Estructura del bisfenol A.

1.1.3 Benzofenona

La benzofenona (BP, Figura 4) s'utilitza com un estabilitzador de llum ultraviolada (UV), que permet evitar la decoloració, el trencament i la pèrdua de propietats fisicoquímiques dels plàstics produïdes per la llum solar. És així un additiu, i es pot utilitzar també com un fotoiniciador per tintes. Permet protegir els continguts d'envasos de la llum solar, i de manera similar serveix per la fabricació d'ulleres de sol. També és emprat com un additiu en fragàncies de perfums, insecticides i productes d'agricultura, i en productes de neteja. La seva producció és de 1.000 a 10.000 tones a l'any segons l'ECHA.

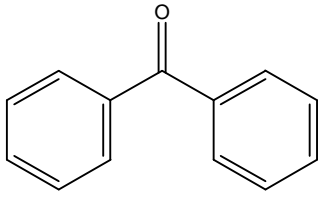


Figura 4. Estructura de la benzofenona.

1.1.4 Alquilfenols

Els alquilfenols són compostos produïts en alt volum (Cortina-Puig et al., 2014), i són bàsicament emprats com a intermediaris en la indústria química per la producció d'alquilfenols etoxilats (APEs), oximes fenòliques (per l'extracció de minerals) i resines fenòliques (plàstics). La seva estructura bàsica és un grup fenol on a l'anell hi pot haver diferents cadenes alquílques. Les més freqüents es troben en les posicions orto i para, i poden ser de 4 o més carbonis (lineals o no). També poden presentar una o més ramificacions.

En el marc d'aquesta tesi s'han estudiat els 12 alquilfenols. Els alquilfenols "para" substituïts de cadena més llarga han estat l'heptilfenol (HP), l'octilfenol (OP), el nonilfenol (NP) i el dodecilfenol (DP). Aquests compostos són emprats en fragàncies, però també en trencadors d'emulsions, biocides, surfactants, resines, tintes, estabilitzadors, lubricants i solvents, així com intermediaris en la síntesi d'antioxidants, resines fenòliques i additius d'olis. Cal indicar que el NP i l'OP han estat àmpliament estudiats degut al seu elevat ús i impacte ambiental, mentre que els altres APs de cadena curta o de cadena llarga han estat poc estudiats, malgrat ser compostos que es fan servir en grans quantitats (Cortina-Puig et al., 2014).

Els alquilfenols amb cadenes de 4 carbonis estudiats han estat el 2-sec-butilfenol (2SBP), el 2-tert-butilfenol (2TBP), el 4-sec-butilfenol (4SBP) i el 4-tert-butilfenol (4TBP), emprats en diferents aplicacions. Concretament, el 2SBP s'utilitza com un

intermediari químic en la síntesi d'insecticides, herbicides i com un inhibidor polimèric. El 2TBP és emprat com un producte d'inici per a la síntesi de fragàncies, antioxidants, insecticides i resines fenòliques. També s'han estudiat el 2,6-di-tert-butilfenol (DTBP) i el 2,4,6-tri-tert-butilfenol (TTBP). Ambdós són emprats com a antioxidants, estabilitzants, en la fabricació de PVC, poliuretà i adhesius, fluids funcionals i també com a intermedis en la fabricació de antioxidants fenòlics, estabilitzadors UV, surfactants i additius de combustibles. També s'han estudiat el para-cumilfenol (CP) i el para-tert-amilfenol (TAP). El primer té una estructura relativament similar al BPA, i s'utilitza en resines epoxi com a antioxidant i lubricant. Pel que fa al TAP, s'empra com a pesticida antimicrobià, antioxidant i com a lubricant d'olis, benzines, grasses i polímers. Es pot observar l'estructura de tots ells a la Figura 5. A l'Annex, al capítol de llibre titulat "Transformation Products of Alkylphenols", es detallen els usos, propietats i toxicitat dels APs.

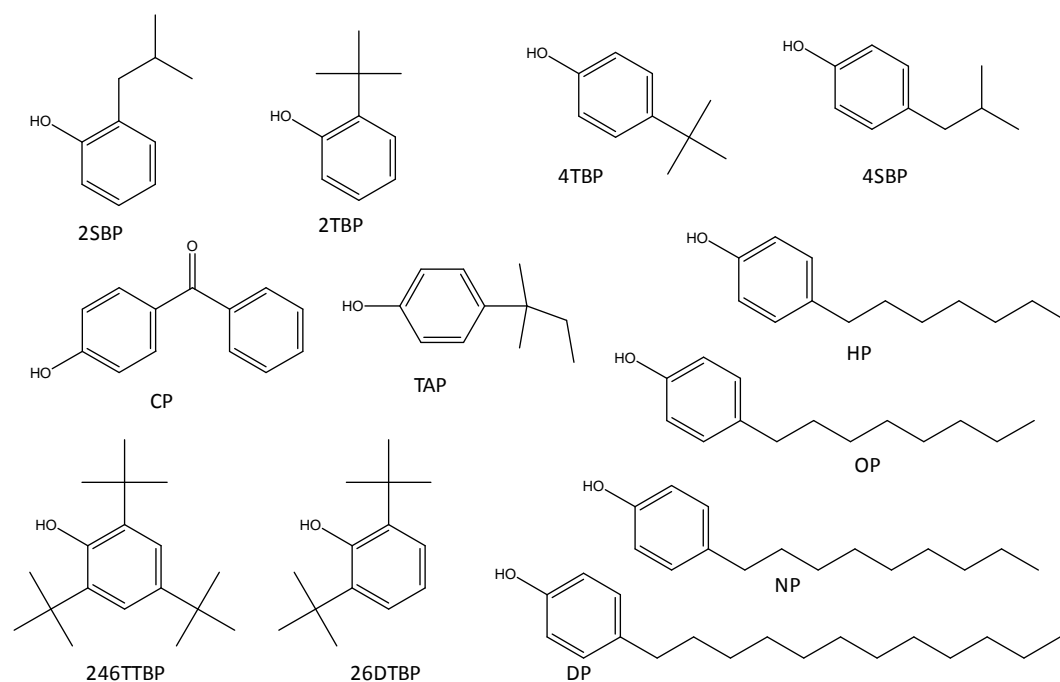


Figura 5. Estructures dels alquilfenols estudiats en aquesta tesi.

1.2 Propietats fisicoquímiques

Els compostos estudiats, el seu número CAS (Chemical Abstracts Service) i les propietats fisicoquímiques es troben resumides en la Taula 1. Es pot observar com els compostos tenen característiques molt diverses degut que pertanyen a diferents famílies químiques. Les masses moleculars dels alquilfenols oscil·len entre 150 i 262 Da, sent el DP i el TTBP els compostos amb valors més elevats. Pels ftalats, aquests valors es troben entre 194 i 391 Da. La massa més elevada correspon a l'ATBC, amb 402 Da. Per tant, tots ells es consideren microcontaminants orgànics. La solubilitat oscil·la fins a 5 ordres de magnitud. Els valors més baixos són per l'adipat i els ftalats (de 0,003 mg L⁻¹ pel DEHA a 0,285 mg L⁻¹ pel DEHP) ja que tenen poca polaritat per l'anell benzè i les cadenes alquílques ramificades. El logK_{ow} oscil·la entre 2,4 i 7,6, sent els valors més elevats els compostos menys solubles. Això implica que el DMP i el DBP es trobaran preferiblement solubilitzats en aigua mentre que els altres ftalats, el ATBC i el DEHA tindran un comportament intermedi i es podran compartimentar entre la fase particulada i dissolta del medi aquàtic. De forma similar, són aquests mateixos compostos els que tenen potencial de bioacumulació, ja que el seu valor de log K_{ow} es superior a 4,5. Això implicaria que els organismes aquàtics exposats en aigües contaminades per ftalats podrien acumular aquests compostos i produir efectes adversos. Malgrat tot, hi ha altres autors que indiquen que els ftalats es poden metabolitzar (Koch et al., 2006) i que per tant, el seu potencial d'acumulació segons el valor de K_{ow} es veuria afectat per una elevada metabolització i excreció, de manera que els nivells en teixits d'organismes serien més baixos que els que s'esperarien tenint en compte la concentració en aigua.

Els alquilfenols de cadena curta són més solubles que els ftalats degut a la seva major polaritat degut al grup hidroxil que localitza els electrons de la molècula

per la seva major electronegativitat en l'àtom d'oxigen. Els valors més elevats corresponen als butilfenols, amb solubilitats de l'ordre de 464-960 mg L⁻¹ mentre que els compostos de cadena llarga tenen valors de 0,014-168 mg L⁻¹. De forma similar als ftalats, això indica que els compostos més solubles només es trobaran de forma dissolta mentre que els altres es poden trobar adsorbits a la matèria particulada o inclòs en els sediments. D'aquí en deriva la necessitat d'analitzar tant la fase dissolta com la particulada de l'aigua. El valor de logK_{ow} dels APs augmenta a mesura que augmenta la longitud de la cadena alquílica. En el cas dels APs amb dos o tres ramificacions, el logK_{ow} és major que els corresponents a una ramificació, però sense arribar als valors dels de cadena més llarga, com és el cas del DP. Els alquilfenols amb logK_{ow} superior a 4,5, com el OP i el NP presenten propietats lipofíliques, i per tant es poden acumular en fangs, sediments i biota (Sánchez-Avila et al., 2009). Això fa que puguin presentar un risc pel medi ambient i per éssers vius al poder acumular-se al seus teixits. Respecte el pK_a, els ftalats i la benzofenona són lleugerament àcids amb valors per sota de 7,5 unitats, mentre que pels alquilfenols són més bàsics, amb valors entre 10 i 12 i el BPA té un valor al voltant de 9. Per la seva estructura, això fa que els APs, BPA i BP es trobin sense càrrega a la natura. De la mateixa forma, els ftalats, al tenir l'éster com a grup funcional, també estarien en la seva forma neutre.

Finalment, la pressió de vapor i la constant d'Henry són les propietats més variables, i estan estretament relacionades amb l'estructura molecular. Els compostos amb les constants d'Henry majors (per exemple els butilfenols) fàcilment podran volatilitzar-se cap a l'atmosfera i per tant, la seva presència en aigua es veurà afectada per la temperatura ambiental. Per altra banda, els compostos amb pesos moleculars més elevats, com el DP o el DEHA, tenen una pressió de vapor entre 2,3x10⁻⁶ i 8,5x10⁻⁷ mm Hg, respectivament, la qual cosa indica que un cop solubilitzats en aigua i no hi haurà pèrdues cap a l'atmosfera.

Taula 1. Propietats fisicoquímiques dels monòmers i plastificants estudiats

Nom compost	Abrev	Nº CAS	Fórmula molecular	Pes molecular (Da)	Solubilitat en aigua (mg L ⁻¹ , 25°C)	pK _a	logK _{ow}	Pressió de vapor (mmHg)	Constant d'Henry (atm m ³ mol ⁻¹)
Acetil tributil citrat	ATBC	77-90-7	C ₂₀ H ₃₄ O ₈	402,48	1,42E+02	4,30	6,92	5,20E-02	4,69E-12
Dimetil ftalat	DMP	131-11-3	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,18	4,00E+03	6,65	2,42	1,00E-02	1,10E-07
Dietil ftalat	DEP	84-66-2	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	222,24	1,00E+03	6,66	2,70	0,002	7,80E-07
Dibutil ftalat	DBP	84-74-2	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278,34	1,30E+01	6,66	4,83	7,00E-05	1,80E-06
Benzil butil ftalat	BBP	85-68-7	C ₁₉ H ₂₀ O ₄	312,36	7,10E-01	6,66	4,91	8,60E-06	1,30E-06
Bis(2-etil hexil) adipat	DEHA	103-23-1	C ₂₂ H ₄₂ O ₄	370,57	3,20E-03	6,73	8,10	8,50E-07	1,30E-05
Bis(2-etil hexil) ftalat	DEHP	117-81-7	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390,56	2,85E-01	6,66	7,60	1,00E-02	4,40E-05
2-sec-butilfenol	2SBP	89-72-5	C ₁₀ H ₁₄ O	150,22	4,64E+02	10,49	3,27	4,01E-02	1,71E-05
2-tert-butilfenol	2TBP	88-18-6	C ₁₀ H ₁₄ O	150,22	7,00E+02	10,64	3,31	9,00E-02	2,54E-05
4-sec-butilfenol	4SBP	99-71-8	C ₁₀ H ₁₄ O	150,22	9,60E+02	10,27	3,08	3,72E-02	2,46E-06
4-tert-butilfenol	4TBP	98-54-4	C ₁₀ H ₁₄ O	150,22	5,80E+02	10,24	3,31	3,81E-02	1,19E-06
4-tert-amilfenol	TAP	80-46-6	C ₁₁ H ₁₆ O	164,24	1,68E+02	10,23	3,91	2,00E-03	2,22E-06
4-cumilfenol	CP	599-64-4	C ₁₅ H ₁₆ O	212,29	4,33E+01	10,08	4,17	5,94E-05	1,89E-07
4-heptilfenol	HP	72624-02-3	C ₁₃ H ₂₀ O	192,30	9,65E+00	10,31	5,01	2,79E-04	7,32E-06
4-octilfenol	OP	140-66-9	C ₁₄ H ₂₂ O	206,32	3,10E+00	10,31	5,28	1,58E-03	6,89E-06
4-nonilfenol	NP	84852-15-3	C ₁₅ H ₂₄ O	220,35	4,90E+00	10,31	5,92	8,18E-04	1,11E-04
4-dodecilfenol	DP	27193-86-8	C ₁₈ H ₃₀ O	262,43	1,35E-02	10,31	7,91	2,30E-06	5,90E-05
2,6-di-tert-butilfenol	DTBP	128-39-2	C ₁₄ H ₂₂ O	206,32	2,50E+00	11,26	4,92	7,04E-03	1,97E-04
2,4,6-tri-tert-butilfenol	TTBP	732-26-3	C ₁₈ H ₃₀ O	262,43	3,50E+01	11,49	6,06	6,61E-04	1,35E-04
Benzofenona	BP	119-61-9	C ₁₃ H ₁₀ O	182,22	3,40E+02	7,46	3,18	4,00E-03	1,90E-06
Bisfenol A	BPA	80-05-7	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	228,29	8,90E+01	9,73	3,43	5,00E-06	1,00E-11

Les propietats físico-químiques indiquen que els plastificants i el BPA es trobaran preferiblement en aigua, però degut que alguns compostos tenen valors de $\log K_{ow}$ elevat, hi haurà certa tendència a acumular-se en la matèria particulada d'aquesta. Per tant, per tal de detectar la concentració total d'aquests compostos en aigua caldrà analitzar tant la fracció dissolta com la particulada. A més, degut que alguns compostos tenen pressions de vapor elevades, és possible que hi hagi pèrdues cap a l'atmosfera, tal com ho indica la constant de Henry. En aquest sentit, alguns alquilfenols, sobretot els de cadena curta, es podrien perdre per volatilització.

1.3 Impacte dels plastificants en aigües de riu

1.3.1 Concentracions de plastificants en rius

La problemàtica relacionada amb la presència de plastificants en aigües de riu no és recent, però durant molts anys s'ha centrat bàsicament en l'estudi dels alquilfenols i no ha estat fins més recentment que s'han anat determinant altres tipus de plastificants en aigües residuals, de rius o d'altres tipus, com les potables. La presència d'alquilfenols en el medi ambient es va documentar per primera vegada l'any 1984, quan es va detectar NP en fangs, aigües de riu i efluents de depuradora a Suïssa (Giger et al., 1984). Walter Giger va ser pioner en l'anàlisi d'aquests compostos orgànics a nivells traça, i va investigar com els nonilfenols etoxilats, emprats en grans quantitats com a surfactants en la indústria, podien transformar-se en NP, el qual suposava un risc per l'ecosistema aquàtic degut que era recalcitrant a qualsevol tipus de degradació. El seu treball va fer augmentar l'interès per aquests compostos, va contribuir notablement a fomentar estudis ambientals, i va establir les bases per incloure'ls en futures

legislacions. Per altra banda, la detecció de nous plastificants en rius i l'avaluació dels efectes que poden produir sobre la fauna aquàtica ha permès determinar les fonts de contaminació i dinàmica d'aquests compostos en el medi, de manera que s'han pogut prendre mesures adequades per la seva contenció.

Els plastificants i el BPA poden arribar als rius a partir de 3 fonts principals, que són: (i) el propi procés de manufactura i abocament d'aigües residuals procedents de les indústries cap a aigües superficials; (ii) l'abocament d'efluents de depuradora i (iii) la lixiviació o migració dels monòmers o additius d'objectes plàstics cap al medi. Això fa que segons les activitats industrials de cada zona o sistema de tractament de les aigües residuals es detectin aquest tipus de contaminants a nivells molts diferents.

Recentment s'ha suggerit que els alquilfenols arriben al medi principalment durant la fabricació, ús i abocament dels productes que els contenen i qualsevol tipus d'indústria és potencialment aportadora d'alquilfenols al medi (Colin et al., 2014). També poden arribar a l'aigua tant a través de descàrregues d'aigua residuals (industrials o domèstiques) no tractades com dels efluents de les depuradores, ja que no s'eliminen de forma completa en els diversos tractaments (Céspedes et al., 2006; Vogelsang et al., 2006). A part, la utilització de fangs de depuradores com a fertilitzants en sòls agrícoles poden també contaminar els rius per escorrentia (Fernández-Sanjuan et al., 2009). El BPA es detecta a valors més baixos que els APs degut que el tractament biològic de les EDARs pot degradar pràcticament de forma completa aquest compost (Mohapatra et al., 2010; Staples et al., 1998). En el riu, en canvi, la degradació és molt menor i es produeix bàsicament per l'efecte de la radiació UV (da Silva et al., 2014). Tant els ftalats com els alquilfenols no es degraden totalment durant el tractament d'aigües residuals i per tant, arriben al medi a través dels efluents de les EDARs, on el DEHP i el NP s'han identificat com els compostos més ubics a nivell global (Richardson i Ternes, 2005).

Una altra font de contaminació identificada recentment és la contaminació derivada de la presència de microplàstics a l'aigua. Els microplàstics són partícules petites de plàstic entre 1 i 5 mm que poden provenir de diverses fonts: el deteriorament de fragments de plàstic de mida més gran, l'alliberament de micropartícules a l'aigua de forma directa o després del tractament d'aigües residuals i la pèrdua accidental de matèries primeres industrials durant el transport marítim. Malgrat que la contaminació per microplàstics està relacionada en categoritzar els diferents tipus d'objectes plàstics que es troben en un ambient o ecosistema (Bolgar et al., 2008), es produeix un efecte indirecte relacionat amb la migració dels monòmers o components del plàstic cap al medi aquàtic. Malgrat tot, aquest procés ha estat poc estudiat en condicions ambientals i per tant, no es coneix la contribució dels microplàstics en els nivells de plastificants i BPA que es troben a l'aigua.

La migració es produeix pel fet que aquestes substàncies no es troben unides químicament a la matriu polimèrica i per tant, es poden desprendre amb facilitat durant l'envelliment i abrasió del plàstic. Aquest efecte s'ha constatat per als ftalats i la benzofenona i s'ha indicat que la migració tant es pot donar durant la vida útil dels plàstics als que estan units com una vegada són rebutjats (Teuten et al., 2009). També s'ha confirmat que els plàstics, com el policarbonat, poden suposar un risc ja que s'allibera el BPA cap al medi i pot ser ingerit per peixos o altres organismes (Fromme et al., 2002; Hirai et al., 2011). També s'ha documentat que les aigües de rentats en certes indústries poden arrossegar per abrasió els ftalats continguts en productes com el PVC. Aquestes aigües són directament descarregades al riu o a plantes depuradores, on tampoc s'eliminen de forma completa (Blair et al., 2009; Stales et al., 1997).

La problemàtica relacionada amb la presència de plastificants o monòmers del plàstic en el medi aquàtic és avui en dia un tema de caràcter global, que deriva de l'elevat ús d'objectes plàstics, del baix control dels abocaments industrials o

escorrenties i de la poca capacitat que tenen les EDARs per eliminar aquests compostos de les aigües residuals. Aquesta problemàtica es veu agreujada en zones altament industrialitzades o urbanitzades, on la presència de plàstics a l'aigua es quasi permanent.

A la Taula 2 es recullen els estudis més significatius que reporten la presència de plastificants en aigües de rius a nivell mundial. S'indica el riu mostrejat i país corresponent, els mètodes d'extracció i anàlisi i els compostos analitzats, amb els seus respectius nivells detectats i límits de detecció metodològics ("methodological detection limits" o MDLs). En aquest apartat es discuteixen els nivells detectats i les fonts de contaminació per tal d'il·lustrar de forma global la problemàtica que representa la presència de plastificants en rius. Per altra banda, a l'apartat 1.5, centrat en la metodologia, es discutirà de forma detallada els mètodes d'anàlisi emprats en els diferents estudis.

Les dades corresponents a la presència de plastificants i BPA de la Taula 2 posen de manifest que aquests compostos estan distribuïts de forma global i això es reflecteix en el seu elevat ús i abocament al medi. Els nivells que s'han detectat en els diversos estudis varien en funció de la zona i de les pressions antropogèniques que reben, així com de les característiques, dinàmica del riu i climatologia. Especialment, la industrialització i nivell d'urbanització d'una zona són factors clau que contribueixen en gran manera en la qualitat de les aigües de riu, tot i que hi ha altres activitats com la agricultura que també poden ser potencials fonts de contaminació per plastificants. Tenint en compte els diferents estudis, els compostos que es troben a concentracions més elevades són els ftalats, seguit dels alquilfenols i el BPA, mentre que la presència de la BP està molt poc documentada. Els diferents estudis demostren que hi ha una gran variabilitat de les concentracions detectades i que s'atribueixen bàsicament a diferències geogràfiques i temporals.

Taula 2. Nivells dels plastificants trobats a rius arreu del món, indicant mètode d'extracció i anàlisi i MDL.

Riu	Mètode d'extracció i anàlisi	Compost	Nivells (ng L ⁻¹)	MDL (ng L ⁻¹)	Referència
Ebre (Catalunya)	SPME-GC-MS	DMP	nd	26	(Peñalver et al., 2001)
		DEP	600	20	
		DBP	400	15	
		BBP	nd	2	
		DEHA	nd	6	
		DEHP	1100	15	
Yongding (Xina)	CFLME-HPLC-UV	BPA	nd	30	(Liu et al., 2003a)
Back (Maryland, USA)	SPE-HPLC-MS/MS	NP	140-200	0,2	(Loyo-Rosales et al., 2003)
		OP	<ld	0,3	
Tama (Japó)	SPE-LC-MS/MS	OP	6,9-81,9	2	(Furuichi et al., 2004)
		NP	51,6-147,0	12	
		BPA	16,5-150,2	5	
Furu, Jinzu i Itachi (Japó)	MIPE-HPLC-UV	DEHP	nd-8200	70	(Hata et al., 2004)
Tama (Japó)	SBSE-TD-GC-MS	BPA	nd-47	5	(Kawaguchi et al., 2004)
Tama (Japó)	SBSE-GC-MS	4TBP	nd	0,7	(Nakamura i Daishima, 2004)
		OP	2,5	1,2	
		HP	nd	0,5	
		NP	14,9	3,2	
		BPA	11,3	0,6	
Llobregat (Catalunya)	SPE-HPLC-MS	BPA	65-295	6,3	(Rodriguez-Mozaz et al., 2004)
Ebre (Espanya)	SBSE-LD-GC-MS	OP	20-30	5	(Brossa et al., 2005)
		BBP	160-380	20	
		DEHA	8500-14040	20	
		DBP	nd	6	
		DEP	nd	5	
		DEHP	nd	6	
Llobregat (Catalunya)	SPE-LC-MS	OP	<lq-21900	60	(Céspedes et al., 2005)
		NP	<lq-37300	70	
		BPA	<lq-2970	50	
		DEP	220-6850	10	
		DEHP	<lq-3090	70	

Riu	Mètode d'extracció i anàlisi	Compost	Nivells (ng L ⁻¹)	MDL (ng L ⁻¹)	Referència
		DBP	<lq-1300	30	
Sense especificar (Galícia)	SPME-GC-MS	DMP	28	8	(Polo et al., 2005)
		DEP	30	7	
		DBP	<lq	26	
		BBP	11	2	
		DEHP	nd	103	
Ter (Catalunya)	SPE-LC-MS	OP	<lq-3980	60	(Céspedes et al., 2006)
		NP	<lq-17500	70	
		BPA	<lq-1510	50	
		DEP	<lq-16200	10	
		DEHP	nd	70	
		DBP	<lq-2780	30	
Tama (Japó)	LPME-GC-MS	BPA	19-22	2	(Kawaguchi et al., 2006)
Glatt (Suïssa)	SPE-GC-MS	NP	68-326	12	(Voutsas et al., 2006)
		OP	6,0-22	0,51	
		BPA	9,0-76	2,1	
Saale (Alemanya)	SPE-GC-NCI-MS	NP	118-433	0,1	(Möder et al., 2007)
		BPA	42-417	0,05	
Mero (Galícia)	LLE-GC-MS	4TBP	nd	66	(Quintana et al., 2007)
		OP	nd	750	
		NP	nd	310	
		BPA	nd	228	
No especificat (Xina)	SPE-GC-MS	OP	6,2	1,5	(Yu et al., 2007)
		NP	<ld	3,3	
Tama (Japó)	LPME-GC-MS	BP	<lq	10	(Okanouchi et al., 2008)
Major Pearl (Xina)	SPE-GC-MS	NP	35-33231	0,1	(Peng et al., 2008)
		BPA	6-881	0,1	
Rin (Alemanya)	SPE-GC-MS	OP	nd-420	10	(Quednow i Püttmann, 2008)
		NP	nd-770	10	
		BPA	nd-1924	20	
Sense especificar (Galícia)	USAEME-GC-MS	DMP	158	28	(Regueiro et al., 2008)
		DEP	261	46	
		DBP	nd	125	
		BBP	nd	29	
		DEHP	nd	133	

Introducció

Riu	Mètode d'extracció i anàlisi	Compost	Nivells (ng L ⁻¹)	MDL (ng L ⁻¹)	Referència
Sena (França)	SPE-LC-MS/MS	OP	<lq-700	12	(Gasperi et al., 2009)
		NP	<lq	25	
		DEHP	<lq-14630	10	
Danubi (Àustria)	LLE-GC-MS	NP	20000-180000	100	(Micić i Hofmann, 2009)
		OP	<ld-3000	5	
Nackdong (Corea del Sud)	LLE-GC-MS	HP	nd-10	no específic	(Oh et al., 2009)
		NP	50-2050	específic	
		OP	10-340	no específic	
		4TBP	10-30	específic	
		BPA	20-890	no específic	
Pearl (Xina)	SPE-GC-MS	OP	1-312	0,3	(Zhao et al., 2009)
		NP	28,1-8890	2	
		BPA	2,2-1030	0,7	
4 rius (Catalunya)	SPE-GC-MS	BPA	43-1746	7	(Matamoros et al., 2010)
		DMP	45-248	5	
		DEP	363-2523	90	
		DBP	93-521	27	
		BBP	nd	70	
		OP	17-131	12	
Donggang (Taiwan)	SPE-HPLC-FLD	NP	nd-511	93	(Shue et al., 2010)
Atibaia (Brasil)	SPE-LC-MS/MS	OP	nd	0,1	(Sodré et al., 2010b)
		NP	nd	0,1	
		BPA	25-84	1,2	
Ogun (Nigèria)	LLE-GC-FID	DMP	nd	40170	(Adeniyi et al., 2011)
		DEP	1480000-1755000	48890	
		DBP	2025000-2705000	87520	
		DEHP	2550-4800	14610	
Babolrood (Iran)	LLE-HPLC-UV	DMP	870	220	(Hadjmohammadi et al., 2011)
		DEP	670	230	

Riu	Mètode d'extracció i anàlisi	Compost	Nivells (ng L ⁻¹)	MDL (ng L ⁻¹)	Referència
		BBP	nd	280	
		DBP	nd	300	
Rio das Velhas (Brasil)	SPE-HPLC-MS/MS	BPA	<lq-168,3	0,8	(Moreira et al., 2011)
		NP	25,9-1435,3	1,2	
		DEP	5-410	1,3	
Saale (Alemanya)	SPME-GC-MS	OP	nd-44	7,7	(Prieto et al., 2011)
		NP	nd-41	13	
		BPA	4,11-9	3,8	
Douro (Portugal)	SPE-GC-MS	OP	8,5-13,7	1,4	(Rocha et al., 2011)
		NP	10,90-13,20	0,5	
		BPA	42,80-57,06	0,1	
No especificat (Catalunya)	SPE-GC-MS/MS	DMP	2,5-8,4	0,7	(Sánchez-Avila et al., 2011)
		DEP	300-1742	0,2	
		DEHP	14-175	0,1	
		BBP	4,8-122	0,4	
		DEHA	1,9-46	0,4	
		BPA	8,4-123	1	
		OP	3,6-17	0,5	
		NP	16,3-112	1	
Liao (Xina)	SPE-GC-MS	OP	2,2-52,1	0,3	(Wang et al., 2011)
		NP	122,4-2065,7	2,1	
		BPA	12,3-755,6	0,6	
Qinghe (Xina)	MISPE-HPLC-UV	BPA	10700-63600	2,5	(Yin et al., 2011)
Odra (Polònia)	SPE-HPLC-FLD	OP	nd-40	10	(Zgola-Grzeskowiak i Grzeskowiak, 2011)
		NP	180-530	30	
Xiangjiang (Xina)	IL-CIA-DLLME-HPLC-MS	DMP	nd	680	(Zhang et al., 2011)
		DEP	nd	1050	
		BBP	nd	1360	
Wujiang (Xina)	CPE- CZE	BPA	nd	500	(Zhong et al., 2011)
Ialomita (Romania)	LLE-HPLC-FLD	OP	<lq-160	50	(Cruceru et al., 2012)
		NP	80-390	75	
Vyeekraal (Sudàfrica)	SPE-GC-MS	DMP	nd	no especificat	(Olujimi et al., 2012)

Riu	Mètode d'extracció i anàlisi	Compost	Nivells (ng L ⁻¹)	MDL (ng L ⁻¹)	Referència
		DEP	nd-1506000	no específic	
		DBP	nd-140000	no específic	
		BBP	nd-846000	no específic	
		DEHP	<lq-60000	no específic	
Leça (Portugal)	SPE-GC-MS	OP	27,0-68,3	1,4	(Rocha et al., 2012)
		NP	29,8-63,5	0,5	
		BPA	30,6-62,4	0,1	
Langat (Malàsia)	SPE-GC-MS	BPA	nd-214,5	0,39	(Santhi et al., 2012)
Redwood (Minessotta, EEUU)	SPE-GC-MS/MS	NP	nd-860	100	(Writer et al., 2012)
Ebre (Catalunya)	SPE online-LC-MS/MS	BPA	nd-61	0,11	(Gorga et al., 2013)
		NP	nd-6,5	0,013	
		OP	2,9-5,3	0,14	
Ebre (La Rioja)	MISPE-HPLC-MS	BPA	nd-101	40	(Herrero-Hernández et al., 2013)
Ave (Portugal)	SPE-GC-MS	OP	0,6-4,4	1,4	(Rocha et al., 2013)
		NP	59,0-154,9	0,5	
		BPA	7,9-521,8	0,1	
Xiaojiahe (Xina)	SPE (grafè)-GC-MS	DMP	nd	2000	(Wu et al., 2013)
		DEP	nd-4000	2000	
		DBP	10000-61000	2000	
		BBP	nd	2000	
		DEHP	4000-32000	2000	
Jarama i Manzanares (Madrid)	SPE-GC-MS	DMP	nd	10	(Domínguez-Morueco et al., 2014)
		DEP	nd	330	
		DEHP	nd	460	
		BBP	nd	190	
		DBP	<lq-1759	230	
Krka (Eslovènia)	SPE-GC-MS	BP	30-190	1,9	(Kotnik et al., 2014)
Kunming (Xina)	CPE-HPLC-UV	BPA	nd-350	290	(Li et al., 2014b)
Mondego (Portugal)	SPE-GC-MS	OP	0,7-1279	1,4	(Rocha et al., 2014)

Riu	Mètode d'extracció i anàlisi	Compost	Nivells (ng L ⁻¹)	MDL (ng L ⁻¹)	Referència
		NP	21-2770	0,5	
		BPA	8,5-185	0,1	
Vistula (Polònia)	SPE-LC-MS/MS	BPA	10,3-67,7	1,5	(Staniszewska et al., 2014)
		OP	<ld-43,1	1,5	
		NP	4,1-172,1	1,2	
Riu Groc (Xina)	SA-DLLME-HPLC-UV	DMP	nd-1250	40	(Xue et al., 2014)
		DEP	nd-1100	60	
		DBP	nd-1630	60	
		BBP	nd	60	
		DEHP	nd-2460	120	
Bourbre i Bion (França)	SPE online-HPLC-MS/MS	OP	<LQ	0,15	(Camilleri et al., 2015)
		NP	<LQ	0,36	
		BPA	nd	0,06	
Danubi (Hongria)	SPE-GC-MS/MS	NP	28,8-31,1	4	(Faludi et al., 2015)
		OP	nd	2	
		BPA	<lq-14,7	2	

CFLME: “Coupled continuous flow liquid membrane extraction”, extracció de membrana acoblada a líquid en flux continu. MIPE: “Micro-organic Ion-associate Phase Extraction”, extracció en fase associada a ions microorgànics. SBSE-LD: “stir bar sorptive extraction-liquid desorption”, extracció per barra giratòria amb líquid de desorció. LPME: “liquid phase micro extraction”, microextracció en fase líquida. USAEME: “ultrasound assisted emulsification micro extraction”, microextracció per emulsió assistida per ultrasons. CPE: “cloud point extraction”, extracció de punt de cobriment. MISPE: “imprinted polymer as a selective sorbent extraction”, extracció per polímer imprès com a sorbent selectiu. A-DLLME: “salt assisted dispersive LLME”, microextracció líquid-líquid dispersiva assistida per sals.

Les zones amb poc impacte coincideixen en ser llocs relativament allunyats de qualsevol activitat antropogènica. Per exemple, Camilleri et al. (Camilleri et al., 2015) no van detectar el NP, OP i BPA als rius Bourbre i Bion, afluents del Roine situats a la zona oest dels Alps, on la pressió antropogènica és molt baixa ja que recorren per parcs naturals protegits. De forma similar, Liu et al. (Liu et al., 2003b) no van detectar el BPA a la capçalera del riu Yondgding en un entorn

relativament net de la Xina, malgrat que la conca mitja i baixa d'aquest riu rep una elevada pressió antropogènica. A Galícia, a les aigües de la capçalera del riu Mero (Quintana et al., 2007), en una zona allunyada de pressions antropogèniques, no es van detectar BPA, NP, OP i 4TBP. Aquestes aigües es potabilitzen i s'envien a la xarxa de distribució gallega i per tant, és important garantir la seva qualitat. De forma similar, Zhang et al. (Zhang et al., 2011) no van detectar el DMP, DEP i DBP en el curs alt de rius de la costa nord xinesa, mentre que el BPA tampoc va ser detectat al riu Wujiang (Zhong et al., 2011). En aquests dos estudis, els MDL van ser molt elevats, en el cas del BBP va arribar a 1360 ng L^{-1} , i potser aquesta és la raó per la qual els compostos esmentats no van ser detectats. Aquests estudis demostren que zones protegides o allunyades de focus de contaminació no es veuen impactades per la presència de plastificants. Per altra banda, la BP no es va detectar al riu Tama, a l'oest de Tòquio malgrat ser una zona on hi viuen 5 milions d'habitants i hi ha 9 plantes de tractament d'aigua, i es va atribuir a la degradació ràpida d'aquest compost en condicions ambientals (Okanouchi et al., 2008).

En altres estudis, els plastificants s'han detectat a concentracions baixes, que considerem les que oscil·len entre el límit de quantificació i 100 ng L^{-1} , límit general que fixa la Directiva 2008/105/CE com a valor de qualitat ambiental per a molts compostos. En general, aquests nivells es troben en rius que flueixen per zones amb densitats de població mitjanes, on reben els efluent de les plantes de tractaments d'aigua i on hi ha una certa activitat industrial (Faludi et al., 2015; Gorga et al., 2013; Liao i Kannan, 2014; Polo et al., 2005; Prieto et al., 2011; Sodrè et al., 2010b; Yu et al., 2007A). A l'Ebre (Gorga et al., 2013) es van detectar el BPA, NP i OP a concentracions de fins 61, 6,5 i 5,3 ng L^{-1} , respectivament, nivells relativament baixos ja que la zona d'estudi, al curs mitjà del riu, estava situada lluny de polígons industrials i de les principals ciutats de la conca. A més, l'Ebre és un riu que té un cabal elevat i per tant, els contaminants es dilueixen de manera

que són més baixos que en rius de cabals més petits. Aquest fenomen s'ha constatat per altres tipus de contaminants de l'Ebre (Navarro et al., 2011). En una zona agrícola del nord de Galícia (Espanya), Polo et al. (Polo et al., 2005) van detectar el DMP a 28 ng L⁻¹, DEP a 30 ng L⁻¹ i BBP a 11 ng L⁻¹, però no van detectar ni el DBP ni el DEHP en aigües superficials de la zona. Al riu Saale, un afluent de l'Elba a Alemanya situat en una zona centrada en l'agricultura, es van detectar l'OP, NP i BPA a 44, 41 i 9 ng L⁻¹, respectivament (Prieto et al., 2011). Es van detectar concentracions similars al riu Atibaia, a Brasil, on Sodr  et al. (Sodr  et al., 2010b) van detectar el BPA a concentracions entre 25 i 84 ng L⁻¹ i ho atribueixen als abocaments d'aigües residuals, mentre que el NP i el OP no es van detectar. Rocha et al. van estudiar dos rius de Portugal, el Douro (Rocha et al., 2011) i el Leça (Rocha et al., 2012) situats al voltant de la ciutat d'Oporto. S'hi va detectar BPA, NP i OP a nivells similars i la seva presència s'atribueix bàsicament a la pressió poblacional, ja que els punts de mostreig es van situar lluny de polígons industrials.

Les zones amb elevades pressions, tals com poblacions de 100.000 habitants al llarg de la conca es caracteritzen per detectar-s'hi concentracions de plastificants de l'ordre de 100 a 1000 ng L⁻¹ (Kotnik et al., 2014; Loyo-Rosales et al., 2003; Regueiro et al., 2008; Staniszewska et al., 2014; Voutsas et al., 2006). Loyo-Rosales et al. (Loyo-Rosales et al., 2003) van analitzar el riu Back, als Estats Units, i van detectar NP a 200 ng L⁻¹ mentre que l'OP no es va detectar. Les mostres es van agafar al llarg de tota la conca, i a la desembocadura és on es van trobar les concentracions més elevades, a prop de la ciutat de Baltimore. Staniszewska et al. (Staniszewska et al., 2014) van analitzar el riu Vístula, a Polònia, un dels més llargs d'Europa, i van detectar BPA, OP i NP a concentracions de 68, 43 i 172 ng L⁻¹, respectivament. Aquest riu, malgrat tenir grans ciutats al llarg de la seva conca, com Varsòvia i Cracòvia, no té una presència industrial especialment elevada, i el riu està en molt bon estat de conservació gràcies a les nombroses depuradores

instal·lades al llarg del riu. En el cas del riu Glatt, un afluent del Rin que passa per Suïssa, Voutsas et al. (Voutsas et al., 2006) van detectar NP, OP i BPA a concentracions de 326, 22 i 76 ng L⁻¹, respectivament. La presència d'aquests plastificants s'atribueix a la proximitat de la ciutat de Zurich i a la indústria en menor mesura. Al riu Krka (Eslovènia), la BP es va detectar a un màxim de 190 ng L⁻¹ (Kotnik et al., 2014) i s'atribueix a que el riu és una zona de banyistes durant la temporada d'estiu i podria provenir de les cremes de protecció utilitzades per aquests. Les activitats industrials també constitueixen una font important de plastificants en el riu, tal i com s'ha constatat en el curs mitjà del riu Ebre a Espanya (Herrero-Hernández et al., 2013) on es va detectar BPA a una concentració de 101 ng L⁻¹. A Donggang, a Taiwan (Shue et al., 2010) es va detectar el NP a nivells de 511 ng L⁻¹ i al riu Ave a Portugal (Rocha et al., 2013) es van detectar l'OP, NP i BPA a concentracions de 4,4, 155 i 522 ng L⁻¹, respectivament, pels abocaments d'aigües residuals. El riu Yongding, en un suburbi de Beijing (Liu et al., 2003a) i el riu Ialomita (Cruceru et al., 2012), que travessa més de 30 ciutats a Romania són també exemples de rius que malgrat tenir un fort impacte urbà, les concentracions van estar per sota dels 1000 ng L⁻¹, gràcies a la presència de nombroses depuradores al llarg de la conca. Cal destacar també el cas del riu Llobregat (Rodríguez-Mozaz et al., 2004), que degut a l'elevada densitat urbana i industrial al llarg de la seva conca, els nivells del BPA van ser de fins 295 ng L⁻¹.

Les concentracions elevades de plastificants (entre 1000 i 10000 ng L⁻¹) s'atribueixen a zones amb una elevada densitat de població i un gran impacte industrial (Hata et al., 2004; Matamoros et al., 2010; Moreira et al., 2011; Peñalver et al., 2001; Rocha et al., 2014; Sánchez-Avila et al., 2011). Hata et al. van detectar DEHP una concentració de 8200 ng L⁻¹ al riu Furu (Japó), molt a prop de la badia de Tòquio, en una aglomeració urbana molt important. Moreira et al. (Moreira et al., 2011) van analitzar el riu das Velhas (a Brasil) i van detectar el

BPA, NP i DEP a 168, 1435 i 410 ng L⁻¹, respectivament. Aquestes concentracions s'atribueixen a l'elevada densitat urbana i una indústria dedicada al ciment i la cal, així com la falta de suficients plantes de tractament d'aigües residuals. En el cas del riu Mondego, a Portugal, Rocha et al. (Rocha et al., 2014) van detectar l'OP, NP i BPA a 1279, 2770 i 185 ng L⁻¹, respectivament. Aquest passa prop de la ciutat d'Oporto i té una important pressió antropogènica, especialment deguda a una indústria de base molt diversificada. A Espanya, els rius Manzanares i Jarama (Domínguez-Morueco et al., 2014) estan situats a la zona més densament poblada de l'estat i en una zona molt industrialitzada. Es va detectar DBP a 1759 ng L⁻¹, malgrat que no es van detectar el DMP, DEP, DEHP ni BBP. Aquests rius s'utilitzen com a font d'aigua potable i per tant, la presència de plastificants pot tenir greus repercussions sobre la qualitat de l'aigua de distribució. La conca del riu Rin és una zona amb un número d'habitants molt elevat i que travessa ciutats on el sector industrial és la base de l'economia, com la metal·lúrgia, encara que també l'especialitzada en béns de consum (Quednow i Püttmann, 2008). Es van detectar l'OP i el NP, al voltant de 500 ng L⁻¹, i BPA a 1924 ng L⁻¹. Finalment, a Àsia es troben les conques dels rius més densament poblats, com són el riu Pearl (Zhao et al., 2009), el riu Groc (Xue et al., 2014) i el riu Liao (Wang et al., 2011), el qual té 35 milions d'habitants a la seva conca i on es van detectar concentracions elevades de NP, de 2065 ng L⁻¹. De forma similar, el riu Nackdong, a Corea del Sud (Oh et al., 2009), el més llarg del país i on el sector industrial és molt destacat i variat, centrat en activitats com la química i petroquímica, elèctrica i metal·lúrgica, presenta una de les zones més contaminades per alquilfenols, amb concentracions de fins 2050 ng L⁻¹ pel NP, 340 ng L⁻¹ per l'OP, 30 ng L⁻¹ pel 4TBP i 10 ng L⁻¹ per l'HP, així com de BPA a 890 ng L⁻¹. Una segona causa de contaminació s'atribueix a la presència de diversos complexos turístics ubicats a les parts altes del riu (Oh et al., 2009).

Per acabar, cal esmentar que els rius amb una concentració de plastificants i BPA majors de 10000 ng L^{-1} coincideixen en zones on la densitat de població és molt elevada (Gasperi et al., 2009; Peng et al., 2008; Wu et al., 2013) però no sempre hi ha una activitat industrial gran (Yin et al., 2011). Aquest fet fa pensar que l'abocament d'aigües residuals urbanes pot constituir una important font de contaminació dels rius, que pot superar la contribució produïda pels abocaments industrials. A Catalunya, durant la dècada dels 2000, es van detectar plastificants a l'Ebre (Brossa et al., 2005), al Llobregat (Céspedes et al., 2005) i al Ter (Céspedes et al., 2006). Tant l'Ebre com el Llobregat són conques densament poblades de Catalunya, tenen una important activitat industrial i les seves aigües estan molt explotades tant pel consum i la irrigació com per les hidroelèctriques instal·lades. En canvi, el Ter transcorre per una zona més agrícola i ramadera, activitats que poden també contribuir a la contaminació dels rius, ja que els APs es poden utilitzar com a coadjuvants en la formulació de molts plaguicides (Cortina-Puig et al., 2014).

Els nivells més elevats s'han descrit en el riu Danubi (Micić i Hofmann, 2009), on es va detectar el NP a una concentració propera als $200.000 \text{ ng L}^{-1}$ al curs mitjà del riu. S'ha de considerar que al llarg de la seva conca es distribueixen de forma irregular 81 milions d'habitants, una de les xifres més elevades a Europa. Aquest riu, a diferència de la resta citats abans, té pressió industrial molt elevada, sobretot del sector de la hidroelèctrica, a part d'un impacte turístic important. Fora d'Europa, els rius Vyeekrall (Olujimi et al., 2012) a Sud-àfrica i Ogun (Adeniyi et al., 2011) a Nigèria, van superar el nivell de 1 mg L^{-1} . Ambdós casos són similars, ja que són zones amb una població és molt elevada, i malgrat l'activitat industrial no és especialment important, hi ha un sector agrícola molt desenvolupat i al llarg de les seves conques es troben abocadors i nombroses plantes de tractament. Per tant, les zones altament contaminades constitueixen zones amb una gran pressió industrial i urbana i amb poc control de la

contaminació a nivell d'abocaments alliberats al medi. Cal dir, però, que a nivell d'Europa hi ha una gran diferència entre les concentracions detectades durant la dècada del 2000 amb les detectades actualment i a més, rarament es descriuen masses d'aigua amb nivells molt elevats de plastificants, la qual cosa indica l'efectivitat de les regulacions europees en relació a l'ús de plastificants i a les mesures adoptades per prevenir i controlar la qualitat de les aigües dels rius.

Tal com s'observa a la Taula 2, els alquilfenols més àmpliament estudiats són el NP i el OP. Això és degut que aquests compostos van ser utilitzats en grans quantitats en moltes aplicacions industrials i durant la dècada dels 80 i 90 van esdevenir contaminants del medi aquàtic amb grans implicacions mediambientals degut al seu caràcter estrogènic. De la resta d'alquilfenols, rarament s'han detectat o estudiat en rius. Es desconeix la raó per la qual els alquilfenols de cadena curta o llarga no han rebut gaire atenció analítica o ambiental. S'ha trobat molt poca informació en relació als usos específics d'aquests compostos i per tant, la bibliografia no indica quines són les potencials fonts de contaminació. L'HP (Nakamura i Daishima, 2004) es va detectar en el riu Krka (Eslovènia) a nivells de 30 ng L^{-1} , encara que la seva presència no s'atribueix a cap efecte en concret més que al seu ús en aplicacions similars al NP. El 4TBP, per altra banda, no ha estat detectat en rius i s'atribueix possiblement a la seva elevada volatilitat i al menor ús respecte els altres alquilfenols (Kotnik et al., 2014; Quintana et al., 2007). La poca informació publicada respecte els alquilfenols diferents a l'OP i NP contrasta amb l'elevat consum d'aquests compostos. Per aquesta raó, un dels objectius d'aquesta tesi és desenvolupar un mètode que permeti detectar aquests compostos i estudiar la seva presència i impacte en el medi.

La presència de plastificants en rius té greus conseqüències per al medi ambient i l'home, ja que alguns d'aquests rius són emprats per produir aigua potable, com el Saale a Alemanya (Möder et al., 2007), el Langat a Malàisia (Santhi et al., 2012) o el Llobregat a Catalunya (Rodríguez-Mozaz et al., 2004) i d'altres s'utilitzen com

aigua de reg per l'agricultura, com el Babolrood a Iran (Hadjmohammadi et al., 2011) i l'Ódra a Polònia (Zgola-Grzeškowiak i Grzeškowiak, 2011) o el Ter a Catalunya (Matamoros et al., 2010). En el cas del riu Redwood als Estats Units, l'ús de l'aigua en el sector primari pot arribar fins al 67% (Writer et al., 2012) i una concentració elevada de plastificants podria afectar els productes agrícoles així com l'aigua de consum del sector ramader.

1.3.2 Ecotoxicitat

Molts dels plastificants estudiats en aquesta tesi presenten un possible risc per al medi ambient, i poden afectar els organismes aquàtics presents als rius. La majoria tenen propietats de disruptors endocrins, és a dir, són substàncies que poden alterar l'equilibri hormonal (sistema endocrí) d'una espècie (WHO, 2001). Així, processos fisiològics que són controlats per hormones poden ser interromputs, o generar respostes de major o menor intensitat que l'habitual. Els ftalats, per exemple, són compostos tòxics (Jobling et al., 1995) i encara que alguns d'ells es degraden amb facilitat, són alliberats a concentracions elevades i de forma continuada al medi i poden causar un impacte important a llarg termini. Per altra banda, el BPA a baixes dosis pot alterar l'estructura química del cervell i el comportament, l'activitat enzimàtica, el sistema immunològic i el sistema reproductiu de peixos i mamífers (vom Saal i Hughes, 2005).

Per estudiar l'ecotoxicitat dels plastificants en aigua dolça s'ha emprat organismes model que permeten simular els efectes dels contaminants en organismes de diferents nivells de la cadena tròfica. Normalment es calcula la concentració màxima efectiva al 50% de la població amb la qual s'experimenta (EC_{50}), que es refereix a la concentració d'un compost químic que indueix una resposta al 50% d'un grup d'organismes durant un temps d'exposició determinat. Una de les respostes més estudiades és la mortalitat, i en aquest cas, les EC_{50} són

referides com a concentracions letals (LC_{50}). Com més petit és aquest valor, menor és la quantitat de compost necessària per produir un efecte, i per tant, la toxicitat és major.

En molts estudis s'utilitzen microorganismes tals com la *Pseudomonas putida* (Fabig, 1988) i la *Pseudomonas fluorescens* (Stone i Watkinson, 1983) per avaluar la toxicitat aguda d'un compost a partir de la inhibició de la fluorescència i s'aplica bàsicament per analitzar aigües amb nivells elevats de contaminants, com per exemple, aigües d'origen industrial. La toxicitat en *Pseudomonas aeruginosa* i *Photobacterium phosphoreum* va ser estudiada per ftalats com el DMP, DEP, DBP, BBP i DEHP, i es va indicar que aquests compostos eren tòxics a concentracions per sota de 500 μM (Staples et al., 1997). Les algues són uns altres organismes utilitzats freqüentment ja que són organismes ubics en molts ecosistemes d'aigua dolça. El BPA s'ha estudiat en l'espècie *Selenastrum capricornutum* (Alexander et al., 1988; Stephenson, 1983) i en ambdós estudis, es va observar com aquest compost afectava a la mortalitat de les algues amb una LC_{50} a 96 hores de 2,7 mg L^{-1} .

Per avaluar la toxicitat dels plastificants, Staples et al. (Staples et al., 1998) descriu en un review les diferents espècies on estudiar-los, així com els tipus de test a realitzar. Per estudiar els efectes dels contaminants en els organismes aquàtics que es troben a nivell més alt de la cadena tròfica, és comú el treball amb peixos. Algunes de les espècies més emprades són l'*Oncorhynchus mykiss* (Lysak i Marcinek, 1972) i el *Pimephales promelas* (Alexander et al., 1988). En aquests casos, l'exposició al contaminant s'estudia amb un mínim de 96 hores, però degut a la resistència dels peixos, els tests poden arribar a ser de diverses setmanes de duració, especialment els test crònics, com un estudi realitzat en *Oncorhynchus mykiss* durant 90 dies exposades a DEHP (Defoe et al., 1990).

De tots els mètodes per avaluar la toxicitat, destaquen els realitzats amb *Daphnia magna* ja que aporten informació sobre un gran nombre de contaminants ambientals, entre ells els plastificants i el BPA. La *Daphnia magna* és un dels més representatius i usats en toxicologia per determinar els efectes dels contaminants orgànics en els sistemes aquàtics (Alexander et al., 1988; Hendrics et al., 1994; Stephenson, 1983) ja que és fàcil de cultivar, els resultats són molt reproduïbles, la prova és ràpida i és una espècie molt sensible a la contaminació. A més, la *Daphnia* pot expressar els efectes dels contaminants a diferents nivells, des d'efectes aguts, és a dir, mortalitat, a efectes més a llarg termini a nivell genòmic, metabòlic o reproductiu (Campos et al., 2012). A la Taula 3 es recullen els valors d'EC₅₀ per diferents plastificants utilitzant *Daphnia magna* com a organisme model.

La toxicitat del BPA, el NP i els ftalats ha estat àmpliament estudiada i malgrat que diferents condicions d'anàlisi aporten diferents concentracions, tots els estudis coincideixen que aquests compostos produeixen efectes tòxics en la *Daphnia magna*. Pel que fa als ftalats, s'observa que el DBP, el DEHA i el DEHP són els més tòxics. Les seves estructures tenen les ramificacions amb un elevat nombre de carbonis i amb valors de logK_{ow} més elevats de tots els ftalats, superiors a 4,8 unitats, que fa que siguin fàcilment acumulables en els organismes. Per altra banda, els ftalats com el DEP i el DMP, que tenen cadenes més curtes, tenen una toxicitat menor. El BBP també té baixa toxicitat. En aquest cas, la presència d'un grup benzè a la ramificació podria augmentar els impediments estèrics, i així, fent més difícil llur biodisponibilitat en els organismes. Pel que fa als alquilfenols, també s'observa una tendència respecte les cadenes alquílques: a mesura que aquestes augmenten la seva longitud, la toxicitat és més elevada en comparació amb els compostos de cadenes de longitud menor. El 2SBP, 2TBP, 4SBP i 4TBP tenen un logK_{ow} baix comparat amb

NP, i per tant, tenen poca tendència a acumular-se i són els alquilfenols menys tòxics.

Taula 3. Valors de LC₅₀ per *Daphnia magna* dels plastificants.

Compost	Test	mg L ⁻¹	µM	Referència
ATBC	LC ₅₀ 96h	59	146,6	(EPA, 2003)
	LC ₅₀ 96h	60	149,1	(EPA, 2003)
	LC ₅₀ 24h	2,8	7	(EPA, 2003)
DMP	LC ₅₀ 24h	150	772,5	(ECB, 2000)
	LC ₅₀ 96h	185	952,7	(ECB, 2000)
	LC ₅₀ 96h	40	206	(Verschueren, 1996)
	LC ₅₀ 96h	65	334,7	(Verschueren, 1996)
	LC ₅₀ 48h	33	169,9	(LeBlanc, 1980)
DEP	LC ₅₀ 48h	52	234	(LeBlanc, 1980)
	LC ₅₀ 48h	56	252	(Zou i Fingerman, 1997)
DBP	LC ₅₀ 24h	17	61,1	(Kuehn, 1989)
	LC ₅₀ 48h	5,2	18,7	(ECB, 2000)
	LC ₅₀ 48h	3	10,8	(Adams, 1995)
BBP	LC ₅₀ 24h	460	1472,7	(LeBlanc, 1980)
	LC ₅₀ 48h	92	294,5	(LeBlanc, 1980)
DEHA	LC ₅₀ 48h	1,6	4,3	(EPA, 2003)
DEHP	LC ₅₀ 24h	68	350,2	(LeBlanc, 1980)
	LC ₅₀ 48h	11	28,2	(LeBlanc, 1980)
	LC ₅₀ 48h	5	12,8	(Montsanto, 1980)
	LC ₅₀ 24h	9,5	24,3	(Adams, 1995)
2SBP	LC ₅₀ 48h	1,5	10	(EPA, 2003)
2TBP	LC ₅₀ 48h	1,4	9,3	(EPA, 2003)
4SBP	LC ₅₀ 48h	1,9	12,6	(EPA, 2003)
4TBP	LC ₅₀ 48h	6,7	44,6	(EPA, 2003)
TAP	LC ₅₀ 48h	0,8	4,9	(EPA, 2003)
CP	LC ₅₀ 48h	0,7	3,3	(EPA, 2003)
HP	LC ₅₀ 48h	0,6	3,2	(EPA, 2003)
OP	LC ₅₀ 48h	0,3	1,3	(EPA, 2003)
NP	LC ₅₀ 48h	< 1	< 4,5	(Bringmann i Kuehn, 1982)
	LC ₅₀ 48h	0,1	0,6	(EPA, 2003)
DP	LC ₅₀ 48h	0,1	0,3	(EPA, 2003)
DTBP	LC ₅₀ 48h	0,5	2,2	(EPA, 2003)
TTBP	LC ₅₀ 48h	0,1	0,3	(EPA, 2003)
BP	LC ₅₀ 24h	0,3	1,5	(EPA, 2003)
BPA	LC ₅₀ 48h	3,9	17,1	(EPA, 2003)
	LC ₅₀ 48h	10	43,8	(Alexander et al., 1988)
	LC ₅₀ 48h	3,9	17,1	(Stephenson, 1983)
	LC ₅₀ 48h	20	87,6	(Hendrics et al., 1994)

La BP i el BPA són més tòxics del que es podria esperar per la seva estructura molecular, ja que no disposen de ramificacions, i els valors de $\log K_{ow}$ inferiors a 4,5 indiquen que tenen poca afinitat per acumular-se en la *D. magna*. Malgrat tot, es produeixen efectes en els organismes tal com indiquen els valors d'EC₅₀ de l'ordre de mg L⁻¹ o µg L⁻¹.

Els valors d'EC₅₀ obtinguts amb *Daphnia magna* serveixen com una primera aproximació per determinar les concentracions que els plastificants podrien produir efectes en els organismes aquàtics, però cal tenir en compte que es poden produir efectes sinèrgics o acumulatius. A més, els estudis de toxicitat realitzats en condicions de laboratori no són totalment extrapolables al medi ambient, la qual cosa indica que per determinar l'impacte ambiental, cal tenir en compte les concentracions detectades d'un gran nombre de compostos i els efectes additiu que poden ocasionar (Cristale et al., 2013). Una bona aproximació per determinar l'impacte que produeixen els plastificants en el medi aquàtic és determinar el risc que comporta la seva presència, tenint en compte els valors de concentració detectats en una zona determinada i els valors d'EC₅₀ publicats a la bibliografia, o en el seu defecte, calculats. Aquesta aproximació ha estat utilitzada per determinar el risc de contaminants prioritari (Sánchez-Ávila et al., 2011).

1.3.3 Legislació

Per tal de controlar la qualitat de les aigües superficials en relació a la presència de contaminants s'ha regulat l'ús i abocament al medi de molts compostos químics. Les mesures de control de la qualitat de les aigües depenen de cada país, i poden ser més o menys estrictes segons els estàndards mediambientals i les condicions sociopolítiques i econòmiques de cada zona.

Una de les primeres lleis ambientals publicades és la Llei d'aigua neta (*Clean Water Act*) de l'any 1972, dels Estats Units. Aquesta és la principal llei federal del

país que regula la contaminació d'aigües superficials, establint instruments legals i econòmics per tal de reduir les descàrregues directes de contaminants a les masses d'aigua. En el marc d'aquesta llei, es troben els Criteris de Qualitat de l'Aigua, que determinen els nivells màxim de concentració per 120 contaminants prioritaris i 47 no prioritaris en aigües dolces i salades. En aquesta llei, els alquilfenols no estan regulats, però si hi estan reflectits els ftalats. Els compostos inclosos són el DEHP, el DEP, el BBP i el DMP, encara que per cap d'ells s'estableixen concentracions màximes admissibles ni concentracions mitjanes anuals. És destacable que a l'any 1972 ja hi hagués una preocupació per el control de ftalats a l'aigua atribuït a l'elevat ús d'aquests compostos.

En l'actualitat, la Unió Europea és el principal organisme que legisla en temes de medi ambient a Europa i que afecta de forma directa als estats membres un cop ratificades les diferents directives. A Europa, no va ser fins l'any 1976 quan es va publicar la Directiva 76/464/EU, regulant la qualitat de l'aigua i referint-se a les substàncies perilloses que hi són vessades. En aquesta Directiva es va incloure el control de 146 substàncies, 109 de les quals corresponien a contaminants orgànics com ara els plaguicides, els compostos orgànics volàtils, els bifenils policlorats i els plaguicides organoclorats, entre altres. No es van incloure cap dels plastificants ni el BPA. Aquesta Directiva va constituir el primer pas que obligava als Estats Membre a monitoritzar la presència de contaminants a l'aigua i va permetre determinar la qualitat química de les masses d'aigua europees. Els resultats del control de la contaminació de les aigües va permetre assentar les bases per definir els compostos més freqüentment detectats, la seva distribució geogràfica i els nivells de concentració detectats. A partir d'aquí, s'han anat definint noves Directives que tenen com a objectiu prioritzar la monitorització d'aquells compostos que representen o poden representar un problema a nivell europeu i que per tant, cal un control estricte per preservar la qualitat dels ecosistemes aquàtics.

La Directiva 76/464/1976 publicada l'any 1976 va derivar cap a la Directiva Marc de l'Aigua 2000/60/CE (DMA) del Parlament Europeu, que estableix un marc comunitari per tal d'actuar en l'àmbit de la política d'aigües i que es basa en aconseguir emprar de formar sostenible l'entorn, racionalitzant-ne el seu ús, la conservació i la recuperació dels recursos hídrics. Aquesta Directiva té també com a objectiu evitar la contaminació de les masses d'aigua continentals, tan superficials com subterrànies, i les costaneres. Les exigències principals de la DMA són la realització d'un estudi de les característiques de cada demarcació, de les repercussions produïdes per l'activitat humana en l'estat de les aigües i un anàlisi econòmic de l'ús de l'aigua (Article 5); la creació d'un registre de zones protegides (Article 6) i l'establiment de programes de seguiment de l'estat de les masses d'aigua (Article 8), entre d'altres. Té com a novetat que fa referència tant a la qualitat química de l'aigua com a l'ecològica i promou la conservació i bon estat de les aigües d'Europa.

És al 2001 quan es publica la primera modificació de la DMA, la Directiva de substàncies prioritàries segons la Decisió 2455/2001/CE on es va aprovar una llista de 33 substàncies prioritàries o grups de substàncies en l'àmbit de política d'aigües. S'inclouen per primera vegada 3 plastificants: el nonilfenol, el 4-tert-octilfenol i el DEHP, argumentant que són compostos amb una producció molt elevada i que existeixen estudis que demostren que poden afectar la salut humana. En aquesta Directiva també es preveu la possible modificació de la llista original de compostos a monitoritzar per tal d'incloure noves substàncies que es considerin prioritàries, és a dir, que presentin un risc significatiu pel medi aquàtic o a través d'aquest.

Al 2008 es modifica novament la DMA i es publica la Directiva 2008/105/CE sobre Normes de Qualitat Ambiental (NCA). Aquesta pretén regular la qualitat química de les aigües superficials d'Europa i es defineixen els límits de qualitat ambientals (EQS) dels 33 contaminants prioritaris als que es feien referència en la DMA pels

diferents tipus d'aigua. S'exigeix que es realitzi un inventari indicant les emissions, vessaments i pèrdues de les substàncies incloses com a prioritàries. Al 2009, la Directiva 2009/90/EC complementa l'anterior i estableix les especificacions tècniques d'anàlisi químic i del seguiment de l'estat de les aigües. Un apartat important és el que es refereix a que en cas de manca de mètodes analítics normalitzats, s'han d'emprar les millors tècniques disponibles i que no impliquin una despesa elevada, així com seguir les pràctiques de gestió de qualitat acceptades internacionalment per assegurar la possible comparació dels resultats analítics.

L'any 2011 entra en vigor la Directiva 2011/0429 en la qual s'afegeixen algunes substàncies prioritàries en l'àmbit de política d'aigües així com es modifiquen alguns dels valors de NCA. Per primera vegada, implica l'anàlisi de diferents matrius, com són els peixos i els mol·luscs. D'aquesta manera, s'intenta tenir informació completa sobre la presència de contaminants en aigües i la seva bioacumulació en organismes aquàtics.

La Directiva 2013/39/UE, que modifica les de l'any 2000 i el 2008, va afegir 8 contaminants més a la llista de prioritaris. Com les anteriors, contempla com un important problema la contaminació de les aigües superficials, que pot suposar una amenaça pel medi aquàtic (toxicitat aguda i crònica en nombrosos organismes), l'ecosistema i la biodiversitat, i la salut humana. També valora com a objectiu prioritari identificar les causes de contaminació i tractar les emissions d'aquests compostos en el mateix focus d'origen.

Finalment, la Directiva més recent i que modifica les anteriors, és la Directiva 2015/495/UE. En aquest cas, es van establir alguns mètodes concrets per l'anàlisi de certs compostos, com el diclofenac, i també es van establir límits de detecció màxima per aquests mètodes. No es va ampliar el número de substàncies prioritàries i no hi va haver cap modificació respecte els plastificants.

Per altra banda també cal tenir present el Reglament de Registre, Avaluació, Autorització i Restricció de Substàncies Químiques (REACH, Reglament 1907/2006/CE), que representa una eina important per tal de tenir un control detallat de les substàncies químiques fabricades, utilitzades o importades a Europa i que poden ocasionar un risc pel medi ambient i la salut humana. El seu objectiu principal és que els fabricants, importadors i usuaris de substàncies químiques només utilitzaran compostos que no afectin de forma negativa ni el medi ambient ni la salut de les persones. Així, una de les principals conseqüències del REACH ha estat i segueix sent el registre sistemàtic de tots els productes químics existents a Europa. Aquesta informació és molt útil perquè l'ús o consum dels diferents productes químics aporta una informació molt valuosa sobre les possibles fonts de contaminació i l'impacte que poden tenir en el medi.

De la DMA i les seves excepcions, els compostos regulats i que es mantenen a la Directiva 2013/39/UE són el DEHP, el NP i el OP, tots considerats substàncies perilloses. Les NCA que s'indiquen a la Directiva defineixen uns valors per a cada substància. Aquests fan referència a la mitjana anual acceptable i a la concentració màxima admissible segons el tipus d'aigua: aigües superficials continentals (rius, llacs i masses d'aigües superficials) i altres tipus d'aigua superficials. Pel DEHP, la concentració mitjana anual ha de ser de $1,3 \mu\text{g L}^{-1}$, mentre que no es considera cap concentració màxima admissible, ja que es considera que els valors mitjans anuals protegeixen dels episodis de contaminació a curt termini en el cas dels vessaments continuats, degut que són significativament inferiors als valors calculats sobre la toxicitat aguda. Respecte el NP i els seus isòmers, s'estableix un valor mitjà anual de $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ i en aquest cas, també s'estableix una concentració màxima admissible de $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Finalment, el OP té un valor mitjà anual de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$, mentre que tampoc s'estableix una concentració màxima admissible. A nivell legislatiu, aquests valors de concentració s'utilitzen per identificar aquelles masses d'aigua amb

concentracions superiors als màxims legislats, de manera que un cop identificades les fonts de contaminació, l'objectiu és implementar mesures per evitar o minimitzar la contaminació.

Tal com es pot observar de les diferents Directives, el nombre de substàncies legislades és relativament baix comparat amb la quantitat real de les substàncies potencials que poden contaminar el medi ambient i presentar un risc per a la salut humana. Aquestes substàncies són els anomenats contaminants emergents, definits com compostos que no estan regulats per cap legislació referent al medi aquàtic i es desconeixen en bona mesura els seus efectes en el medi ambient i sobre la salut humana. Aquests tipus de contaminants, encara que tenen el nom d'emergents, no tenen perquè ser de recent creació i ús, sinó que poden haver estat introduïts al medi al llarg de molt temps, i no és fins ara que s'han detectat a concentracions elevades i s'han identificat els efectes perjudicials que ocasionen (EEA, 2011). Molts d'aquests contaminants es produeixen i consumeixen en grans volums, i això fa que siguin introduïts a l'ambient de forma continuada, i unit a la possibilitat que siguin persistents, augmenta la possibilitat de poder causar efectes negatius (Petrovic et al., 2004).

En aquesta tesis s'ha fet èmfasi en l'anàlisi d'un elevat nombre de plastificants que s'utilitzen en grans quantitats però no han estat legislats i gairebé no han estat estudiats. Això és especialment rellevant pels ftalats i els seus potencials substituïts, el DEHA i el ATBC i els alquilfenols diferents al NP i l'OP. Per aquests compostos no se sap ni les seves fonts de contaminació, ni dinàmica en el medi ambient ni efectes que poden ocasionar. Tampoc existeixen metodologies adequades per al seu control. Per tant, no es disposa avui en dia la informació necessària per poder establir un marc legal per aquests compostos.

1.4 Impacte dels plastificants en aigua potable i begudes

A partir de l'aigua de riu, juntament amb els aqüífers i pous, s'obté pràcticament la totalitat de l'aigua que serveix pel consum humà, després dels corresponents tractaments. Per aquesta raó, en aquesta tesi s'ha estudiat l'aigua potable i també les begudes refrescants, la majoria de les quals es produeixen a partir de les aigües de xarxa.

1.4.1 Aigua potable

L'aigua de distribució s'obté a partir de qualsevol origen sempre i quan no representi cap mena de risc per a la salut humana. Aquesta aigua sempre rep algun tipus de tractament, la complexitat del qual depèn de la qualitat de l'aigua de partida. Un cop l'aigua és tractada, es distribueix a través d'unes línies de subministrament cap a la població. Els tractaments previs abans de la seva distribució asseguren per tant que l'aigua és completament neta i saludable. Segons el Reial Decret 140/2003, l'aigua no ha de contenir cap substància ni microorganisme amb potencial perill per a la salut humana. Els paràmetres a controlar són físics (com la conductivitat), químics (com el pH i les diverses concentracions de contaminants orgànics i inorgànics), biològics (com els nivells de *Escherichia coli*) i organolèptics (olor, sabor, terbolesa i color). A part de l'estudi de l'aigua en si també s'estudia tot el control de les canonades de distribució, per tal d'assegurar que aquestes no produeixin la migració de cap dels seus components i no contribueixin en substàncies no desitjades en l'aigua de consum (Meeker et al., 2009).

Per tal de purificar l'aigua, especialment pel que fa l'aigua de riu, aquesta es processa en plantes de tractament d'aigua potable. En aquestes instal·lacions l'aigua és depurada de forma segura i condicionada pel consum humà. Els plastificants poden provenir de l'aigua d'origen que es capta per potabilitzar,

normalment rius o aigua subterrània. Si aquests tenen nivells de plastificants elevats, poden influir en la qualitat final de l'aigua tractada. Molts dels tractaments bàsics en aquests tipus de processos poden eliminar part o la totalitat d'alguns compostos, com és la cloració (Gallard et al., 2004), però altres plastificants són més resistents i poden arribar al producte final que es deriva a la xarxa de distribució. Altres processos (per exemple la llum UV) ajuden en l'eliminació dels compostos, però no totes les plantes compten amb els mateixos tractaments.

A part de la problemàtica relacionada amb la qualitat inicial de l'aigua, els plastificants poden provenir també de les migracions de les pròpies canonades, que en la majoria de casos són de PVC o dels dipòsits on s'emmagatzemen les aigües que sovint estan recoberts de resines epoxi. Per tant, malgrat que el procés de potabilització tingui com objectiu eliminar qualsevol contaminant present en l'aigua d'origen, el mateix contacte amb la canonada fa que alguns plastificants estiguin presents en el sistema de potabilització (Kelley et al., 2014).

La presència de plastificants i monòmers del plàstic en aigües de distribució ha rebut un interès especial en els darrers anys, i reflecteix la importància de mantenir una bona qualitat de l'aigua de captació i les derivades de la migració de les canonades per evitar que hi hagi traces de contaminants a l'aigua de distribució. Els plastificants en aigua de distribució es poden trobar a nivells molt similars als trobats en rius i els compostos detectats de forma més freqüent són el BPA, el DEHP i el DEP (Colin et al., 2014; Loraine i Pettigrove, 2006).

La Taula 4 recull de forma cronològica la bibliografia més rellevant en referència a la presència de plastificants en aigua de distribució, indicant de forma concreta el tipus d'aigua analitzada i l'origen, així com el mètode d'extracció, el mètode d'anàlisi, els compostos estudiats, els nivells trobats i els límits de detecció del

mètode. La descripció de les metodologies desenvolupades per l'anàlisi de plastificants i BPA i les seves prestacions analítiques s'indiquen a l'apartat 1.5.

A la Taula 4 s'inclouen dades de nivells en aigües provinents de DWTP així com agafades directament de l'aixeta o aigües de deus que s'utilitzen per envasar. Pel que fa referència a aigua potable, recentment s'ha detectat DBP a concentracions de 13620 ng L^{-1} a la Xina en aigua d'aixeta, on aquestes concentracions tan elevades provenen de la migració en les canonades, ja que aquests compostos no estan lligats químicament a la matriu polimèrica (Luo et al., 2014). Colin et al. van detectar BPA a nivells de fins 50 ng L^{-1} (Colin et al., 2014) en un estudi on s'analitzaren prop de 300 mostres d'aigua de l'aixeta de França. La presència dels plastificants s'atribueix a la migració en les canonades i a la falta d'un tractament que permeti llur eliminació completa en les plantes de tractament d'aigua potable. El BPA ha estat detectat també en aigua d'aixeta a Malàisia (Santhi et al., 2012) a un nivell de 60 ng L^{-1} , i a Brasil (Sodré et al., 2010a) a un nivell de 160 ng L^{-1} , i en tots els casos es va atribuir a la migració, ja que argumenten que aquest compost s'elimina pràcticament en la totalitat en els sistemes de potabilització.

En un treball realitzat a la potabilitzadora de Sant Joan Despí, que purifica aigua del Llobregat (Rodríguez-Mozaz et al., 2004), el BPA no va ser detectat en l'aigua que es distribueix a la xarxa. Per tant, els tractaments aplicats (com la cloració, osmosi, etc) són suficients per eliminar el BPA que es troba al Llobregat. La presència de BPA depèn del tractament de potabilització que s'apliqui en cada zona. Als voltants de París (França), dos estudis realitzats en la mateixa planta potabilitzadora van detectar BPA per sota de 20 ng L^{-1} (Dupuis et al., 2012; Stavrakakis et al., 2008). En el cas d'aigües de distribució de la Xina (Xue et al., 2013) la concentració de BPA va arribar a un valor de 37 ng L^{-1} en les 5 mostres analitzades. La presència de BPA en aigua potable està associada a les migracions en les canonades de PVC amb capes de resines epoxi, ja que és el monòmer utilitzat per la seva fabricació.

Taula 4. Nivells de plastificants en aigua de distribució, indicant MDL i mètodes d'anàlisi.

Aigua (país)	Mètode extracció i anàlisi	Compost	Nivells (ng L ⁻¹)	MDL (ng L ⁻¹)	Referència
DWTP (Espanya)	SPE-LC-MS/MS	NP	nd-339	30	(Petrović et al., 2003)
DWTP (Espanya)	SPE-LC-MS/MS	BPA	<lq	6,3	(Rodríguez-Mozaz et al., 2004)
DWTP (EEUU)	SPE-GC-MS	DMP	nd-540	39	(Loraine i Pettigrove, 2006)
		DEP	nd-2470	490	
		DBP	nd-2730	1350	
		BBP	nd-552	33	
		DEHP	nd-2560	1760	
		BP	nd-260	44	
Aixeta (Portugal)	SBSE-LD-GC-MS	DMP	40	8	(Serôdio i Nogueira, 2006)
		DEP	190	15	
		DBP	520	40	
		BBP	30	3	
		DEHA	90	20	
		DEHP	60	40	
Aixeta (Xina)	DLPME-GC-MS	DMP	nd	4300	(Xu et al., 2007)
		DEP	900	660	
		DBP	600	430	
Aixeta (Espanya)	SPE-GC-MS	DMP	nd	28	(Regueiro et al., 2008)
		DEP	nd-195	46	
		DBP	nd	125	
		DEHP	nd	133	
DWTP (França)	SPE-LC-MS/MS	NP	<lq	0,11	(Stavarakakis et al., 2008)
		OP	<lq	7,94	
		BPA	1,9	0,03	
Aixeta (Brasil)	SPE-GC-MS	BPA	nd-160	30	(Sodré et al., 2010a)
		NP	nd	110	
		OP	nd	60	
Fonts (Espanya)	SPE-GC-MS	DMP	nd	10	(Bono-Blay et al., 2012)
		DEP	nd-1115	330	
		DBP	nd	230	
		BBP	nd	190	
		DEHA	nd-192	80	

Introducció

Aigua (país)	Mètode extracció i anàlisi	Compost	Nivells (ng L ⁻¹)	MDL (ng L ⁻¹)	Referència
		DEHP	nd	460	
		OP	nd-3	1	
		NP	nd-58	17	
		BPA	nd-203	9	
DWTP (França)	SPE-LC-MS/MS	BPA	2,0-16,9	0,5	(Dupuis et al., 2012)
Aixeta (Malàsia)	SPE-GC-MS	BPA	3,5-59,8	0,4	(Santhi et al., 2012)
Aixeta (França)	SPE-GC-MS	DMP	nd	5	(Martine et al., 2013)
		DEP	nd-33	5	
		DEHP	nd-350	5	
		BBP	nd	2	
		DBP	nd-44	2	
DWTP (Xina)	SPE-LC-MS/MS	BPA	nd-128	0,63	(Fan et al., 2013)
		NP	nd-558	2,43	
Aixeta (Itàlia)	SPE-LC-MS/MS	OP	nd-36	0,39	(Maggioni et al., 2013)
		NP	nd-84	2,31	
		BPA	nd-102	0,22	
DWTP (Xina)	Sensor electroquímic	BPA	nd-37	0,284	(Xue et al., 2013)
Aixeta (França)	SPE-LC-MS/MS	BPA	nd-50	25	(Colin et al., 2014)
		NP	nd-505	100	
		4TBP	nd	100	
Aixeta (Espanya)	SPE-GC-MS	DMP	nd-29	10	(Dominguez-Morueco et al., 2014)
		DEP	nd-381	330	
		DEHP	nd	460	
		BBP	nd	190	
		DBP	336-909	230	
Aixeta (Xina)	SPE-LC-MS/MS	BBP	nd-1	0,3	(Liou et al., 2014)
		DBP	nd-66	0,3	
		DEHP	12-190	0,3	
		DEP	nd-4	0,3	
		DMP	nd-2	0,3	
Aixeta (Xina)	Graphene SPE-HPLC-MS	DMP	nd	90	(Luo et al., 2014)
		DEP	nd	160	
		DBP	2940-13620	190	
Aixeta (Taiwan)	SPE-LC-MS/MS	DBP	nd-40	0,3	(Yang et al.,

Aigua (país)	Mètode extracció i anàlisi	Compost	Nivells (ng L ⁻¹)	MDL (ng L ⁻¹)	Referència
		DEHP	nd-40	0,3	2014a)
Aixeta (Xina)	SPME-GC-MS	DMP	nd	10	(Zhang et al., 2014)
		DEP	nd	20	
		DBP	nd	10	
		DEHP	nd	20	

DLPME: Microextracció per fase líquida dinàmica.

Respecte els alquilfenols, la presència de NP i OP en aigües de distribució s'atribueix a la seva presència en les aigües de captació, tant pel seu ús directe com per la degradació d'alquilfenols polietoxilats presents en el medi que generen NP. Degut que el NP és un compost molt persistent, es troba de forma recurrent en rius i això pot tenir un impacte sobre la qualitat de les aigües de consum humà. Per exemple, l'aigua potabilitzada provinent del riu Llobregat contenia un nivell de 339 ng L⁻¹ (Petrović et al., 2003) de NP que s'atribueix a la baixa eficàcia de la planta per eliminar de forma completa aquest compost que estava present en les aigües de captació a una concentració de 800 ng L⁻¹. En aigües de distribució del sud de Xina, el NP es va detectar a nivells de 558 ng L⁻¹ i la seva presència es va atribuir a la migració de les canonades (Fan et al., 2013). L'OP es detecta generalment a nivells inferiors que el NP degut que és un compost que s'utilitza en quantitats molt més baixes. A Itàlia, es van analitzar aigües de l'aixeta de 35 ciutats del nord del país, com Milà i Florència, i la majoria de mostres van ser negatives, al només detectar-se en 10 d'elles a una concentració màxima de 36 ng L⁻¹ d'OP (Maggioni et al., 2013). Contràriament, els nivells en aigua de deus d'OP (Bono-Blay et al., 2012) van ser inferiors, de 3 ng L⁻¹, la qual cosa indica la baixa incidència d'aquest compost en aigües subterrànies susceptibles a ser envasades. En quant als APs de cadena curta, es va estudiar el 4TBP, però no es va detectar en aigua d'aixeta de França (Colin et al., 2014). La

resta d'APs no han estat documentats i per tant, es desconeix si estan presents en les aigües de captació o si poden migrar de les canonades, i tampoc s'ha estudiat l'eficàcia de les potabilitzadores per eliminar aquests compostos.

Els ftalats són compostos ubics en aigua potable (Taula 4) degut que són emprats en molt diverses aplicacions relacionades amb els materials utilitzats en les plantes potabilitzadores, com les canonades, els dipòsits i els filtres. El DBP es va detectar entre 154 i 909 ng L⁻¹ (Domínguez-Moruco et al., 2014) i s'atribueix també al seu ampli ús per la zona industrial on es van prendre les mostres. Aquest estudi també analitza DEHP, però no el detecten i argumenten que és un dels compostos més regulats per la Unió Europea i per tant, cada cop és menys utilitzat. El DMP va ser detectat en aigua potabilitzada del Estats Units (Lorraine i Pettigrove, 2006), a 540 ng L⁻¹, molt superior als valors d'Espanya (29 ng L⁻¹) detectats per Domínguez-Moruco et al. Pel que fa al DEP, Lorraine et al. el van detectar a 2470 ng L⁻¹ als Estats Units. A Espanya, el valor va ser de 1115 ng L⁻¹ en aigua de fonts, segons Bono-Blay et al. Uns altres compostos que han estat detectats en aigües de distribució del sud de Califòrnia, als Estats Units, són el DEHP i el DBP, que es van detectar a 2560 i 552 ng L⁻¹, respectivament (Lorraine et al. 2006), mentre que als diversos estudis efectuats a Espanya, mai s'han arribat a detectar (Bono-Blay et al., 2012; Domínguez-Moruco et al., 2014; Regueiro et al., 2008). Finalment, el DEHA s'ha identificat en aigua procedent de diverses fonts arreu d'Espanya a una concentració entre no detectat i 192 ng L⁻¹ (Bono-Blay et al., 2012) mentre que es van detectar a nivells de 90 ng L⁻¹ en aigua d'aixeta a Portugal (Serôdio i Nogueira, 2006). A França, Martine et al. (Martine et al., 2013) van detectar ftalats en aigua d'aixeta, i el DEHP va ser el de concentració més gran, de 350 ng L⁻¹. L'estudi de ftalats en aigua a Xina s'ha reportat en 4 ocasions, una de les quals no va ser detectat (Zhang et al., 2014) malgrat tenir límits de detecció baixos. Els altres tres (Liou et al., 2014; Xu et al., 2007; Yang et al., 2014a) els van detectar a nivells similars al voltant de 100 ng L⁻¹,

i sempre el DEHP va ser el ftalat de major concentració. Per altra banda, es va identificar la presència de plastificants i monòmers del plàstic en aigües de font, on el DEP es va detectar a 1115 ng L^{-1} , el BPA i el DEHA a 200 ng L^{-1} cadascun i el NP i OP a nivells de fins 58 i 3 ng L^{-1} , respectivament (Bono-Blay et al., 2012). Les aigües analitzades en el treball de Bono-Blay et al. són aigües de manantials que s'utilitzen per envasar i la presència de plastificants només es va trobar en manantials molt poc profunds que no respectaven el perímetre de seguretat que garanteix l'absència de qualsevol contaminat.

La BP no ha estat gaire estudiada en aigües de distribució malgrat ser un compost que es fa servir com a protector de la llum UV i es podria utilitzar en canonades i dipòsits que es troben situats en llocs on la llum del Sol hi pot incidir. En aigua de potabilitzadora als Estats Units (Loraine i Pettigrove, 2006) es va detectar la BP a una concentració de 260 ng L^{-1} . No es té constància de cap estudi de la BP en aigua potable a Espanya.

Seguint la mateixa tendència que en aigües de riu, el BPA, OP, NP i ftalats han estat caracteritzats en aigües de distribució, però el coneixement que es té per la BP i altres alquilfenols, sobretot de cadena curta, és molt baix o gairebé nul. Per tant, cal reforçar els estudis tant a nivell analític com ambiental per avaluar si aquests compostos poden representar un problema ambiental i afectar la qualitat de les aigües de distribució.

1.4.2 Presència en begudes refrescants

Avui dia existeix una preocupació creixent per l'augment progressiu de la quantitat de substàncies químiques que s'incorporen a la dieta, no només d'additius alimentaris, sinó de compostos exògens provinents de l'envàs. El problema es centra en la migració dels plastificants cap a l'aliment o beguda que

contenen (Brocca et al., 2002; Nerín i Asensio, 2007), que poden arribar a alterar les qualitats organolèptiques (Nerín et al., 2002; Skjevrak et al., 2003) i afectar la seva salubritat. La legislació europea obliga al fabricant de l'envàs i a l'envasador del respectiu aliment a reunir les proves necessàries per demostrar que les quantitats emeses no poden produir cap risc per la salut dels consumidors i que tampoc poden exercir altres influències negatives sobre l'envàs.

Les begudes refrescants, anomenades comunament refrescs, gasoses, sodes o begudes carbonatades, són una part important del mercat alimentari espanyol. L'any 2013, es van consumir 2120,1 milions de litres a l'estat espanyol, el que suposa 46,7 litres de refresc per any i habitant (Martín, 2014). La majoria contenen aigua carbonatada, encara que el terme s'ha ampliat a molts tipus de begudes, com les que contenen te, o algunes amb suc de fruita.

La fabricació de begudes comença quan les fàbriques desmineralitzen l'aigua i després hi afegeixen els minerals a nivells determinats, per tal d'homogeneïtzar les propietats organolèptiques del producte i fer-lo reproduïble sigui quin sigui l'origen de l'aigua emprada. En aquest moment, és quan s'hi afegeixen la resta d'additius. El més comú són els edulcorants, per tal de conferir el gust dolç de la majoria de begudes, que es poden classificar en naturals (com la sacarosa o la fructosa), sintètics (com l'aspartam) i naturals no aportadors de glucosa (com els obtinguts de l'estèvia). També es troben els acidulants, per tal de conferir un gust àcid, com són l'àcid cítric i l'àcid fosfòric, i per aquesta raó, també s'addicionen estabilitzadors d'acidesa, que consisteixen en sals amb efecte tamponador. Altres additius són els colorants i els aromatitzants, que conferiran les característiques perquè una beguda tingui el gust i color desitjats, els conservants, de vital importància degut a l'alt nivell de sucre i una possible contaminació bacteriana, i finalment els espessidors, que permetran modificar la viscositat final de la beguda.

Les begudes refrescants solen presentar-se en dos tipus d'envasos: ampolles de plàstic o llaunes d'alumini. En el cas de les ampolles de plàstic, el tereftalat de polietilè o simplement polietilè ("polyethylene", o PET) és el material més comú (Figura 6). S'empra per ampolles entre 0,25 i 2 L i té una densitat baixa, de $1,37 \text{ g mL}^{-1}$. Es fabrica a partir de l'àcid tereftàlic i l'etilenglicol, i com a propietats destaca la seva lleugeresa i la facilitat pel reciclatge. A part, les ampolles de PET tenen un tap de plàstic, el qual és de HDPE (polietilè d'elevada densitat). La densitat de l'HDPE és encara més baixa, del voltant de $0,95 \text{ g mL}^{-1}$, i és fabricat a partir de l'etilè. Té una major duresa que el PET.

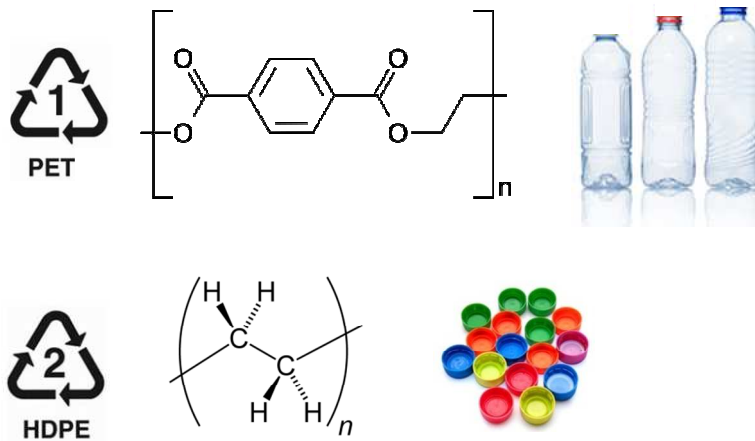


Figura 6. Símbols de reciclatge i monòmers del PET i HDPE.

Els codis que s'observen a la Figura 6 indiquen el tipus de plàstic: 1 (PET) i 2 (HDPE). Existeix aquesta numeració per més plàstics, com per exemple el polietilè de baixa densitat o el policarbonat, però per ampolles utilitzades per les begudes refrescants, al mercat espanyol només se'n troben de PET i amb tap d'HDPE. El policarbonat, per altra banda, és comú en el cas de garrafes d'aigua superiors a 5 litres o en "coolers", però no es fan servir per envasar begudes.

L'altre tipus d'envàs utilitzat en la producció de begudes són les llaunes (Figura 7), les quals estan composades principalment d'alumini, o en el cas d'algunes marques, per una mescla del 55% d'acer i el 45% d'alumini. Les llaunes normalment són recobertes a la part interior per evitar l'oxidació de l'alumini, i una de les principals formes de recobrir la llauna és emprant resines epoxi. Aquestes contenen alquilfenols com a principals additius, i bisfenol A com a monòmer (Braunrath et al., 2005). Com s'indica a la Figura 7, les llaunes d'alumini tenen fins a 5 capes. La capa central és d'alumini, que dona les característiques principals de la llauna, com la lleugeresa. Un segellador s'empra per evitar fuites o l'entrada d'aire exterior quan s'uneix la tapa i la part inferior de la llauna. Per evitar el contacte directe de l'alumini i el segellador amb l'aliment, es disposa de la capa de resina epoxi que està en contacte directe amb l'aliment. Pel que fa a la capa exterior, l'alumini rep una capa de pintura, per donar unes condicions estètiques determinades, i finalment, un fixador assegura que la pintura no es faci malbé quan la llauna es guarda a diferents temperatures.

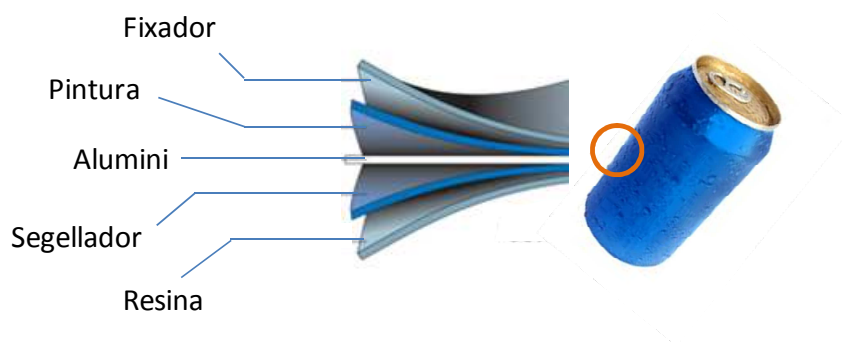


Figura 7. Capes d'un envàs tipus llauna.

Els plastificants que contenen els recobriments o el propi material plàstic poden migrar un cop l'aliment està en contacte amb l'envàs degut a l'acció de la

temperatura i el pas del temps i així ho evidencien nombrosos estudis que han analitzat aquest fenomen en la indústria alimentària (Gallart-Ayala et al., 2011b; Sakhi et al., 2014). Per tant, les begudes que han estat en contacte amb plàstics poden contenir compostos que poder ser ingerits pel consumidor. És precisament la composició i materials utilitzats en la fabricació de llaunes i ampolles de les begudes que poden afectar la qualitat del producte que contenen.

El procés es coneix com migració (Brocca et al., 2002) i consisteix en la transferència de compostos que estan en la part sòlida de l'envàs cap al líquid contingut, mitjançant un procés de difusió. Els plastificants poden migrar ja sigui perquè el compost no va reaccionar (no es va fixar) durant el procés de fabricació o bé pel seu desprendiment degut a la degradació del propi plàstic a l'estar en contacte amb el producte alimentari. L'aliment, l'acidesa d'aquest, la temperatura, la llum ultraviolada i el temps tenen un paper important en el procés de migració. Addicionalment, la qualitat del polímer utilitzat per la fabricació de l'envàs i el sistema de manufactura també juga un paper important en el procés de migració.

La presència de plastificants en begudes refrescants es comença a documentar l'any 2005, i les diverses publicacions es recullen cronològicament a la Taula 5. S'indica tant el tipus de mètode d'extracció i d'anàlisi, així com els nivells mínims i màxims detectats en diferents tipus de begudes i els límits de detecció. Els mètodes d'extracció i anàlisi i els MDLs es comenten de forma conjunta a l'apartat 1.5.

Taula 5. Nivells de plastificants en begudes refrescants, indicant MDL i mètodes d'anàlisi.

País	Envàs	Tipus de mostra	Mètode extracció i anàlisi	Compost	Nivells (ng L ⁻¹)	MDL (ng L ⁻¹)	Referència
Tailàndia	Llauna	E, C, S	SBSE-GC-MS	BPA	<1q-3400	100	(Braunrath et al., 2005)
Xina	Llauna i PET	S	SPE-LC-MS/MS	BPA	nd	0,6	(Shao et al., 2005)
				NP	36-464	0,4	
Espanya	Llauna	Te, S	LLE (supramolecular solvents)-LC-MS	BPA	2300	215	(Ballesteros-Gómez et al., 2009)
Canadà	Llauna	C, S, Te, Tn	SPE-GC-MS	BPA	32-4500	74	(Cao et al., 2009)
Bèlgica	Llauna i PET	C, S, I, F, Te, Tn	SPE- GC-MS	BPA	40-8100	6	(Geens et al., 2010)
Portugal	Llauna	C, E, S	DLLME-GC-MS	BPA	30-4700	5	(Cunha et al., 2011)
Espanya	Llauna	S, C, Tn, Te	SPE online-LC-MS/MS	BPA	44-607	25	(Gallart-Ayala et al., 2011a)
Espanya	Llauna	S, C, I, Te, Tn	SBSE-GC-MS	BPA	100	2,5	(Cacho et al., 2012)
				BP	nd	0,9	
Rússia	Llauna	E	LLE-GC-MS	BPA	2810	50	(Feshin et al., 2012)
Xina	PET	I	UAESEME-GC-FID	DMP	nd	790	(Yan et al., 2012)
				DEP	nd	610	
				DBP	nd-3320	460	
Aràbia Saudita	Llauna	C, S, E	SPE-HPLC-MS	BPA	310-870	21	(Khedr, 2013)
				DEHP	0,03-3,50	13	
Xina	Llauna	C, E, Te	SPE-HPLC-FLD	BPA	nd-860	20	(Li et al., 2013)
				OP	nd-250	30	
				NP	nd-220	30	
Xina	Llauna	S	SPE-GC-MS/MS	BBP	nd-11	0,74	(Cao et al., 2014)
Xina	Llauna	S, C, E	Elèctrode (grafè)	BPA	5470-18240	1380	(Deng et al., 2014)
Xina	Llauna i PET	S, Te	DSMIP-SPE-HPLC-UV	BPA	125-245	3	(Li et al., 2014a)
Xina	Llauna	S	LLE-HPLC-MS/MS	BPA	nd-46400	10	(Liao i Kannan, 2014)
Itàlia	Llauna i PET	S	DDLME-GC-MS/MS	DMP	nd	30	(Russo et al., 2014a)
				DEP	140-430	50	
				DBP	1990-5700	40	

País	Envàs	Tipus de mostra	Mètode extracció i anàlisi	Compost	Nivells (ng L ⁻¹)	MDL (ng L ⁻¹)	Referència
Itàlia	Llauna i PET	S	DDLME-GC-MS/MS	BBP	280-310	100	(Russo et al., 2014b)
				DEHP	2730-99900	90	
				DMP	nd	20	
				DEP	100-430	50	
				DBP	1930-5660	40	
				BBP	50-300	100	
Noruega	Llauna i PET	S, F, Te	LLE-GC-MS/MS	BPA	nd-370	6	(Sakhi et al., 2014)
				DMP	nd-60	9	
				DEP	nd-70	12	
				DBP	340-950	29	
				BBP	nd-190	21	
				DEHP	170-740	15	
Xina	Llauna	I, F, Te	SPE-GC-MS/MS	DMP	<lq-19000	3000	(Wu et al., 2014)
				DEP	<lq-76000	3000	
				DEHP	15000-159000	3000	
				DBP	<lq-139000	4000	
				BBP	<lq-29000	4000	
Xina	Llauna i PET	S	MIP-SPE-LC-MS/MS	BPA	nd-9700	13	(Yang et al., 2014b)
Turquia	PET	T, F, C, S, I	DLME-LC-UV	DMP	nd	19	(Yilmaz et al., 2014)
				DBP	nd	21	
				BBP	nd	21	
				DEHP	nd-1440	26	
Xina	Llauna	S	LLE-LC-MS/MS	BPA	10-267000	3	(Niu et al., 2015)
				NP	30-800	3	
Xina	Llauna	S	SPME-DART-FT-ICR-MS 1	DEP	nd	1000	(Wu et al., 2015)
				DBP	nd	200	
				BBP	nd	200	
				DEHP	<lq	1000	

UAESEME: “ultrasound assisted surfactant enhanced emulsification microextraction”, microextracció per emulsificació augmentada per surfactants assistida per ultrasons. MIP-SPE: “ molecularly imprinted polymer SPE”, SPE per polímer imprès molecularment. S: Soda. F: Amb suc de fruita. I: Isotònica. C: Cola. E: Energètica. Te: Amb te. Tn: tònica.

Pel que fa referència als plastificants detectats, els nivells més elevats sempre s'han trobat en begudes enllaunades. Així, en els estudis que analitzen envasos d'alumini conjuntament amb els de plàstic, s'observen diferències significatives pel que fa als nivells de concentració (Geens et al., 2010; Li et al., 2013; Russo et al., 2014a; Russo et al., 2014b; Sakhi et al., 2014; Shao et al., 2005; Yang et al., 2014b), arribant a una concentració de l'ordre de 100 vegades més elevada en begudes envasades en llauna que en PET. Els diversos autors ho atribueixen a l'etapa d'esterilització de les llaunes que es fa a 120°C durant 90 minuts (Sakhi et al., 2014), la qual afavoreix la migració dels plastificants presents en els recobriments, sobretot les resines epoxi.

El BPA es troba a concentracions relativament variables en els diferents estudis. Per exemple, en un estudi on s'analitzava un número reduït de mostres de sodes del mercat xinès (n=13), el BPA no es va detectar en cap mostra (Shao et al., 2005). Aquest estudi contrasta amb la gran majoria, on el BPA és detectat a concentracions de fins a 1000 ng L⁻¹ (Cacho et al., 2012; Gallart-Ayala et al., 2011a; Khedr, 2013; Li et al., 2014a; Li et al., 2013; Sakhi et al., 2014). La presència de BPA en llaunes de tot tipus de beguda s'atribueix als materials de recobriments emprats en les resines epoxi que recobreixen els interiors de la llauna i als processos de migració. Hi ha estudis que indiquen valors encara superiors, entre 1000 i 10000 ng L⁻¹, que són valors molt elevats tenint en compte que són productes alimentaris (Ballesteros-Gómez et al., 2009; Braunrath et al., 2005; Cao et al., 2009; Cunha et al., 2011; Feshin et al., 2012; Geens et al., 2010; Yang et al., 2014b). En aquests estudis, la presència de BPA s'atribueix bàsicament al procés d'esterilització mencionat anteriorment, que té un impacte major que el temps posterior que pugui estar emmagatzemada la llauna, generalment a temperatures per sota de 30°C. S'han detectat concentracions extremes de BPA en llaunes (Deng et al., 2014; Liao i Kannan, 2014), on el valor més elevat, de 267000 ng L⁻¹ (Niu et al., 2015), es va detectar en begudes de soda

en llaunes procedents de diverses províncies xineses. Cal dir que els nivells (exceptuant la més elevada) es troben al voltant dels 10000 ng L^{-1} , i només és en la província de Hebei, a la costa nord del país, que es va detectar a nivells de fins 267000 ng L^{-1} de BPA. Aquest nivell es podria explicar per la qualitat dels recobriments de resina emprats en les llaunes, ja que si el BPA no queda ben adherit a l'estructura polimèrica pot desprendre's amb més facilitat.

Pel que fa a la BP, aquesta no va ser detectada en begudes analitzades del mercat espanyol (Cacho et al., 2012) malgrat que el mètode emprat basat en la SBSE i la GC-MS va resultar tenir una sensibilitat molt bona. Aquest estudi va analitzar molta varietat de mostres en envasos de llauna, des de sodes, coles, tòniques, begudes isotòniques i begudes amb te. En canvi, sí que s'ha detectat en altres aliments (Gallart-Ayala et al., 2011b) on el BPA es va determinar a un nivell màxim de 40000 ng L^{-1} en aliments per a recent nascuts i a nivells més baixos en suc de fruita, gaspatxo, vi blanc i sangria, i en tots els casos, el format de l'envàs va ser de Tetra Pak, que s'associà amb la presència de la BP.

Els alquilfenols, malgrat ser una família extensa, la majoria d'estudis es centren especialment en l'estudi del NP i el OP, que són els més emprats per la indústria del plàstic. Tots els estudis detecten concentracions molt similars de NP en llaunes. Es van detectar 800 ng L^{-1} (Niu et al., 2015) en sodes envasades en llauna, 464 ng L^{-1} (Shao et al., 2005) en sodes del mateix envàs, i 220 ng L^{-1} (Li et al., 2013) en llaunes de begudes energètiques, totes del mercat xinès. El OP en canvi, es va detectar a una concentració de 250 ng L^{-1} en una mostra de cola, però no es va detectar en begudes energètiques i en te enllaunats a Xina (Li et al., 2013). Com en el cas dels altres compostos, la utilització de certs recobriments així com les temperatures a les que són exposades les llaunes són clau per explicar els nivells trobats. No es té informació sobre la presència d'aquests compostos en begudes envasades del mercat espanyol i la informació a nivell europeu és molt limitada.

Els ftalats més estudiats són el DMP, DEP, DBP, DEHP i BBP. Yan et al. (Yan et al., 2012) va analitzar begudes isotòniques del mercat xinès i només va detectar DBP a una concentració de 3320 ng L⁻¹. Des de llavors, els estudis de ftalats en mostres de begudes ha anat augmentat, especialment a la Xina. És en aquest país on es van detectar nivells molt elevats (Wu et al., 2014) en begudes enllaunades amb te, suc de fruita i isotòniques, on els valors de DMP, DEP, DBP, BBP i DEHP van ser de 19000 ng L⁻¹, 76000 ng L⁻¹, 139000 ng L⁻¹, 29000 ng L⁻¹ i 159000 ng L⁻¹, respectivament. En un estudi posterior dirigit pel mateix grup investigador (Wu et al., 2015) on s'analitzaven mostres similars de llauna, no van detectar cap dels ftalats malgrat canviar de mètode d'anàlisi i aconseguir límits de detecció més baixos. En canvi, el BBP va ser detectat en sodes en llauna de Hangzhou, a la Xina (Cao et al., 2014) en 2 de les 3 mostres analitzades, a un nivell d'11 ng L⁻¹, i s'atribueix al tipus de material emprat, així com la migració dels ftalats procedents dels recobriments interiors. Yilmaz et al. (Yilmaz et al., 2014) van analitzar un nombre més elevat de mostres (n=17) de tes, amb suc de fruita, coles, isotòniques i sodes, totes elles envasades en PET. Dels ftalats estudiats (DMP, DBP, BBP i DEHP) només es va detectar DEHP a un nivell de 1440 ng L⁻¹.

La variabilitat de nivells indicada fa pensar que els processos d'envasament, així com els materials emprats, són clau en el nivell dels plastificants detectats. En el moment que aquests compostos poden afectar la salut del consumidor, el control de la seva presència passa a ser un motiu de preocupació per part dels envasadors per a garantir la qualitat del seu producte.

1.4.3 Efectes tòxics

La majoria dels plastificants són considerats tòxics i en nombrosos estudis s'han descrit diversos efectes, com són la disrupció endocrina (Crisp et al., 1998), trastorns relacionats amb l'asma (Martine et al., 2013) o efectes a baixes dosis de

BPA (vom Saal i Hughes, 2005). Alguns poden causar tumors cancerosos o defectes de naixement, i d'altres desordres de creixement o desenvolupament (Jobling et al., 1995). Molts d'aquests compostos són també considerats disruptors endocrins potencials, amb excepció de l'ATBC (EFSA, 2000). L'Organització Mundial de la Salut (WHO) defineix aquests compostos com a substàncies exògenes amb capacitat d'alterar el funcionament del sistema endocrí i en conseqüència, poden causar efectes adversos per la salut d'un organisme.

L'exposició als ftalats prové principalment de la dieta, i en segon terme, a través de la pell (Schriks et al., 2010). En menor mesura, també és una font d'exposició l'aire, el sòl i l'aigua de consum. El BBP és considerat tòxic degut a ser un mutagen i tenir toxicitat aguda, reproductiva i carcinogenicitat (Bolgar 2008). Incidències de èczemes i rinitis en nens també es van associar a la presència d'aquest compost en la pols de les llars (Bornehag et al., 2004). L'exposició prenatal de rates a BBP va produir efectes teratogènics, com malformacions a l'esquelet i l'augment de la mortalitat en nadons durant el part (Ema et al., 1996). El DBP també va produir aquests efectes en rates (Saillenfait et al., 1998). Així, l'exposició prenatal de DBP pot produir una disminució dels nivells de testosterona (Lehmann et al., 2004) i una pubertat més avançada (Salazar et al., 2004). El DEHP va produir un augment en la incidència d'asma en nens i també es va associar a la pols a la llar (Bornehag et al., 2004). L'exposició en nens a DEHP provinent d'equips mèdics va causar desordres pulmonars (Roth et al., 1988). Per altra banda, l'estudi en rates exposades a DEHP en fase prenatal va causar malformacions a l'esquelet (Pennanen et al., 1992). Un altre ftalat que va mostrar efectes similars en rates va ser el DEP (Field et al., 1993).

Els alquilfenols, especialment l'OP, NP i els de cadena més llarga, tenen especial perillositat degut que són substàncies lipofíliques que es poden acumular en organismes. A més, el NP (i els seus corresponents etoxilats) són considerats

disruptors endocrins (Bester et al., 2001; Crisp et al., 1998). El BPA a baixes dosis pot alterar l'estructura química del cervell i el comportament, el sistema immunològic, l'activitat enzimàtica i el sistema reproductor dels dos sexes d'una varietat molt àmplia d'animals, com peixos, granotes i mamífers (Sánchez-Avila et al., 2011). El BPA és també un disruptor endocrí, i s'han realitzat diversos estudis en cultius cel·lulars on estimulava respostes en cèl·lules pancreàtiques, així com el creixement de tumors en cèl·lules pituitàries, prostàtiques i de mama (Crisp et al., 1998).

1.4.4 Legislació aplicable a la migració i TDI

Degut que la quantitat de plastificants presents a l'aigua potable, begudes refrescants i aliments envasats pot contribuir de forma important a la ingesta de contaminants per part de l'home, s'han elaborat dos tipus de marcs legals per limitar i controlar l'exposició als humans a contaminants potencialment tòxics. El primer se centra en la determinació dels límits màxims de migracions per als aliments en contacte amb materials plàstics. Aquesta legislació està centrada en la migració dels plàstics en aliments. El segon marc legal té en consideració els valors d'ingesta diària tolerable (TDI) que correspon a la concentració màxima d'un compost que pot ingerir-se al llarg del temps sense que causi problemes per la salut.

Respecte la legislació de seguretat dels materials en contacte amb aliments, cal destacar la Regulació (EC) 1935/2004 (EU, 2004a), que fa referència a les Directives 89/590/EEC (EU, 1980c) i 89/109/ECC (EU, 1989), i també la Regulació (EC) 2023/2006 (EU, 2006a), la qual descriu les bones pràctiques respecte la fabricació dels plàstics en el procés industrial i indica que cap molècula transferida a l'aliment pot canviar les propietats organolèptiques o la seguretat d'aquest. Més recentment ha estat publicada la Regulació (EU) 10/2011 (EU,

2011a), que inclou una llista de les substàncies amb possibilitat de migrar a l'aliment i descriu els tests de migració que cal dur a terme a nivell de laboratori per determinar la migració de components del plàstic i additius cap a diferents tipus d'aliment i descriu els simulants que cal utilitzar segons el tipus d'aliment que s'analitzi. D'aquesta forma, es defineixen la migració específica i la migració global o total. La primera determina la quantitat d'un compost concret procedent de l'envàs que migra a l'aliment i es defineixen els límits de migració específica ("specific migration limit" o SML) que depenen del compost a determinar. La migració global ("specific migration total limit" o SML_T), en canvi, es defineix com la quantitat total de plastificant que passa de l'envàs a l'aliment, sense tenir en compte els compostos individuals que són transferits.

Molts ftalats són compostos regulats i tenen un SML establert. Per exemple, el BBP i l'ATBC tenen un SML de 30 mg kg⁻¹. Ambdós tenen un SML com a suma de substàncies (SML_T) de 60 mg kg⁻¹. El DBP té un SML i un SML_T de 0,3 i 60 mg kg⁻¹, respectivament. En el cas del DEHP, els valors de SML i SML_T són de 1,5 i 60 mg kg⁻¹, respectivament, i en el cas del DEHA, de 18 i 60 mg kg⁻¹, respectivament. El BPA, té un SML de 0,6 mg kg⁻¹. Tots aquest valors estan establerts per la Regulació 10/2011. El DEP, en canvi no està legislat en aquesta regulació, però si ho està a Espanya, segons el Reial Decret 847/2011, que indica un SML de 0,01 mg kg⁻¹. La BP està regulada per la Unió Europea, i té un SML de 0,60 mg kg⁻¹ d'acord amb la Directiva 2002/72/EC. El NP està legislat pel Reial Decret 847/2011 amb un SML de 0,010 mg kg⁻¹.

Les substàncies considerades perilloses per la salut humana són avaluades considerant un valor d'ingesta diària tolerable ("tolerable daily intake", TDI). Aquest valor representa la quantitat estimada d'un compost en una beguda o aliment, expressat en pes corporal, que pot ser ingerit de forma diària al llarg d'una vida sense que representi cap risc per a la persona (Guart et al., 2011). Els valors de TDI solen ser calculats a partir de nivells de concentració amb efectes

adversos no observats (“no observed adverse effect level”, NOAEL), que a la vegada provenen de diversos estudis toxicològics. A part, s’hi aplica un factor d’incertesa de 500, que correspon a la multiplicació d’un factor de 10 per diferències entre espècies, un factor de 10 per diferències interindividuals i un factor de 5 per incerteses en les bases de dades reproductives i estudi de toxicitat. En general, els TDI es calculen per adults amb un pes mitjà de 60 kg i un consum de 3 kg de menjar (1 kg de sòlid i 2 kg o 2 L d’aigua). Emprant aquests valors, s’obté un TDI definit com mg de substància consumida per dia i per pes corporal ($\text{mg kg}^{-1} \text{pes corporal dia}^{-1}$). Calculant la quantitat de substància ingerida permet saber si el consum està per sota o per sobre del valor de TDI. Diferents famílies químiques tenen un valor de TDI assignat per algun dels seus compostos, com les dioxines, els retardants de flama i els perfluorats, així com compostos inorgànics basats en mercuri, plom i arsènic entre d’altres (WHO, 2001).

Dels plastificants estudiats, els ftalats, el NP i el BPA tenen un TDI assignat. El TDI pel DEP és de $0,5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (WHO, 2003) i els del DBP, BBP, DEHP i DEHA són de 0,01, 0,5, 0,05 i $0,3 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (EFSA, 2005). Pel nonilfenol, aquest es troba legislat a Dinamarca amb un TDI de $0,005 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (Danish Environmental Protection Agency, 2003). Finalment, el BPA té un TDI de $0,05 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (EFSA, 2010).

El cas del BPA és un dels que ha tingut més impacte a la societat i ha generat més debat. El TDI que va establir l’EFSA el 2006 va ser de $0,05 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, basant-se en un NOAEL de $5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ segons els estudis de toxicitat i reproducció en rates, les quals van experimentar canvis al cos i en el pes dels òrgans (Guart et al., 2011). Aquest TDI va ser fixat per protegir la salut humana de l’exposició al BPA, fent especial referència als grups més sensibles, com són les dones embarassades o en període de lactància, així com els infants (entre 1 i 12 mesos) i nens joves (entre 12 i 36 mesos). L’any 2008, la EFSA va confirmar aquest valor de TDI després de l’estudi continuat d’aquest compost en rates. L’any 2010, la EFSA va

identificar alguns aspectes toxicològics en el desenvolupament animal que requerien més estudis. Concretament, l'Agència Nacional de Seguretat Sanitària de França (ANSES) publicà que alguns efectes havien estat provats en animals i podrien donar-se en humans a nivells d'exposició inferiors al valor màxim acceptat del moment. D'aquesta forma, no es recomanava l'exposició a cap dels sectors de la població més sensibles, com els infants i les dones embarassades.

La manca d'estudis respecte altres plastificants i la toxicitat demostrada d'alguns d'ells augmenta l'interès per aquest tipus de compostos i com poden migrar dels envasos a l'aliment. L'estudi dels diferents materials i condicions amb les quals es fabriquen i s'emmagatzemen poden ser claus a l'hora de reduir el procés de migració i assegurar la qualitat alimentària.

1.5 Metodologia analítica

Existeixen diversos mètodes analítics per a determinar la presència de plastificants en mostres ambientals o alimentàries. Aquest tipus de mostres es caracteritzen per la seva complexitat, causada per la presència de components com la matèria orgànica, lípids, sals, metalls, etc, que poden interferir en la determinació d'aquests contaminants. A més, les begudes refrescants tenen un elevat contingut en sucres (entre 10 i 30 g per cada 100 mL del refresc) i extractes de fruites, que poden arribar al 20% en molts casos, fet que representa un problema addicional tant durant el procés d'extracció com d'anàlisi. Siguin mostres ambientals o alimentàries, els mètodes persegueixen els mateixos objectius: unes bones recuperacions dels plastificants en el procés d'extracció, un elevat grau de preconcentració (per tal de disminuir els límits de detecció) i una alta selectivitat que permeti la identificació dels diferents compostos amb elevada fiabilitat, sobretot perquè les mostres presenten substàncies orgàniques

complexes que podrien interferir fàcilment en la identificació i quantificació dels anàlits. La metodologia a emprar ha de tenir en compte la preparació (tècniques d'extracció i/o preconcentració), separació analítica i detecció.

1.5.1 Extracció i anàlisi

Degut que els contaminants sovint es troben a nivells traça en matrius ambientals i en begudes, és necessari preconcentrar els anàlits i eliminar possibles interferències de la matriu. La raó principal de la preconcentració és augmentar la concentració dels contaminants d'una mostra reduint un volum elevat d'aquesta (entre 100 i 1000 mL) a un volum molt petit (entre 100 i 1000 µL), permetent la detecció a nivells traça. La tècnica d'extracció que permeti la preconcentració ha de ser el més simple i fiable possible, ràpida i robusta, i també que redueixi al mínim la generació de residus. S'han descrit nombrosos mètodes que permeten l'anàlisi de plastificants a nivells traça, malgrat que la majoria estan enfocats a una sola família química i hi ha pocs estudis que facin anàlisi multiresidual de diversos tipus de plastificants.

La selecció de la tècnica d'extracció més idònia ha de tenir en compte múltiples factors, i un dels més importants són les propietats fisicoquímiques dels anàlits, especialment la volatilitat, la polaritat i la solubilitat que poden jugar un paper important en l'eficàcia final del mètode. Hi ha diversos mètodes d'extracció, com l'extracció líquid-líquid (LLE), l'extracció en fase sòlida (SPE), els QuEChERS (de l'anglès "Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe", ràpid, fàcil, barat, efectiu, robust i segur), la microextracció en fase sòlida ("solid phase microextraction" o SPME), extracció per adsorció en stir-bar o barres giratòries (SBSE) i extracció mitjançant sistemes micel·lars. Pel que fa a la detecció, la determinació analítica de plastificants en aigües o begudes refrescants requereix de tècniques d'elevada precisió i exactitud, i per tant han de tenir una elevada

sensibilitat i selectivitat. Els mètodes desenvolupats han de tenir per tant el límit de detecció més baix que sigui possible. Pel que fa als plastificants, les tècniques més àmpliament emprades són la cromatografia de líquids (LC) i la cromatografia de gasos (GC), les quals poden ser acoblades a diversos detectors per identificar i quantificar els diferents anàlits. Per identificar de forma inequívoca els diferents compostos, cal l'ús d'altres tècniques analítiques que proporcionin informació estructural i permetin confirmar la presència d'un determinat compost sense risc d'interferències o coelucions, que poden afectar la quantificació final. A continuació es descriuen els diferents mètodes d'extracció agrupats segons la tècnica de detecció.

L'extracció líquid-líquid (LLE) és una de les tècniques més clàssiques però que encara s'utilitza per l'anàlisi de compostos orgànics poc volàtils en mostres aquoses. Aquesta tècnica presenta bons resultats de recuperació, però és molt lenta. A més, és de difícil automatització, de manera que el processat d'un elevat nombre de mostres pot alentir el procés considerablement. Un dels inconvenients per aquelles mostres que contenen matèria grassa o sucres, és la formació d'emulsions i escumes, fet que requereix d'un tractament posterior, ja sigui afegint sals o centrifugant els extractes. Per aquest motiu, la reproductibilitat d'aquests mètodes sol ser baixa. La LLE actualment és una tècnica poc utilitzada, bàsicament per les facilitats que ofereixen altres tècniques com la SPE, en quant a la possibilitat d'assolir nivells de preconcentració molt més elevats. Aquest mètode s'utilitza conjuntament tan amb GC com LC.

Alguns estudis utilitzen la GC ja que la majoria dels plastificants, especialment els ftalats i els alquilfenols de cadena curta i mitjana, tenen una elevada volatilitat (Quintana et al., 2007). El DMP, DEP, DBPP i DEHP van ser analitzats mitjançant LLE-GC amb detector d'ionització de flama ("flame ionization detector", FID), obtenint recuperacions entre 80 i 110%, però amb MDLs entre 1461 i 4017 ng L⁻¹, molt elevats degut a la baixa sensibilitat (Adeniyi et al., 2011). Ara bé, la majoria

d'estudis utilitzen la MS per la seva elevada sensibilitat i capacitat d'identificació. La LLE-GC-MS ha permès detectar NP i OP al riu amb MDLs de 100 i 5 ng L⁻¹, respectivament (Micić i Hofmann, 2009). Per altra banda, Oh et al. (Oh et al., 2009) van estudiar tant el BPA com alguns APs (HP, OP, NP i 4TBP) en aigües de riu, i les recuperacions van ser entre el 80-110%.

La LLE unida a LC també s'utilitza per l'anàlisi de plastificants, i en aquest cas, els detectors més habituals són UV i MS. La LLE-LC-UV té com a principal problema uns límits de detecció molt elevats. S'ha emprat per analitzar el DMP, DEP, BBP i DBP en aigües de riu, com el Babolrood (Iran), amb MDLs entre 220 i 300 ng L⁻¹ (Hadjmohammdi et al., 2011). Al riu Xiangjiang (Xina), es van detectar el DMP, DEP i BBP a concentracions de 680, 1050 i 1360 ng L⁻¹, respectivament. Es va emprar una columna de C18 de 250 x 4,6 mm (5 µm) i la repetitivitat del mètode va ser molt bona, amb valors entre el 2,2 i el 3,7% (Zhang et al., 2011). La LLE-LC-MS s'ha aplicat especialment a begudes refrescants, i el plastificant més estudiat és el BPA. Ballesteros-Gómez et al. (Ballesteros-Gómez et al., 2009) van analitzar BPA emprant com a agent extractor solvents supramoleculars en sodes i tes i amb un MDL de 215 ng L⁻¹. El BPA també s'ha analitzat de forma conjunta amb el NP en mostres de sodes, extretes mitjançant embuts de decantació i diclorometà com a solvent. Els MDLs van ser de 3 ng L⁻¹ pels dos compostos.

L'extracció en fase sòlida ("solid-phase extraction" o SPE) permet extreure contaminants orgànics poc o gens volàtils de matrius aquoses. Les fases sòlides emprades poden ser molt diverses, i la quantitat de l'adsorbent pot variar de 30 mg a 2 g segons el factor de preconcentració que es requereixi, que pot ser entre 100 i 5000 vegades, nivells que fan possible l'anàlisi de traces. Aquesta tècnica permet emprar tant dissolvents polars com apolars per a la recuperació dels anàlits adsorbits, i és compatible tant amb la cromatografia de líquids com amb la de gasos. Actualment molts estudis relacionats amb l'anàlisi de plastificants en aigües utilitzen aquesta tècnica d'extracció ja que ofereix molt bones

recuperacions per a un elevat número de plastificants (Céspedes et al., 2005; Liou et al., 2014; Matamoros et al., 2010; Rocha et al., 2014) i això fa possible extreure de manera simultània compostos amb diferents polaritats, gràcies a la utilització de solvents adequats. Aquest tipus d'extracció s'empra conjuntament tant amb GC com LC, i ambdues tècniques són les més habituals per l'anàlisi de plastificants en matrius ambientals i alimentàries.

Respecte la SPE-GC, l'analitzador emprat per excel·lència és MS. Matamoros et al. (Matamoros et al., 2010), emprant acetat d'etil i posterior anàlisi per GC, van obtenir recuperacions properes al 100% per 18 plastificants (com el BPA, NP i DEP) d'un total de 97 compostos analitzats que van incloure herbicides, triazines, organofosforats i hidrocarburs aromàtics policíclics. Per altra banda, el BPA es va analitzar al riu Langat (Malàisia) i es va obtenir una recuperació del 97% utilitzant cartutxos de C18 de 200 mg amb l'elució d'una mescla d'acetona i hexà (1:1) (Santhi et al., 2012). Möder et al. (Möder et al., 2007) van analitzar el BPA i el NP al riu Saale (Alemanya) emprant cartutxos C18 i l'elució amb MeOH, mitjançant l'anàlisi GC, amb recuperacions del 71% pel BPA i del 119% pel NP. Al riu Mondego (Portugal), es van analitzar l'OP, NP i BPA utilitzant cartutxos Oasis HLB de 200 mg, i mitjançant l'elució amb diclorometà i metanol (1:1) les recuperacions van ser entre el 80 i el 100% (Rocha et al., 2014). Els cartutxos Oasis HLB tenen una elevada capacitat de retenció i de preconcentració tant de compostos polars com apolars i per tant, són aptes per la preconcentració de volums grans d'aigua. Per aquesta raó, s'han utilitzat per l'anàlisi de plastificants en aigua potable, on les concentracions són més baixes. Geens et al. (Geens et al., 2010) analitzaven BPA en begudes de soda, coles i tòniques, entre d'altres, del mercat belga, i van aplicar una neteja amb 3 mL d'aigua milli-Q després de preconcentrar la mostra i abans de l'assecat, obtenint recuperacions del 95%. Aquest protocol de neteja simple va permetre eliminar les interferències produïdes per la matriu.

La SPE i anàlisi per LC-UV s'ha utilitzat de manera esporàdica. Es va analitzar BPA en mostres de sodes i tes en llauna i en plàstic, amb un MDL de 3 ng L^{-1} que va ser possible gràcies a l'elevada preconcentració de les mostres (Li et al., 2014a). Ara bé, la SPE-LC-MS és la tècnica més habitual per analitzar plastificants en aigua de riu i de distribució. A la Taula 6 s'indiquen els compostos analitzats, el volum d'extracció, l'eluent, els cartutxos i les recuperacions dels diversos mètodes de SPE-LC-MS per aquests tipus de matriu.

Com es pot desprendre de la Taula 6, els volums d'extracció són entre 500 i 1000 mL, per tal d'assegurar una elevada preconcentració, i per tant, un baix MDL. De forma excepcional, Loyo-Rosales et al. (Loyo-Rosales et al., 2003) van extreure 4000 mL preconcentrant a un volum final d'1 mL. D'aquesta forma els MDLs pels alquilfenols van ser inferiors a $0,3 \text{ ng L}^{-1}$, dels més baixos descrits a la bibliografia. Fan et al. (Fan et al., 2013), en canvi, van extreure només 100 mL i van preconcentrar també a 1 mL, amb un MDL pel NP de $2,4 \text{ ng L}^{-1}$. Aquest valor tan baix s'explica gràcies al poc efecte matriu que presenta l'aigua d'aixeta que s'analitza, lliure de matèria orgànica comparada amb l'aigua de riu. Els cartutxos més habituals són els C18 i els Oasis HLB, amb els quals s'observen recuperacions superiors al 60% per tots els plastificants. Els eluents utilitzats són molt variats, encara que el MeOH, el DCM i l'acetona són els més comuns. L'anàlisi de l'OP, NP, BPA, DEP, DEHP i DBP en el riu Llobregat mitjançant cartutxos de C18 de 500 mg amb ACN com únic eluent, van donar recuperacions properes al 100% per tots els compostos (Céspedes et al., 2005). Liou et al. (Liou et al., 2014) van quantificar el BBP, DBP, DEHP, DEP i DMP en aigua d'aixeta d'una ciutat costera xinesa amb cartutxos Oasis HLB i l'elució es va realitzar únicament en MeOH, amb recuperacions que van oscil·lar entre el 80 i el 120% mitjançant la tècnica SPE-LC-MS/MS.

Taula 6. Compostos analitzats, volum d'extracció, eluent, cartutxos i recuperacions dels mètodes SPE-LC-MS per l'anàlisi de plastificants en mostres d'aigua de riu i aixeta.

Compostos	Volum d'extracció (mL)	Eluent	Cartutx	Recuperacions (%)	Referència
<i>Rius</i>					
APs	4000	DCM, MeOH, Acetona	C18	63-120	(Loyo-Rosales et al., 2003)
APs i BPA	1000	MeOH	EDS-1 (polímer)	82-108 (OP: 28)	(Furuichi et al., 2004)
BPA	500	MeOH	C18	81	(Rodríguez-Mozaz et al., 2004)
APs, PAEs i BPA	500	ACN	C18	62-102	(Céspedes et al., 2005)
APs, PAEs i BPA	500	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (9:1)	C18	62-102	(Céspedes et al., 2006)
APs i PAEs	500	MeOH	Oasis HLB	73-104	(Gasperi et al., 2009)
APs i BPA	1000	MeOH	Oasis HLB	72-140	(Sodré et al., 2010b)
APs, PAEs i BPA	500	Acetat d'etil	C18	92-93	(Moreira et al., 2011)
APs i BPA	500	MeOH	HLB	54-104	(Gorga et al., 2013)
APs i BPA	500	MeOH	EDS-PAK	85-110	(Camilleri et al., 2015)
<i>Distribució</i>					
NP	100	DCM, MeOH, Acetona	C18	79-88	(Petrović et al., 2003)
APs i BPA	200	ACN	Oasis HLB	87-103 (NP: 17)	(Stavarakakis et al., 2008)
BPA	250	Hexà:DCM (1:1)	C18	78-99	(Dupuis et al., 2012)
NP i BPA	100	MTBE:MeOH (1:1)	Oasis HLB	73-123	(Fan et al., 2013)
APs i BPA	1000	Acetat d'etil:MeOH (1:1)	C18	72-125	(Maggioni et al., 2013)
APs i BPA	1000	DCM, MeOH, Acetona	Oasis HLB	89-101	(Colin et al., 2014)
PAEs	500	MeOH	Oasis HLB	80-120	(Liou et al., 2014)
APs i BPA	500	DCM, MeOH	Oasis HLB	75-110	(Staniszewska et al., 2014)
PAEs	1000	MeOH	Oasis HLB	94-100	(Yang et al., 2014a)

En aigües de distribució procedents d'una potabilitzadora propera a París es van determinar el NP, OP i BPA utilitzant Oasis HLB i elució amb acetonitril, i van obtenir unes recuperacions del 95% pel BPA i del 98% per l'OP, mentre que el NP només es va recuperar en un 20%. Aquest baix percentatge l'atribueixen a l'efecte matriu (Stavrakakis et al., 2008). Moreira et al. (Moreira et al., 2011), van estudiar la presència de BPA, NP i DEP en el riu das Velhas (Brasil) mitjançant HPLC-MS/MS, i van obtenir MDLs de 0,8, 1,2 i 1,3 ng L⁻¹ i recuperacions entre el 92 i 93% emprant una columna C18 de 100 x 2,1 mm (3 µm). El volum d'extracció va ser de 500 mL i el volum final d'1 mL, utilitzant cartutxos de C18 i acetat d'etil com eluent.

La cromatografia líquida d'ultraelevada eficàcia (UHPLC), gràcies al seu empaquetament i una mida de partícula molt baixa (menor de 3 µm), permet una millor separació i resolució dels pics. Es van analitzar BPA, OP i NP en aigua del riu Vístula, a Polònia, mitjançant una columna de C18 de 150 x 2,1 mm (1,9 µm) i els MDLs van ser entre 1,2 i 1,5 ng L⁻¹. Es va preconcentrar un volum de 500 mL a 1 mL mitjançant cartutxos Oasis HLB amb DCM i MeOH com eluents, i les recuperacions van ser entre 75 i 110% (Staniszewska et al., 2014). Al riu Atibaia, a Brasil, es va analitzar OP, NP i BPA (Sodré et al., 2010b) amb MDLs de 0,1 ng L⁻¹ pels APs, i de 1,2 ng L⁻¹ pel BPA, molt baixos gràcies a la selectivitat del QqQ, i només es va detectar el BPA entre 25 i 84 ng L⁻¹. Furuichi et al. (Furuichi et al., 2004) van analitzar OP, NP i BPA al riu Tama (Japó), i van obtenir MDLs de 2, 12 i 5 ng L⁻¹. En aigua potable, procedent d'una potabilitzadora a França també es va obtenir un bon MDL pel BPA, de 0,5 ng L⁻¹ (Dupuis et al., 2012), i es va detectar entre 2 i 17 ng L⁻¹. En tots aquests casos, els MDLs van ser molt baixos, i es van situar entre 0,1 i 13 ng L⁻¹ pels diversos plastificants, encara que pel NP existeixen valors més elevats deguts als problemes amb els blancs, com són els MDLs de 25 ng L⁻¹ (Gasperi et al., 2009) i 100 ng L⁻¹ (Colin et al., 2014).

Per augmentar la sensibilitat del mètode a nivells d'ultra traça, la SBSE ("stir-bar sorbent extraction", o extracció per sorbent de barra giratòria) proporciona elevats rendiments d'extracció ja que la totalitat de la mostra extreta és analitzada. S'ha fet servir per l'anàlisi de begudes refrescants. Braunrath et al. (Braunrath et al., 2005) van analitzar BPA begudes energètiques, coles i sodes, amb un MDL de 100 ng L^{-1} , en canvi Cacho et al. (Cacho et al., 2012) van obtenir un MDL de $2,5 \text{ ng L}^{-1}$ pel mateix compost, i de $0,9 \text{ ng L}^{-1}$ per la BP, en mostres de sodes, coles, tes, tòniques i isotòniques.

Per altra banda, la SPE en línia permet una extracció molt ràpida que es realitza en una columna de C18 o polimèrica que s'acobla on-line amb el sistema LC-MS. Com que tots els anàlits preconcentrats s'elueixen i es detecten, la quantitat de mostra necessària és de volums molt petits, entre 5 i 100 mL. A més, com que la preconcentració es realitza de forma automàtica, la reproductibilitat és molt gran. S'ha emprat per analitzar BPA en mostres de begudes de soda, coles, tòniques i tes acoblada a LC-MS, amb un MDL de 25 ng L^{-1} . Les recuperacions es van situar entre 85 i 100% i només s'analitzava 1 mL de mostra en un cromatograma de 3 min. El mètode va permetre obtenir una precisió superior al 93% (Gallart-Ayala et al., 2011).

Degut als bons paràmetres de qualitat obtinguts mitjançant la SPE-LC-MS, com per exemple els baixos MDLs o les recuperacions majors al 70% en la majoria de plastificants, es va seleccionar aquesta tècnica per a l'anàlisi de plastificants en el transcurs d'aquesta tesi.

QqQ vs QqTOF

En els darrers anys, per tal d'aconseguir una major sensibilitat i selectivitat, s'utilitza de manera extensa la MS en tàndem (MS/MS). La MS d'elevada

resolució també juga un paper essencial. En aquest cas, la sensibilitat que es pot arribar a aconseguir és molt més gran, així com el poder de resolució i la selectivitat. Això permet valors molt propers a la massa exacta així com analitzar rangs de m/z més amples, amb una gran precisió fins i tot en el mode d'escombratge, però es necessita d'un calibratge periòdic. Aquestes són les dues tècniques que s'han optimitzat en el marc d'aquesta tesi per a determinar la presència de plastificants en mostres ambientals i en begudes refrescants.

Els analitzadors tipus quadrupol destaquen per la seva mida compacte, la velocitat d'escombratge, l'elevada eficiència de transmissió i també perquè no requereixen d'un buit perfecte. La majoria estan limitats a una resolució unitària en la relació massa càrrega i un rang de masses de m/z 1000-2000, encara que alguns permeten arribar fins m/z 4000. Els compostos s'identifiquen segons la caracterització de l'ió molecular i dos ions fragments propis, els quals, units amb el temps de retenció donen suficient informació per la identificació dels compostos. No obstant, els problemes més importants són la coelució i la presència d'interferències degudes a la matriu, així com la dificultat de la identificació de compostos que presenten poca fragmentació. El QqQ està proveït d'una elevada selectivitat i capacitat de quantificació, gràcies a 4 modes d'adquisició: escombratge d'ions producte, escombratge d'ions precursors, escombratge de pèrdues neutres i monitorització de reaccions múltiple (Núñez et al., 2005). Per l'anàlisi dels plastificants mitjançant LC-MS/MS, el triple quadrupol és el principal analitzador, tal com s'ha descrit a l'apartat 1.5.1.

Per altra banda, l'analitzador QqTOF destaca principalment per la seva elevada resolució, permetent així la detecció de forma pràcticament inequívoca de qualsevol anàlit orgànic. Una de les aplicacions més emprades és la identificació de productes de transformació o degradació per la seva capacitat de calcular la massa elemental i proposar una estructura empírica. Gràcies a la massa exacte i a la fragmentació que aquest analitzador permet, juntament amb les biblioteques

d'espectres, es pot confirmar la composició i estructures de compostos, els quals no es disposen com a patrons. A diferència del QqQ, l'HRMS amb un QqTOF permet la construcció de cromatogrames amb intervals de massa per sota de la unitat, el que resulta en una millor relació senyal soroll (Bocxlaer et al., 2005). A la Taula 7 es poden observar les característiques principals dels instruments QqQ i QqTOF.

Taula 7. Característiques dels equips QqQ i QqTOF.

	QqQ	QqTOF
Rang de masses (m/z)	2 a 2000	2 a 6000
Velocitat d'escombratge	10000 Da s ⁻¹	12500 Da s ⁻¹
Precisió	bona	excel·lent
Linealitat	bona	bona
Sensibilitat	excel·lent	bona
Fragmentació MS/MS	si	si
Base de dades	no	si

Com s'observa a la Taula 7, els analitzadors QqTOF presenten un rang de masses superior al QqQ, encara que ambdós presenten velocitats d'escombratge similars. El rang superior de masses permet l'anàlisi de compostos d'elevat pes molecular. Respecte la precisió, linealitat i sensibilitat, els dos analitzadors tenen bones prestacions, igual que la capacitat de fragmentació. Ara bé, el QqTOF permet la creació de bases de dades, que unit amb l'elevada resolució, permet la identificació de compostos desconeguts.

Els QTOF-MS poden operar emprant els experiments d'adquisició depenent de la informació ("information dependent acquisition" o IDA), un software que selecciona automàticament els ions de gran intensitat en el mode escombratge, però amb la limitació que només els compostos intensos i ben resolts poden ser reconeguts i analitzats. En un experiment IDA, el major avantatge és que en només un anàlisi, l'espectre d'ions producte es pot generar dels ions precursors

que són desconeguts amb antelació. A més, l'adquisició de dades és tan ràpida que precursors múltiples que coelueixen poden ser monitoritzats de forma simultània. Gràcies a aquest analitzador es pot conèixer la fragmentació dels ions que es decideixi i d'aquesta forma, fer propostes d'estructures químiques més acurades. Els espectròmetres de masses QTOF es poden emprar per quantificar amb una bona linealitat de més de 3 ordres de magnitud i amb una bona sensibilitat, encara que menor que els instruments QqQ. Malgrat això, existeixen algunes limitacions, especialment quan múltiples ions precursors coincideixen en un temps de retenció pròxim.

El QqTOF té com aplicació més comú l'anàlisi qualitatiu, com el d'identificació, i en menor mesura el de quantificació. De fet, a la bibliografia no es troben exemples on el QqTOF s'utilitzi per la quantificació dels plastificants en mostres ambientals. Per altra banda, l'HRMS s'utilitza en alguns casos per determinar productes de degradació. Pels plastificants i monòmers, l'Orbitrap s'ha utilitzat per la identificació dels fotoproductes del BPA (da Silva et al., 2014). L'elevada resolució va permetre identificar la massa exacta dels compostos formats en determinades condicions i d'aquesta forma determinar les reaccions i les cinètiques del procés de degradació.

1.5.2 Paràmetres de qualitat

L'anàlisi de manera precisa i exacta dels plastificants i BPA requereix d'un adequat control de qualitat del mètode analític. Els paràmetres de qualitat del mètode proporcionen la informació necessària per avaluar les prestacions del mètode analític, però en el cas de l'anàlisi de plastificants, cal un control rigorós de la presència dels diferents compostos en els blancs de mètode, ja que els plastificants es troben presents degut a la seva ubiqüitat.

Els paràmetres de qualitat s'han de mesurar a partir de mostres fortificades i patrons comercials d'elevada puresa, i el mètode de patró intern és el més indicat per corregir les variacions tant durant el procés d'extracció com durant l'anàlisi per LC-MS. Cal assegurar la linealitat del mètode dins l'interval de treball que correspon a nivells entre ng L^{-1} i $\mu\text{g L}^{-1}$, i mitjançant la quantificació amb patrons interns, cal calcular el factor de resposta de cada compost. Les recuperacions s'estudien a diferents nivells de fortificació tenint en compte els nivells dels contaminants en cada matriu, així que les matrius d'aigua potable tenen concentracions més baixes, normalment per sota de 500 ng L^{-1} , mentre que per riu i begudes refrescants, aquestes poden superar els 10000 ng L^{-1} , especialment l'aigua de riu. Per tal que el mètode sigui robust i permeti l'anàlisi de plastificants i BPA en diverses mostres ambientals, cal assegurar la repetitivitat i reproductibilitat de manera que es tinguin valors el més baixos possibles, preferiblement inferiors al 20%. Finalment, en l'anàlisi de traces és indispensable obtenir una bona sensibilitat, que es calcula a partir dels límits de detecció instrumentals i els metodològics. Mentre que els primers proporcionen informació sobre la quantitat més petita de cada anàlit que pot detectar la instrumentació analítica, el segon indica el nivell més baix que es pot detectar tenint en compte tota la metodologia d'extracció, considerant el factor de preconcentració. En conjunt, és essencial que la metodologia que es desenvolupi sigui suficientment robusta perquè es pugui aplicar a altres laboratoris i compleixi els criteris de qualitat que garanteixin la fiabilitat dels resultats obtinguts.

Una de les problemàtiques més grans en l'anàlisi d'ftalats rau en la impossibilitat d'evitar la seva presència en els blancs de mètode. Això pot produir una sobreestimació de les concentracions que es detecten. Els blancs han d'estar ben controlats per tal d'evitar els falsos positius. Normalment, la contribució externa de plastificants a les mostres es deu a la seva presència en els dissolvents, els reactius, l'equipament del laboratori, els instruments analítics i inclòs l'atmosfera

del laboratori juga un paper important (Capdeville i Budzinski, 2011). Molts estudis que analitzen ftalats en aigües no tenen en compte aquesta contribució externa i fan servir els límits de detecció instrumentals per definir el llindar de detecció del seu mètode. Però aquests estudis generen dades que fàcilment poden estar sobreestimades. Existeix certa discrepància de com cal tractar la contribució dels blancs en el mètode analític. Hi ha estudis que suggereixen que s'han d'indicar els valors de blancs i aquests no s'han de restar dels valors determinats en les mostres (Capdeville i Budzinski, 2011).

Un primer criteri que s'adopta és determinar els MDL a partir de la contribució dels blancs, que es calcula a partir de la contribució dels diferents compostos en els blancs de mètode i a partir d'aquí es calcula la mitjana d'aquesta contribució més 3 vegades la desviació estàndard. En el segon criteri, el MDL correspon a la desviació estàndard de la resposta d'injeccions successives de 7 a 10 replicats d'una mostra espicada a concentracions molt baixes, multiplicada per un factor de confiança. El tercer criteri implica la realització d'una corba de calibratge, com indica Wenzel et al. (Wenzel et al., 2003), els quals van determinar els MDL d'alquilfenols polietoxilats segons un interval de confiança del 99% en la corba de calibratge a partir d'aigua subterrània fortificada.

Per exemple, per l'anàlisi d'ftalats en aigua potable (Dévier et al., 2013) es van mesurar diversos blancs als quals s'aplicaven les mateixes condicions que les mostres. Els nivells que es van trobar es van emprar per estimar els límits de quantificació, emprant una relació de 10 entre les respostes dels anàlisis i els respectius blancs. En el cas de NP i BPA, que també van ser detectats en els blancs, els MDL es van calcular emprant els valors del blanc, assumint almenys una relació S/N de 3. Els IDL de NP i BPA, van ser de 5 i 1 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivament, mentre que els MDL, recalculats a partir del primer criteri descrit, van ser de 10 ng L^{-1} per ambdós compostos (Dévier et al., 2013). Nerín et al. (Nerín et al., 1993) van observar contaminació de DEHP en totes les anàlisis d'aigua, i ho van atribuir

a les xeringues de plàstic, sèptums, llana de vidre i altres materials d'ús comú al laboratori utilitzats en l'anàlisi i suggereixen evitar aquests tipus de material i substituir-los, sempre que sigui possible, per vidre.

A part, l'atmosfera del laboratori i la zona de treball poden també contribuir en els nivells de blancs (Fromme et al., 2002; Guart et al., 2014b). S'ha descrit que una neteja impecable del laboratori en general, especialment en la zona de la campana extractora que s'ha de netejar amb acetona, fa disminuir els nivells d'ftalats en els blancs metodològics. Un altre factor important és eluir amb el volum de dissolvent més petit possible, ja que un cop preconcentrat, els residus presents en el dissolvent també es preconcentren i contribueixen en gran mesura a la presència en els blancs o mostres (Thompson et al., 1996).

Així, malgrat que els blancs mai estan exempts de plastificants, es pot controlar la seva presència i variació al llarg d'un grup de mostres. A partir dels valors de blanc, els diferents estudis recomanen calcular els límits de detecció reals, ja que els límits de detecció instrumentals són molt baixos i no es corresponen amb la realitat. Guart et al. (Guart et al., 2014a) van calcular els MDLs a partir de la mitjana aritmètica dels blancs més 3 vegades la desviació estàndard, donant valors entre 10 i 460 ng L⁻¹ pels ftalats. Aquests valors són bastant més alts que els reportats en altres estudis (Capdeville i Budzinski, 2011; Peñalver et al., 2001) però permeten la quantificació dels ftalats en mostres sense necessitat de sostreure els nivells de blanc.

Si es mira de forma conjunta, l'anàlisi de plastificants i de BPA en mostres ambientals i en begudes refrescants requereix d'un esforç analític, tant durant l'extracció com durant l'anàlisi, ja que l'anàlisi a nivell traça d'aquests compostos es veu dificultat per els problemes de blancs i pels problemes relacionats amb les matrius, especialment aquelles que contenen elevades concentracions de sucres. A més, cal afegir que malgrat hi ha compostos com el NP i l'OP que fa dècades

que s'estan estudiant i que la seva determinació analítica no representa cap problema, hi ha altres plastificants que es podrien catalogar dins de contaminants emergents que no han estat caracteritzats analíticament i que a part, no s'ha estudiat la seva presència al medi ambient ni el seu comportament. Finalment, el coneixement sobre la presència d'aquests compostos en begudes és un tema nou i cal incidir de forma estricta per conèixer la problemàtica relacionada amb la migració de plastificants en begudes refrescants.

2. Objectius

L'objectiu principal d'aquesta tesi és avaluar la presència, distribució i comportament dels monòmers o additius de plàstic en mostres aquoses d'origen ambiental i alimentari. Els compostos objecte d'estudi són el bisfenol A, la benzofenona, 12 alquilfenols de cadenes de 4 fins a 12 carbonis, 5 ftalats, el DEHA i l'ATBC. Especialment, els alquilfenols de cadena curta i llarga han estat molt poc estudiats fins ara. La utilització de monòmers del plàstic i plastificants, àmpliament extensa en la indústria i en l'ús domèstic, fa que siguin uns compostos de gran interès degut a la seva toxicitat i propietats de disrupció endocrina. Seguint aquests criteris, els objectius específics van ser els següents:

1. Desenvolupar un mètode analític multiresidual basat en la cromatografia de líquids acoblada a l'espectrometria de masses en tàndem (LC-MS/MS) per l'anàlisi de monòmers i additius del plàstic i avaluar les seves prestacions analítiques.
2. Desenvolupar mètodes d'extracció per l'anàlisi de monòmers del plàstic i plastificants i determinar els paràmetres de qualitat. Segons el tipus de matriu, s'han desenvolupat dues metodologies:
 - 2.1. Extracció en fase sòlida (SPE) i LC-MS/MS per l'anàlisi d'aigües de riu i aigües de distribució.
 - 2.2. Extracció líquid-líquid (LLE) i LC-MS/MS per l'anàlisi de begudes refrescants.
3. Monitoritzar la presència dels plastificants al llarg de la conca del riu Besòs i avaluar el seu impacte mitjançant un estudi de risc.

4. Determinar la presència de plastificants i BPA en aigües de captació de la potabilitzadora de Sant Joan Despí i avaluar l'eficiència del tractament.
5. Analitzar els plastificants presents en begudes refrescants per tal d'avaluar la migració dels envasos que les contenen i els nivells als que es detecten.
6. Avaluar la toxicitat dels plastificants i del BPA emprant com a model d'ecotoxicitat la *Daphnia magna* i com a model de toxicitat humana les cèl·lules cancerígenes de placenta humana JEG-3.
7. Estudiar la fotodegradació del bisfenol A utilitzant llum UV i identificar els productes de degradació formats mitjançant LC-QTOF i avaluar llur toxicitat utilitzant *Daphnia magna*.

3. Desenvolupament analític

La presència dels plastificants i BPA en mostres ambientals i en begudes és un tema que requereix un esforç analític important degut que aquests compostos són difícils d'analitzar, bàsicament perquè estan presents en els blancs i calen metodologies molt específiques. Tal com s'ha descrit a la bibliografia, la majoria d'estudis es centren en la determinació d'una família concreta i no hi ha cap treball que descrigui l'anàlisi multiresidual d'un elevat nombre de plastificants. Aquests tipus d'anàlisi permeten la determinació de compostos amb propietats fisicoquímiques diferents de forma simultània, amb les avantatges que això suposa a l'hora de caracteritzar qualsevol mostra ambiental. Per tal que sigui efectiu, cal que es pugui aplicar a mostres de diferent naturalesa (ambientals, alimentàries, etc). Les metodologies descrites estan centrades específicament a l'anàlisi del NP i l'OP, però no hi ha cap mètode descrit que consideri tota la família d'APs, de cadena de 4 fins a 12 carbonis. Per tant, una contribució important d'aquesta tesi és desenvolupar una metodologia basada en la LC-MS/MS capaç de determinar de forma simultània 21 compostos, incloent els ftalats més utilitzats, alguns substituïts del DEHP que s'empren en la fabricació d'envasos alimentaris i dels APs, incloent els butilfenols fins el DP.

En aquest capítol es descriuen els materials i reactius emprats pel desenvolupament analític així com totes les etapes per portar-lo a terme. En primer lloc, es va desenvolupar la caracterització per cromatografia de líquids i espectrometria de masses, amb els seus respectius paràmetres de qualitat. En segon lloc, es van desenvolupar 2 mètodes d'extracció: un per mostres d'aigua de riu i aigua potable i un per begudes refrescants.

3.1 Materials i reactius

Els patrons es van comprar a diferents cases comercials i sempre van ser d'una elevada puresa. El *Phthalate Mix 525* (500 ng μL^{-1} cadascun, en metanol) que conté dimetil ftalat (DMP), dietil ftalat (DEP), di-*n*-butil ftalat (DBP), butil benzil ftalat (BBP), bis(2-etilhexil) adipat (DEHA) i bis(2-etilhexil) ftalat (DEHP) va ser comprat a Supelco (Bellefonte, PA, Estats Units). El bisfenol A (BPA), 4-heptilfenol (HP), 4-octilfenol (OP) i 4-nonilfenol (NP) van ser subministrats per Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanya) com a productes sòlids. La benzofenona (BP), 2-*sec*-butilfenol (2SBP), 2-*tert*-butilfenol (2TBP), 4-*sec*-butilfenol (4SBP), 4-*tert*-butilfenol (4TBP), 4-*tert*-amilfenol (TAP), 4-cumilfenol (CP), 4-dodecilfenol (DP), 2,6-di-*tert*-butilfenol (DTBP), 2,4,6-tri-*tert*-butilfenol (TTBP) i acetil tributil citrat (ATBC) van ser comprats a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estats Units). El patró intern pels ftalats va ser el dipropilftalat-3,4,5,6-*d*4 de Ridel-de-Haën (Seelze, Alemanya). El patró intern dels alquilfenols va ser 4-*n*-nonilfenol-*d*8 de Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanya) com una solució de 100 ng μL^{-1} en acetona. Finalment, el patró intern del BPA va ser el bisfenol A-*d*16 comprat a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estats Units) com a sòlid. Els dissolvents emprats van ser diclorometà i metanol de qualitat SupraSolv i aigua de qualitat cromatogràfica, subministrats per Merck (Darmstadt, Alemanya). L'aigua milli-Q es va obtenir directament d'un sistema de purificació integral d'aigua de Millipore (Billerica, MA, Estats Units).

Pel desenvolupament del mètode d'extracció, es van emprar 4 tipus diferents de cartutxos per a l'extracció en fase sòlida: Oasis HLB de 200 mg i C18 de 200 mg, de Waters (Milford, MA, Estats Units), Isolute C18 de 200 mg de Biotage (Uppsala, Suècia) i HLB de 200 mg de Scharlab (Sentmenat, Catalunya).

Per l'extracció en fase sòlida es va emprar un sistema de buit Baker (J.T. Baker, Països Baixos) de 24 posicions el qual tenia les claus i tubs de tefló per evitar la

contaminació de les mostres per ftalats. Per l'evaporació de les mostres es va utilitzar un equip Turbo-Vap LV system (Caliper Life Sciences, Regne Unit) de 24 posicions i que funciona sota corrent de nitrogen i a temperatura regulable en el qual s'adapten vials de 40 mL. També es va utilitzar un Reacti-Vap III (Pierce, Estats Units) que permet l'evaporació sota corrent de nitrogen de petits volums de dissolvent i on s'acoblen els vials de cromatografia de 2 mL.

3.2 Caracterització per cromatografia de líquids i espectrometria de masses

Es va desenvolupar un mètode basat en la cromatografia de líquids acoblada a l'espectrometria de masses en tàndem (LC-MS/MS) per a l'anàlisi de plastificants. Es va emprar un cromatògraf de líquids Acquity acoblat a un triple quadrupol TQD (Waters, Estats Units). La columna va ser una Acquity UPLC BEH C18 de 100 x 2,1 mm (1,7 μm), de la mateixa casa comercial, amb la seva respectiva precolumna, VanGuard, de 5 x 2,1 mm i la mateixa mida de partícula que la columna.

La caracterització dels fragments més importants es va fer mitjançant FIA (anàlisi d'injecció en flux, "flow injection analysis"). Així, es va optimitzar el voltatge de con per a cada compost a valors creixents de 5 a 10 V en intervals de 5 V, tant en positiu com en negatiu i es va seleccionar el voltatge que produïa l'ió molecular més abundant. Després, a partir d'aquest valor aproximat es va procedir a afinar la resposta dels diferents anàlits variant el voltatge amb diferències de 1 V. Això va permetre trobar el voltatge òptim per a cada compost. A la Figura 9 es pot veure la corba de voltatges pels diferents compostos. Per posar a punt el mètode MRM, es va seleccionar l'ió molecular de cada compost, es van optimitzar les energies de col·lisió i es van seleccionar 2 ions producte a partir de l'ió molecular.

A la Taula 8 s'indiquen el temps de retenció per a cada compost, l'ió precursor seleccionat amb el seu respectiu voltatge de con, així com dues transicions, la de quantificació i la de confirmació, amb les seves energies de col·lisió corresponents.

Degut a la diferent electronegativitat dels compostos estudiats, l'adquisició es va realitzar en electrosprai positiu i negatiu per tal de tenir la major sensibilitat. En ESI negatiu, es van detectar el BPA i els alquilfenols, degut especialment al seu grup fenòlic. Pel BPA, es va formar el m/z 227 $[M-H]^-$, que va ser escollit com a ió precursor. Els ions productes van ser a m/z 133 i 93, que corresponen a $[M-C_6H_7O]^-$ i $[M-C_9H_{11}O]^-$, respectivament. Aquests ions han estat descrits anteriorment a la literatura (Maggioni et al., 2013; Silva et al., 2005). Les transicions seleccionades es mostren a la Taula 8.

Respecte els APs, els 4 butilfenols estudiats són isòmers estructurals. La posició de la cadena de carboni respecte el fenol pot ser *orto* o *para*, i la forma d'aquesta, *sec* o *tert*. L'ió molecular i pic base per als 4 isòmers va ser el m/z 149 $[M-H]^-$. Pel 4SBP i el 2SBP, només es va generar un ió producte a m/z 119 $[M-C_2H_7]^-$. Per altra banda, el 2TBP i el 4TBP van formar 2 fragments a m/z 133 $[M-OH]^-$ i a m/z 117 $[M-CH_5O]^-$. En ambdós casos, els compostos van poder ser resolts cromatogràficament. Aquest compostos van ser els més polars dels alquilfenols estudiats, i van eluir a temps de 2,88 i 3,31 minuts.

El TAP i el CP, amb una longitud de 5 i 9 carbonis en la cadena, van ser els següents en eluir. L'ió molecular del TAP va ser el m/z 163 $[M-H]^-$ i els ions productes que es van generar van ser el m/z 133 $[C_9H_9O]^-$ i el m/z 117 $[M-C_2H_7O]^-$. El CP va presentar l'ió molecular a m/z 211 $[M-H]^-$. Els ions productes formats van ser a m/z 77 $[C_6H_5]^-$ i a m/z 133 $[C_9H_9O]^-$. L'OP va eluir a 5,77 min i va formar l'ió molecular m/z 205 $[M-H]^-$, el qual va general els ions producte a m/z 133 $[C_9H_9O]^-$ i a m/z 117 $[M-C_5H_{13}O]^-$.

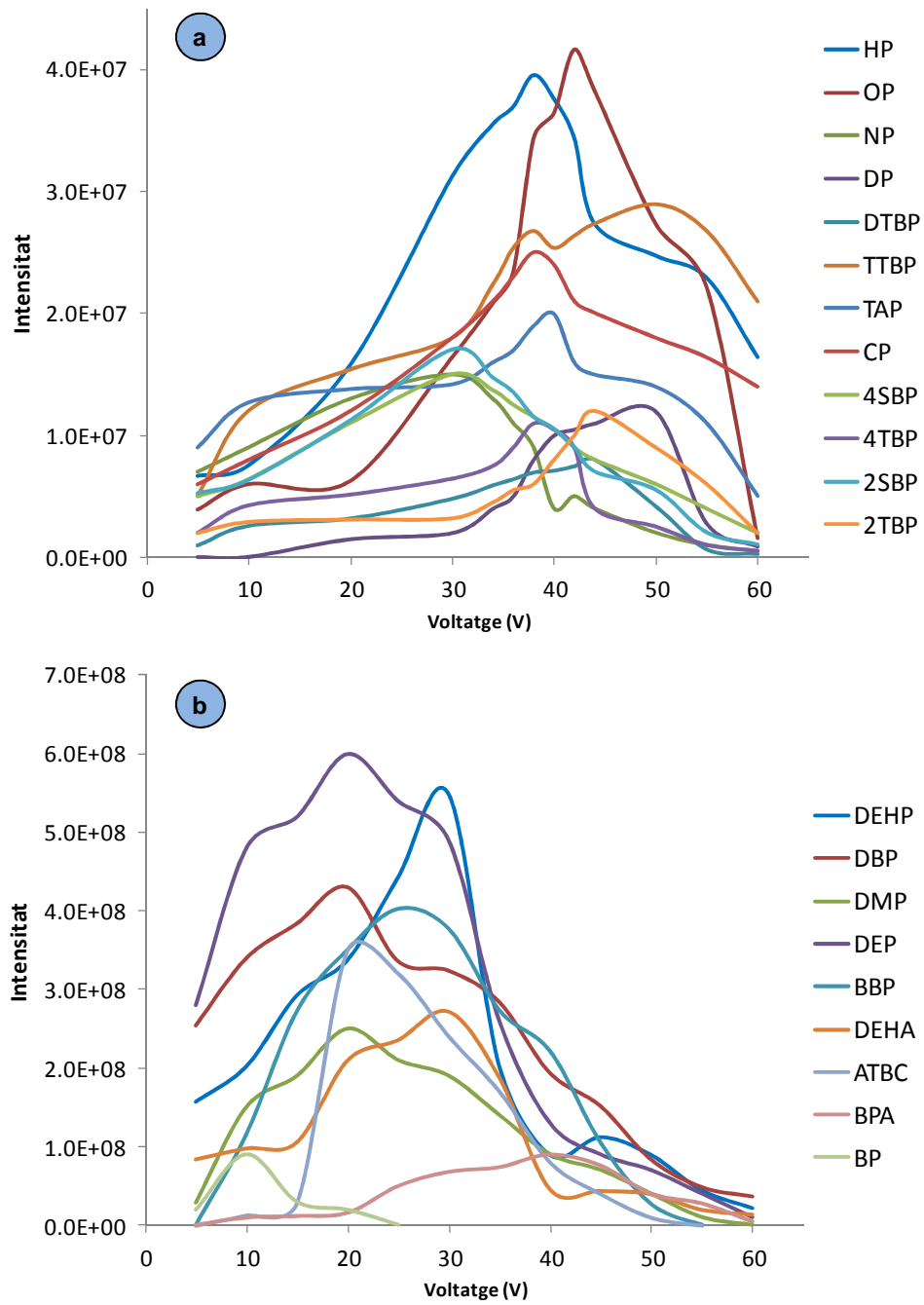


Figura 9. Corba d'optimització del voltatge de con pels alquilfenols en ESI- (a) i els ftalats, adipat, BPA i BP en ESI+ (b).

El HP, amb un ió molecular a m/z 191 $[M-H]^-$, va generar els ions producte a m/z 106 $[M-C_5H_{10}O]^-$ i 119 $[M-C_5H_{13}]^-$. L'ió molecular del NP es va produir a m/z 219 $[M-H]^-$, i els ions productes van ser a m/z 133 $[C_9H_9O]^-$ i 147 $[M-C_4H_9O]^-$. El DP va tenir l'ió precursor a m/z 261 $[M-H]^-$, el qual va produir els ions fragment a m/z 162 $[M-C_6H_{12}O]^-$ i a m/z 133 $[C_9H_9O]^-$. El DTBP i el TTBP van ser els alquilfenols amb doble i triple ramificació, i es van formar els ions moleculars a m/z 205 $[M-H]^-$ i 261 $[M-H]^-$, respectivament. Els ions producte formats van ser a m/z 189 $[M-OH]^-$ i m/z 133 $[C_9H_9O]^-$ pel DTBP i a m/z 245 $[M-CH_4]^-$ pel TTBP. La majoria d'aquestes transicions no han estat descrites prèviament ja que aquests compostos han estat molt poc estudiats i no hi ha cap article científic que desenvolupi un mètode per detectar-los.

Per altra banda, en electrospai positiu, es van estudiar la benzofenona i els ftalats, degut a la baixa resposta que s'observava en el mode negatiu. La benzofenona va formar l'ió molecular protonat a m/z 183 $[M+H]^+$. Els ions producte formats van ser a m/z 105 $[M-C_6H_5]^+$ i a m/z 77 $[C_6H_5]^+$. Aquests ions van ser descrits prèviament per Gallart-Ayala et al. (Gallart-Ayala et al., 2011a).

Els 5 ftalats estudiats van tenir patrons de fragmentació similars als obtinguts en estudis previs (Céspedes et al., 2006). L'ió molecular pel DMP va donar el fragment a m/z 195 $[M+H]^+$, i el fragment a m/z 163 $[M-CH_3O]^+$ es va produir per la pèrdua del grup metoxi de l'éster, mentre que el m/z 77 $[C_6H_5]^+$ va ser originat pel grup benzil. Per DEP, DBP, BBP i DEHP, l'ió molecular protonat es va formar com a pic base, i el fragment a m/z 149 $[C_8H_5O_3]^+$ va ser un ió diagnòstic per a tots ells. Els ions producte per confirmar cada compost van ser el m/z 177 $[M-C_2H_5O]^+$ pel DEP, el m/z 205 $[M-C_4H_9O]^+$ pel DBP, el m/z 91 $[C_7H_7]^+$ pel BBP, i el m/z 167 $[C_8H_7O_4]^+$ pel DEHP. Per aquests compostos, les transicions emprades van correspondre de l'ió molecular a m/z 149, el qual és una transició molt sensible i específica i a l'altre ió específic de cada compost.

Taula 8. Plastificants i monòmers del plàstic analitzats, temps de retenció i condicions d'adquisició per espectrometria de masses en tàndem.

Compost	Temps de retenció (min)	Ió precursor (m/z)	Voltatge de con (V)	Transició de quantificació (m/z) (C.E., eV)	Transició de confirmació (m/z) (C.E., eV)
ATBC	7,73	403 [M+H] ⁺	21	403 → 259 (19)	403 → 185 (21)
DMP	1,59	195 [M+H] ⁺	18	195 → 163 (8)	195 → 77 (28)
DEP	3,25	223 [M+H] ⁺	19	223 → 177 (8)	223 → 149 (19)
DBP	6,67	279 [M+H] ⁺	18	279 → 149 (14)	279 → 205 (9)
BBP	6,58	313 [M+H] ⁺	22	313 → 149 (14)	313 → 91 (16)
DEHA	10,39	372 [M+H] ⁺	32	372 → 147 (11)	372 → 129 (16)
DEHP	9,15	392 [M+H] ⁺	29	392 → 149 (21)	392 → 167 (14)
2SBP	3,02	149 [M-H] ⁻	29	149 → 119 (21)	-
2TBP	3,31	149 [M-H] ⁻	46	149 → 133 (21)	149 → 117 (30)
4SBP	2,88	149 [M-H] ⁻	29	149 → 119 (20)	-
4TBP	2,70	149 [M-H] ⁻	38	149 → 133 (19)	149 → 117 (42)
TAP	3,61	163 [M-H] ⁻	39	163 → 133 (30)	163 → 117 (29)
CP	3,98	211 [M-H] ⁻	38	211 → 77 (26)	211 → 133 (28)
HP	6,14	191 [M-H] ⁻	38	191 → 106 (19)	191 → 119 (38)

Compost	Temps de retenció (min)	Ió precursor (m/z)	Voltatge de con (V)	Transició de quantificació (m/z) (C.E., eV)	Transició de confirmació (m/z) (C.E., eV)
OP	5,77	205 [M-H] ⁻	42	205 → 133 (28)	205 → 117 (46)
NP	6,62	219 [M-H] ⁻	28	219 → 133 (27)	219 → 147 (28)
DP	8,01	261 [M-H] ⁻	47	261 → 162 (9)	261 → 133 (27)
26DTBP	5,76	205 [M-H] ⁻	45	205 → 189 (42)	205 → 133 (46)
TTBP	7,87	261 [M-H] ⁻	50	261 → 245 (28)	-
BP	4,16	183 [M+H] ⁺	12	183 → 105 (16)	183 → 77 (25)
BPA	1,77	227 [M-H] ⁻	39	227 → 133 (40)	227 → 93 (30)
BPA- <i>d</i> 16	1,70	241 [M-H] ⁻	48	241 → 142 (29)	241 → 97 (30)
DPP- <i>d</i> 4	5,08	255 [M+H] ⁺	16	255 → 195 (8)	255 → 153 (13)
NP- <i>d</i> 8	7,43	227 [M-H] ⁻	49	227 → 112 (34)	227 → 126 (24)

Finalment, el DEHA i l'ATBC, les dos alternatives als ftalats, van eluir cap el final del cromatograma. El DEHA va tenir l'ió precursor a m/z 372 [M+H]⁺ i els ions producte a m/z 147 [C₆H₁₁O₄]⁺ i 129 [C₆H₉O₃]⁺. L'ATBC, va formar l'ió precursor a m/z 403 [M+H]⁺ i els ions producte es van formar a m/z 259 [C₁₃H₂₃O₅]⁺ i a m/z 185 [C₇H₅O₆]⁺. Aquests ions han estat descrits prèviament (Bodmeier i Paeratakul, 1991).

Un cop caracteritzada la fragmentació de cada compost, a partir dels ions moleculars i els ions producte, i dels seus respectius voltatges de con i energies de col·lisió, es va establir un mètode de MRM que va permetre augmentar considerablement la sensibilitat i la selectivitat a partir de la monitorització de les transicions seleccionades. La transició més abundant es va escollir com la transició de quantificació, mentre que la segona transició, menys abundant, es va utilitzar com a confirmació.

A la Figura 10 es pot observar els cromatogrames en electrospai (ESI) negatiu i positiu. El flux de treball va ser de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, i el volum d'injecció va ser de $10 \mu\text{L}$. La fase mòbil emprada va ser (A) aigua i (B) metanol, amb un gradient lineal. Aquest va començar amb un 60% d'aigua i un 40% de metanol, que va incrementar a un 100% de metanol en 8 minuts, condicions que es van mantenir durant 2 minuts. Després es va tornar a les condicions inicials en 2 minuts. Del minut 12 al 15 es va deixar establir el sistema. D'aquesta forma, el temps cromatogràfic total va ser de 12 minuts.

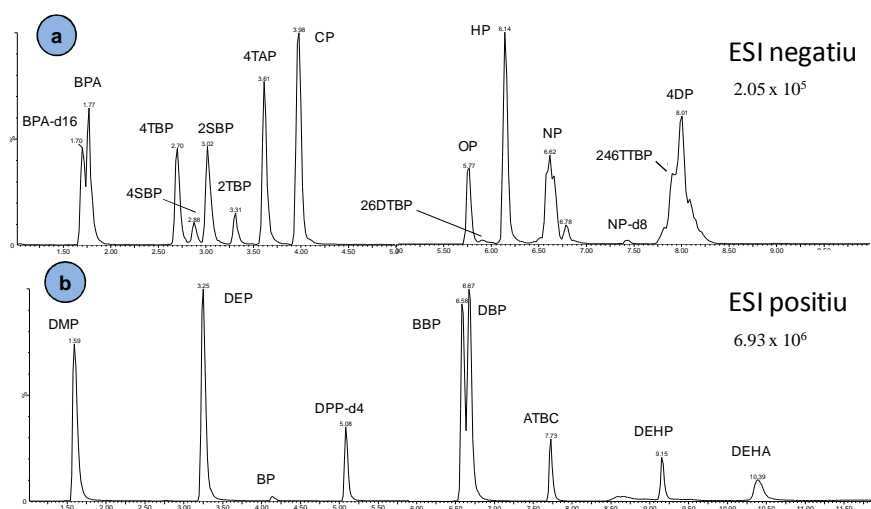


Figura 10. Cromatogrames per LC-MS/MS en ESI negatiu (a) i positiu (b) d'un patró a 100 ng mL^{-1} .

El cromatograma en ESI negatiu mostra el BPA i el seu patró intern corresponent que elueixen a temps de 1,77 i 1,70 minuts, respectivament. A continuació, els alquilfenols van eluir de menor a major longitud de la cadena ramificada i el dodecilfenol, amb una cadena de 12 carbonis va ser l'últim en eluir, al minut 8. Com els APs de cadena curta (butilfenols, TAP i CP) i el BPA van eluir relativament abans que els de cadena més llarga, de l'octilfenol fins al dodecilfenol, es va decidir establir dues finestres d'adquisició de dades. D'aquesta forma, es va programar el MS per tal que del minut 0 al minut 5 analitzés només les transicions corresponents als compostos més polars, amb $\log K_{ow}$ entre 3,08 i 4,17. Per altra banda, del minut 5 fins al final del cromatograma, es van analitzar la resta. Aquesta tècnica permet dedicar més temps d'anàlisi als compostos, i així, augmentar la sensibilitat del mètode. Destacar també que el dodecilfenol és una mescla d'isòmers en el seu format comercial i per aquesta raó el pic cromatogràfic està compost per diversos pics, que correspondrien a diferents isòmers. Aquest efecte també és apreciable en el NP, que presenta dos màxims a temps 6,68 i 6,78 minuts, a causa dels isòmers presents.

Per altra banda, el cromatograma en ESI positiu permet identificar els ftalats i la benzofenona. Com en el cas anterior, es va treballar amb dues finestres d'adquisició. La primera, del minut 1 al 6, correspon al DMP, DEP i BP, compostos de pes molecular menor i major polaritat que fan que elueixin molt més ràpid. La segona finestra es va situar a partir del minut 6 fins al final del cromatograma, per analitzar el BBP, el DBP, el ATBC, el DEHP i el DEHA.

Per determinar la linealitat i sensibilitat del mètode instrumental es va analitzar una recta de calibratge de concentracions de 5 a 500 ng mL⁻¹. La quantificació dels anàlits es va realitzar pel mètode d'estàndard intern, utilitzant el NP-*d*8, el DPP-*d*4 i el BPA-*d*16. La repetitivitat es va estudiar comparant les àrees d'un mateix patró a 100 ng mL⁻¹ en 5 injeccions consecutives, mentre que la reproductibilitat, en 5 injeccions realitzades en dies diferents.

Taula 9. Paràmetres de qualitat dels plastificants.

Compost	Linealitat (ng mL ⁻¹)	Pendent	R ²	IDL (ng)	Repetitivitat (100 ng mL ⁻¹)	Reproductibilitat (100 ng mL ⁻¹)
ATBC	5-500	0,239	0,992	0,005	4,2	14,1
DMP	5-500	1,564	0,997	0,018	4,1	13,3
DEP	5-250	2,886	0,996	0,002	3,0	13,0
DBP	5-250	3,013	0,998	0,014	2,9	12,1
BBP	5-500	0,832	0,993	0,002	6,6	9,0
DEHA	5-500	0,027	0,994	0,009	6,7	8,6
DEHP	5-250	0,075	0,996	0,004	4,2	16,4
2SBP	5-500	1,037	0,998	0,011	4,2	10,8
2TBP	5-500	0,408	0,992	0,013	7,7	8,5
4SBP	5-500	0,331	0,998	0,012	8,5	10,0
4TBP	5-500	1,499	0,996	0,015	5,1	6,8
TAP	5-500	2,253	0,998	0,009	9,2	12,4
HP	5-500	16,426	0,995	0,002	7,1	11,7
OP	5-500	6,152	0,999	0,002	5,2	7,0
NP	5-500	11,892	0,995	0,005	0,4	2,4
CP	5-500	0,524	0,998	0,020	5,3	11,3
DP	5-500	22,498	0,997	0,002	3,0	11,8
26DTBP	5-500	0,326	0,993	0,015	6,5	16,7
246TTBP	5-500	0,465	0,994	0,017	8,7	11,5
BP	5-250	0,117	0,997	0,004	9,3	11,7
BPA	5-500	0,295	0,997	0,010	2,0	5,0

Els paràmetres de qualitat instrumental obtinguts pels diferents compostos es poden observar a la Taula 9. S'indica la linealitat, el pendent de la corba de calibratge, el coeficient de regressió (R^2), el límit de detecció instrumental ("instrumental detection limit", o IDL), així com la repetitivitat i la reproductibilitat.

En general, tots els plastificants es van comportar de forma lineal a concentracions de 5 fins a 500 ng mL⁻¹, exceptuant la BP, el DEP, el DBP i el DEHP, que va ser fins a 250 ng mL⁻¹. Les rectes de regressió també van tenir valors molts propers a 1, indicant una bona linealitat en el rang de concentracions estudiades.

Els límits de detecció instrumentals van ser molt baixos, i van variar entre 0,002 i 0,020 ng, el que destaca la bona sensibilitat del triple quadrupol. Pels ftalats, va variar entre 0,002 i 0,018 ng, pels alquilfenols entre 0,002 i 0,020 ng, i per la BP i el BPA va ser de 0,004 i 0,010 ng, respectivament. Es van calcular emprant una concentració de 5 ng mL⁻¹ per a cada compost i que donessin una relació senyal soroll de 3.

Pel que fa a la repetitivitat i reproductibilitat, on sempre s'esperen valors per sota del 25%, tampoc hi va haver cap valor superior a aquest límit. En tots els casos, la reproductibilitat, mesurada en diferents dies, va ser superior a la repetitivitat, mesurada durant el mateix dia, en tots els casos utilitzant un patró de 100 µg L⁻¹.

3.3 Procediments d'extracció

El sistema d'extracció utilitzat depèn del tipus de mostra que s'analitzi. En aquesta tesi s'han estudiat aigües de riu, de potabilitzadora i begudes refrescants, que tenen una composició i característiques molt diferents i per tant, cal optimitzar i validar el mètode d'extracció per a cada una d'elles. En primer lloc,

per les mostres d'aigua (potable i de riu) es va optimitzar el mètode amb aigua milli-Q fortificada i també utilitzant aigua de riu no contaminada agafada d'un rierol de la Cerdanya. Això va permetre calcular l'efecte matriu. En segon lloc, es va procedir a l'optimització del mètode per l'anàlisi de begudes, una matriu completament diferent a les aigües pel que fa a la seva composició, molt rica en sucres.

3.3.1 Aigua de riu i potable

Les mostres d'aigua es van extreure mitjançant l'extracció en fase sòlida. Aquest és el mètode més àmpliament emprat a la bibliografia i el que permet obtenir millors recuperacions i límits de detecció metodològics baixos (Furuichi et al., 2004; Loyo-Rosales et al., 2003; Quednow i Püttmann, 2008). Es van extreure 200 mL de mostra a un nivell de fortificació de $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$.

Degut que un dels objectius era desenvolupar un únic mètode d'extracció capaç de recuperar tots els anàlits, es van optimitzar les condicions d'elució. Els paràmetres que es van estudiar van ser el tipus de cartutxos i els dissolvents d'elució, que són els dos factors més importants que poden influir en l'eficàcia d'extracció. Es van avaluar les prestacions analítiques de 4 tipus de cartutxos diferents, dos de C18 (de Waters i Isolute) i dos de HLB (de Waters i Scharlab), tots de 200 mg. Respecte els dissolvents d'elució, es van estudiar 3 mètodes d'elució, els quals van ser: (a) una mescla 1:1 de diclorometà i hexà (10 mL) més una altra 1:1 diclorometà i acetona (10 mL), (b) una segona de metanol (10 + 10 mL) i (c) una de metanol amb àcid fòrmic al 0,1 % (10 + 10 mL).

La Taula 10 mostra les característiques de diàmetre de porus, diàmetre de partícula i àrea de superfície per a cada cartutx emprat. D'aquesta forma, gràcies a les seves propietats, es va poder conèixer quin era el més adient pels plastificants. La possibilitat d'extreure tots els compostos facilita l'anàlisi

multiresidual, de manera que es pot determinar la presència d'un elevat número d'anàlits en una mostra.

Taula 10. Característiques dels rebliments dels cartutxos emprats.

Cartutx	Diàmetre del porus (Å)	Diàmetre de partícula (µm)	Àrea de la superfície (m ² g ⁻¹)
Oasis HLB	84	31	801
Scharlab HLB	60	50	500
Waters C18	125	60	325
Isolute C18	60	50	400

Les recuperacions obtingudes (%R ± desviació estàndard, n=3) es poden observar a la Figura 11. La mescla de diclorometà:hexà i diclorometà:acetona va permetre obtenir recuperacions més elevades de tots els plastificants. Com a dissolvents d'elució, la mescla amb diclorometà, hexà i acetona, assegura una completa recuperació, ja que l'hexà és més apolar i permet eluir els compostos amb logK_{ow} més elevat, mentre que l'acetona, més polar, permet eluir els de major polaritat i especialment, va permetre la recuperació eficient del BPA. El metanol sol va donar recuperacions més baixes en general, especialment per alguns ftalats, possiblement degut a diferències molt elevades de polaritat. En el cas d'addicionar àcid fòrmic, els alquilfenols de cadena curta, així com els ftalats i el DEHA es van degradar en aquestes condicions. Per altra banda, dels quatre cartutxos avaluats, els de HLB van donar unes recuperacions més properes al 100%, i especialment, els cartutxos Oasis van donar valors amb unes desviacions estàndard més baixes. Per la seva banda, els de C18 es van descartar per la falta de capacitat de retenció d'alguns dels plastificants, especialment pels alquilfenols de cadena curta, els quals no es van poder recuperar. Els cartutxos, com s'indica a la Taula 10, presenten certes diferències, i el diàmetre de porus per exemple, és completament indiferent al tipus de rebliment.

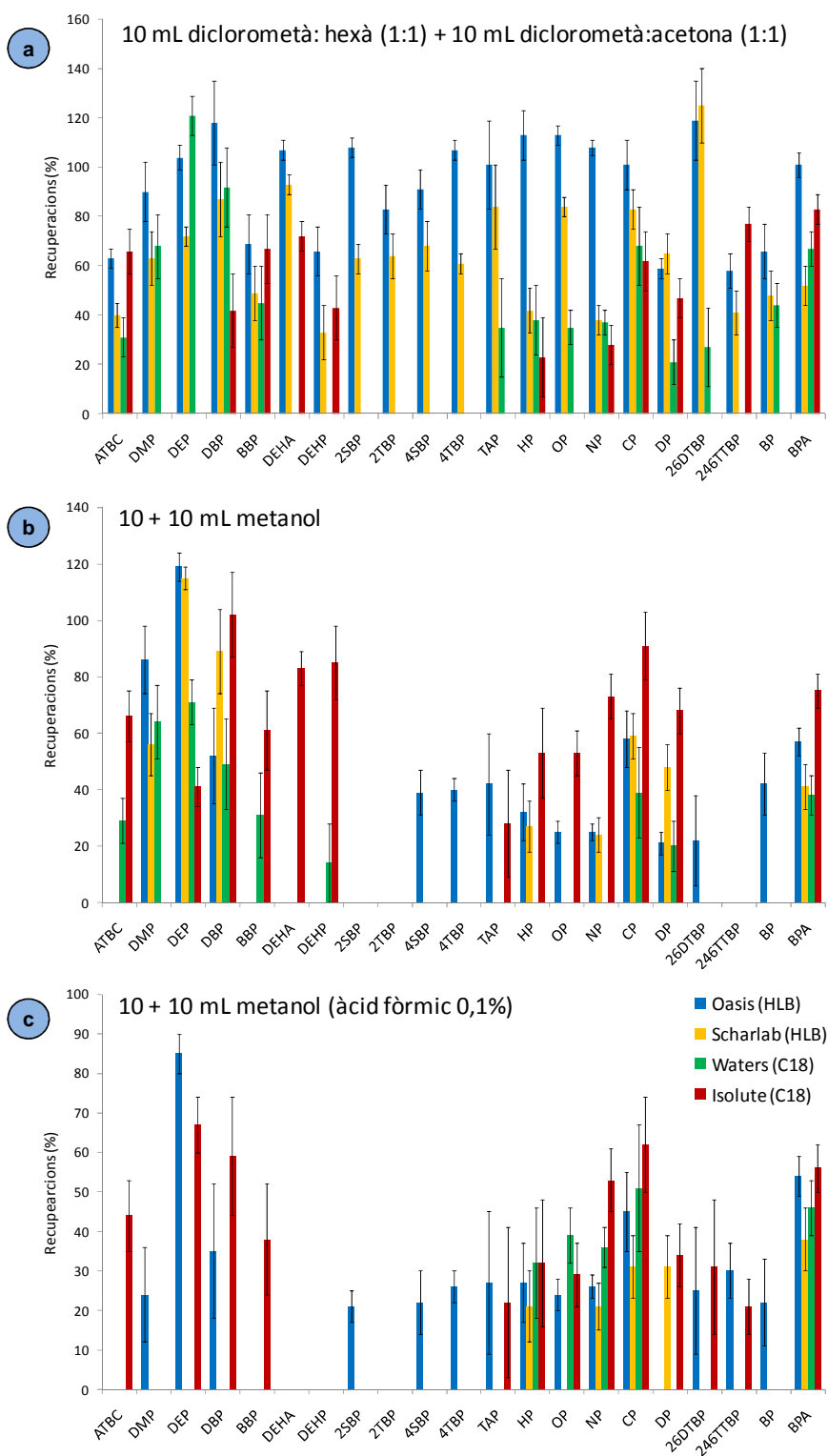


Figura 11. Recuperacions dels plastificants segons cartutxos SPE i dissolvents d'elució.

Finalment, es van escollir els cartutxos Oasis de 200 mg ja que van permetre recuperar tots els compostos amb valors propers al 100%. Coincideix que va ser el cartutx amb major àrea específica de superfície, de $801 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. El mètode d'extracció va consistir en analitzar 400 mL de mostra sense filtrar, la qual es fortificava amb 100 μL d'una solució d'1 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ de patrons interns de BPA-d16, NP-d8 i DPP-d4. Els cartutxos es condicionaven de forma consecutiva amb 10 mL de diclorometà, 10 mL de metanol i 10 mL d'aigua cromatogràfica, per gravetat. Emprar aquests diferents solvents orgànics ajudava a netejar de forma eficient els cartutxos i eliminar qualsevol possible compost present en l'adsorbent o material utilitzat en el cartutx i a tenir, per tant, blancs lliures d'interferències. Després, la mostra era preconcentrada a un flux aproximat de 5 mL min^{-1} , i un cop passada, els cartutxos s'assecaven aplicant el buit durant 30 min. L'elució final va consistir en 10 mL d'una mescla de diclorometà i hexà (1:1), seguida de 10 mL d'una mescla de diclorometà i acetona (1:1).

Els extractes es van recollir en vials àmbar de 40 mL i van ser evaporats a quasi sequedat utilitzant un TurboVap. Després, els extractes van ser transferits a inserts de 300 μL per a vials de cromatografia, emprant acetat d'etil i evaporats a sequedat sota corrent de nitrogen. Finalment, les mostres van ser reconstituïdes amb 125 μL de metanol i 125 μL d'aigua HPLC.

3.3.2 Paràmetres de qualitat

Els paràmetres de qualitat del mètode d'extracció desenvolupat es mostren a la Taula 11, on s'indiquen les recuperacions en aigua milli-Q i en aigua de riu, el límit de detecció metodològic, els nivells dels blancs i la supressió iònica. Les recuperacions es van calcular en aigua milli-Q i en aigua de riu, per triplicat, extraient 250 mL d'aigua fortificada amb 100 μL d'una solució de $1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de tots els plastificants. Els MDLs es van calcular de dues formes segons si el compost en

qüestió es va detectar o no en els blancs. En el cas que no es detectés, es va calcular a partir d'una mostra d'aigua milli-Q fortificada a una concentració de 200 ng L⁻¹, i es va calcular la concentració que produïa una relació senyal soroll de 3. En el cas dels compostos que es van detectar en els blancs (ATBC, DEP, DBP, BBP, DEHA, DEHP, OP i NP), el MDL es va calcular com la mitjana més 3 vegades la desviació estàndard de la contribució de cada compost en el blanc, per tal d'assegurar la quantificació dels diferents compostos en les mostres a nivells superiors a la contribució dels blancs. El càlcul del MDL realitzat d'aquesta manera permet no haver de restar els valors de blancs. La presència de plastificants en els blancs de mètode són deguts als dissolvents, materials emprats, específicament al tipus de cartutx que és de polipropilè i sistema d'extracció. Aquesta contribució externa cal tenir-la en compte per una correcta quantificació dels anàlits i per evitar una sobreestimació dels nivells de plastificants i monòmers de plàstic en les mostres.

La supressió iònica de cada plastificant es va calcular a partir de la diferència d'intensitat de cada compost en aigua de riu fortificada a 50 ng L⁻¹ i la intensitat del mateix en una mostra d'aigua de riu neta i dividint per la seva intensitat en el control realitzat amb aigua milli-Q. Per expressar-ho en percentatge, el valor es presenta en forma absoluta i multiplicat per 100, tal com s'indica en la següent fórmula:

$$\% = \left(1 - \left(\frac{QC_{riu} - Mostra_{neta}}{QC_{MQ}} \right) \right) \times 100$$

on tots els valors a introduir s'introdueixen en intensitat. QC_{riu} és el control de la mostra fortificada, la Mostra_{neta} és una mostra de riu que no conté el plastificant a determinar i QC_{MQ} és un control fet amb aigua Milli-Q.

Taula 11. Paràmetres de qualitat del mètode d'extracció d'aigües. R, recuperacions. RSD, desviació estàndard relativa. MDL, límit de detecció metodològic.

Compost	R \pm RSD (%)	R \pm RSD (%)	MDL (ng L ⁻¹)	Nivell blancs (ng L ⁻¹)	Supressió iònica (%)
	Aigua Milli-Q (n=3)	Aigua de Riu (n=3)			
ATBC	63 \pm 4	61 \pm 4	36,9	22,2 \pm 4,9	17
DMP	90 \pm 12	86 \pm 10	15,2	nd	4
DEP	104 \pm 5	100 \pm 7	294	261 \pm 11	15
DBP	118 \pm 17	110 \pm 21	196	139 \pm 19	14
BBP	69 \pm 12	66 \pm 10	20,2	11,2 \pm 3	5
DEHA	66 \pm 4	67 \pm 5	57,0	33,0 \pm 8	36
DEHP	107 \pm 10	114 \pm 9	143	98 \pm 15	42
2SBP	108 \pm 4	100 \pm 7	2,71	nd	8
2TBP	83 \pm 10	74 \pm 13	9,53	nd	7
4SBP	91 \pm 8	86 \pm 13	10,5	nd	10
4TBP	107 \pm 4	103 \pm 5	1,91	nd	32
TAP	101 \pm 18	96 \pm 16	1,80	nd	30
HP	113 \pm 10	101 \pm 7	0,46	nd	7
OP	113 \pm 4	112 \pm 10	10,6	8,45 \pm 0,7	7
NP	108 \pm 3	105 \pm 5	28,1	15,5 \pm 4,2	25
CP	101 \pm 10	99 \pm 8	2,49	nd	9
DP	59 \pm 4	60 \pm 4	13,3	nd	9
26DTBP	119 \pm 16	112 \pm 16	9,28	nd	38
246TTBP	58 \pm 7	57 \pm 9	10,9	nd	9
BP	66 \pm 11	72 \pm 13	3,64	nd	13
BPA	101 \pm 5	98 \pm 5	1,99	nd	6

Es pot observar com les recuperacions per a tots els plastificants són molt similars en els dos tipus d'aigües, properes al 100%. Com a excepció es troben el 246TTBP i el DP, que es van situar al voltant del 60%, degut que són els compostos amb una estructura més diferent, ja que el primer es troba tri substituït, i el DP, és el que presenta una cadena de carbonis més llarga, i per tant, té una major hidrofobicitat. Ambdós tenen una polaritat similar a partir del seu $\log K_{ow}$, la més baixa dins la seva família. En el cas dels alquilfenols, l'aigua de riu va proporcionar recuperacions lleugerament més baixes, mentre que els ftalats, el BPA i la BP es van recuperar de forma similar en els 2 tipus d'aigua. Això indica que el mètode permet l'extracció eficaç i de forma simultània de tots aquests compostos.

Els MDLs van variar entre 0,46 i 15,2 ng L⁻¹, exceptuant l'OP, el NP, l'ATBC i tots els ftalats (excepte el DMP) que tenen valors considerablement més elevats ja que es van calcular a partir de la contribució de les diferents anàlisis de blancs. El OP i NP van tenir un MDL de 10,6 i 28,1 ng L⁻¹, respectivament, i els ftalats entre 20,2 (BBP) i 294 ng L⁻¹ (DEP). Aquests MDLs van ser els valors del mètode real que permeten assegurar amb exactitud els nivells quantificats en les diferents mostres.

La supressió iònica es va calcular per l'aigua de riu per tal de veure com afectava la matriu d'aquests tipus de mostres a la intensitat en la senyal dels plastificants. Les mostres ambientals poden tenir nombrosos compostos amb característiques similars als anàlits, i per tant, poden afectar l'anàlisi d'aquests, ja sigui fent-ne augmentar o disminuir el seu senyal. En el cas de produir-se la supressió iònica, la intensitat dels ions pot arribar a disminuir considerablement degut a la presència d'altres molècules presents en la matriu que s'analitza. L'efecte matriu va ser inferior del 40% per alquilfenols i ftalats, a excepció del DEHP, que va arribar al 42%. Pel DMP, el BPA i la BP no es va produir efecte matriu (valors inferiors al 13%). Per tant, el mètode de SPE i LC-MS/MS permet l'anàlisi de forma exacta

d'un elevat número de plastificants i per tant, és aplicable a l'anàlisi d'aigües de riu que contenen nivells de carboni orgànic total entre 3 i 5 mg L⁻¹.

3.3.3 Begudes

El mètode d'extracció per a les begudes va ser inicialment l'extracció en fase sòlida seguint el mateix mètode optimitzat per les aigües de riu i aigua potable. Es va optimitzar el mètode utilitzant begudes de cola ja que es va considerar que era una matriu representativa de totes les begudes pel seu elevat contingut amb sucre i la presència de CO₂ dissolt. Malgrat que el mètode va ser eficaç per l'anàlisi de plastificants en aigua de riu, no va ser eficaç per l'extracció de plastificants i monòmers de plàstic en cola, ja que les recuperacions dels patrons interns van estar per sota del 20%. Les proves es van fer fortificant les begudes amb 0,30 ng mL⁻¹ de cadascun dels patrons.

Per aquesta raó, a pesar de l'existència d'alguns mètodes de SPE existents a la bibliografia (Cao et al., 2014; Khedr, 2013; Wu et al., 2014), es va optar per desenvolupar un mètode d'extracció líquid-líquid (LLE), basant-se especialment en un treball previ que analitzaven els ftalats i BPA en aliments i begudes de Noruega (Sakhi et al., 2014).

El mètode de LLE va consistir en l'anàlisi de 330 mL de mostra (l'equivalent al volum d'una llauna de refresc). En el cas d'ampolles de plàstic, on el volum total sol ser de 500 mL en el format més comú, es van analitzar també 330 mL. Totes les mostres amb contingut carbònic van ser desgasificades i analitzades sense filtrar, i s'hi van afegir 100 µL d'una solució de 1 ng µL⁻¹ de patrons interns: BPA-d16, NP-d8 i DPP-d4. Les mostres van ser extretes per LLE amb embuts de decantació de vidre, amb taps i claus del mateix material, per evitar possibles contaminacions. S'hi van afegir 40 mL de diclorometà, i es van agitar durant

5 min. Aquest procés es va fer per triplicat, i els extractes es van recollir en vials àmbar de 40 mL. Després, es va procedir a la seva evaporació fins a quasi sequedat. Els extractes van ser transferits a vials d'injecció cònics d'1,5 mL emprant diclorometà i evaporats a sequedat sota corrent de nitrogen. Per finalitzar, les mostres van ser reconstituïdes amb 250 µL de metanol i 250 µL d'aigua.

Aquest mètode només va permetre analitzar els alquilfenols de cadena mitjana a llarga mono substituïts, així com el bisfenol A i la benzofenona. Els ftalats no es van poder analitzar degut a les molt baixes recuperacions d'alguns, però sobretot, perquè els valors dels blancs eren més elevats que els nivells de fortificació.

3.3.4 Paràmetres de qualitat

Els paràmetres de qualitat obtinguts s'indiquen a la Taula 12. Les recuperacions de tots els compostos es van trobar entre el 82 ± 9 i el 113 ± 7 %, valors acceptables tenint en compte els criteris de qualitat de la Directiva 2013/39/UE. En comparació amb estudis previs (Gallart-Ayala et al., 2011a; Khedr, 2013; Liao i Kannan, 2014; Yang et al., 2014b), el MDL obtingut pel BPA de 16 ng L^{-1} en aquest estudi va ser molt similar, emprant tècniques de SPE i espectrometria de masses com a detector. Per exemple, pels mètodes d'extracció dels ftalats i els alquilfenols per LLE i GC, els MDL oscil·len entre 6 i 50 ng L^{-1} , mentre que pels de LC, els MDL pel BPA són de $0,63 \text{ ng L}^{-1}$ (Fan et al., 2013), $0,1 \text{ ng L}^{-1}$ (Rocha et al., 2014) i $1,2 \text{ ng L}^{-1}$ (Sodré et al., 2010b) entre d'altres, tal com s'indica a la Taula 5. En els cas d'extracció per SPE i anàlisi per GC, els MDLs de BPA, BP i ftalats oscil·len entre 0,6 i 74 ng L^{-1} (Geens et al., 2010; Loraine i Pettigrove, 2006). Pel NP, els MDL van ser de 3 ng L^{-1} utilitzant LLE i LC (Niu et al., 2015), pràcticament igual a l'obtingut en aquest treball.

Taula 12. Paràmetres de qualitat de l'extracció de les begudes.

Compost	Recuperacions \pm RSD (%)	MDL (ng L ⁻¹)	Límit de quantificació (ng L ⁻¹)
CP	86 \pm 8	29	95
TAP	83 \pm 13	46	154
HP	92 \pm 11	4	15
OP	82 \pm 9	15	50
NP	95 \pm 13	4	14
DP	93 \pm 11	3	11
BP	113 \pm 7	20	67
BPA	101 \pm 15	16	52

Finalment, la BP va tenir un MDL de 20 ng L⁻¹, considerablement més alt que el valor de la bibliografia de 0,9 ng L⁻¹ (Cacho et al., 2012) on s'utilitza l'extracció SBSE acoblada a GC, tècnica que permet obtenir valors de MDL menors que LLE i LC ja que tots els anàlits presents a la mostra són injectats.

La SPE no permet l'extracció de begudes degut a la gran quantitat de sucre (fins un 30%) a les mostres que fa que l'extracte quedi de consistència viscosa i de color. Per evitar aquest problema, es van fer algunes proves. La primera, que va consistir en rentar els cartutxos un cop els analits estaven retinguts, no va resultar efectiva ja que al reconstituir les mostres el problema persistia. També es van utilitzar cartutxos de florasil i de carbó actiu, de forma separada, per on es va passar l'extracte preconcentrat. En ambdós casos, les recuperacions van ser inferiors al 50% per la majoria de plastificants. Degut a les baixes recuperacions obtingudes amb SPE i la dificultat d'eliminar els sucres, es va optar per un altre tipus d'extracció. L'extracció líquid-líquid va ser efectiva i reproducible per l'anàlisi

dels alquilfenols de cadena mitjana i llarga, la benzofenona i el BPA, mentre que pels ftalats i els alquilfenols de cadena curta, aquest mètode no va permetre llur recuperació. Específicament, els ftalats es trobaven en els blancs a concentracions elevades, degut bàsicament a l'elevada manipulació de la mostra. Aquests compostos no es van analitzar en les mostres de begudes, i caldria desenvolupar mètodes específics per a la seva determinació.

4. Monitorització de rius

El mètode desenvolupat per l'anàlisi de plastificants en aigües de riu es va aplicar per monitoritzar el riu Besòs i determinar la concentració de plastificants al llarg de tota la conca. El Besòs és un riu fortament impactat, amb una densitat industrial i urbana molt elevada. Per altra banda, el riu Llobregat també rep un important impacte antropogènic, encara que menor que el Besòs, però és important avaluar la qualitat de les seves aigües ja que s'utilitza com a font d'aigua potable. En aquest segon cas, no es va monitoritzar de forma completa el riu, sinó que es va determinar el nivell de plastificants i monòmers a l'entrada de la potabilitzadora de Sant Joan Despí. També es van analitzar l'aigua de sortida, que passa a distribuir-se a la xarxa de consum.

4.1 El Riu Besòs

El riu Besòs neix a la confluència entre els rius Mogent i Congost, a la província de Barcelona. La seva conca té una superfície de 1024 km², i es troba en una zona amb una elevada activitat industrial, que es desenvolupa especialment a la part baixa del riu. El riu Mogent neix a prop del terme municipal de Sant Antoni de Vilamajor. Passa a través de la depressió del Vallès i a prop del Parc Natural de Montnegre-Corredor. A través del seu pas per la serralada prelitoral travessa poblacions com Llinars del Vallès, Cardedeu i finalment Granollers, i nombrosos afluents alimenten el Mogent. Per altra banda, el riu Congost neix a la mateixa serralada que el Mogent, però a prop dels termes municipals d'Els Hostalets de Balenya i Centelles. Travessa altres municipis com Aiguafreda, on s'uneix amb la Riera Picamenta, Figaró o la Garriga. Al curs mitjà passa entre Canovelles i Granollers, i finalment s'uneix al Mogent a Montmeló, formant el riu Besòs. El naixement del riu està envoltat de polígons industrials de municipis com Mollet del Vallès, La Llagosta, Martorelles, Ripollet i Montcada i Reixac, aquest últim punt és on s'uneix amb el primer afluent, el Ripoll.

El riu Besòs té un règim típicament mediterrani, amb freqüents inundacions per fortes pluges. A més, el riu ha sofert una intensa urbanització a la seva conca que han influenciat el règim hidràulic, especialment a partir dels anys seixanta i setanta. Això ha provocat un significat augment de l'escorrentia (Sala i Inbar, 1992), mentre que les pluges s'han mantingut constants. El riu Besòs ha estat objecte d'intervencions en el seu curs baix per tal d'evitar la mala qualitat de l'aigua i també per evitar les freqüents inundacions (Martín-Vide, 1999). L'activitat industrial, el desenvolupament urbà i el vessament d'aigües residuals juntament amb la sobreexplotació d'aqüífers contaminats va portar a que el riu fos un dels més contaminats d'Europa, amb evidents problemes mediambientals (Huertas et al., 2006).

La contaminació industrial prové de la gran activitat present a la seva conca des de fa dècades. El riu Congost drena varies àrees industrials com Centelles o Aiguafreda. La Garriga disposa de dos polígons al nord i tres al sud relacionats amb la indústria tèxtil i fabricació de mobles. L'Ametlla del Vallès, Les Franqueses del Vallès i Canovelles també compten amb grans àrees industrials al voltant del riu.

Pel que fa al Mogent, hi ha petites àrees industrials a Llinars del Vallès, i una mica més grans a Cardedeu i a la Roca del Vallès. A Montornés del Vallès la intensitat industrial és considerable i arriba als nivells més alts a Mollet del Vallès, Santa Perpètua, Sabadell, Barberà del Vallès i Ripollet. Finalment, la part baixa del riu és a Montcada i Santa Coloma de Gramanet, on hi ha diversos polígons industrials i una gran densitat de població, amb dos milions d'habitants. Finalment el riu desemboca a Sant Adrià de Besòs. Al llarg de tota la conca, els tipus d'indústria vénen encapçalats per la metal·lúrgia, béns d'equipament, químic i tèxtil, entre d'altres.

Les aigües dels diferents municipis de la conca són depurades en diverses EDAR i abocades al llarg del Besòs. El riu Congost compta amb diverses estacions depuradores als municipis de Centelles, Tagamanent, La Garriga, l'Ametlla del Vallès, Les Franqueses del Vallès i Granollers. El Mogent compta amb depurades a Sant Antoni de Vilamajor, Cardedeu, La Roca del Vallès i Vilanova del Vallès. Un cop passada la confluència, el Besòs rep efluents de les depuradores de Montornès, i la Llagosta. El riu Ripoll, en canvi, rep efluents de la depuradora de Sabadell. I abans de la desembocadura, també es troba la depuradora de Montcada i Reixac (Huertas et al., 2006).

4.1.1 Presa de mostra

La presa de mostra és un dels punts més importants de tot el procés analític ja que cal reduir al màxim la incertesa que es pot produir degut que les matrius són heterogènies i els contaminants no estan distribuïts de forma uniforme. L'aigua de riu pot variar molt degut al moment del mostreig i en funció dels diversos efluents que es troben (ja siguin abocadors o de plantes de tractament d'aigües), etc. La recollida d'almenys 2 mostres d'aigües superficials augmenta la representativitat de la zona mostrejada (Sánchez-Avila et al., 2011). A part, durant el mostreig és molt important evitar al màxim possibles contaminacions degudes al propi procés de presa de mostra que en cas de realitzar-se de forma incorrecte pot produir una sobreestimació dels nivells de contaminants. Aquesta problemàtica és especialment rellevant pels ftalats, ja que les ampolles de plàstic poden contaminar les mostres. Per evitar-ho es recomana emmagatzemar les mostres en ampolles de vidre de borosilicat color àmbar, que protegeix la mostra de la llum UV, i és especialment necessari per compostos fotosensibles com la BP i alguns alquilfenols (Cortina-Puig et al., 2014). És necessari rentar el material utilitzat en la presa de mostra de forma exhaustiva. Paral·lelament, els taps de

plàstic poden ser una font de contaminació, ja que podrien contenir ftalats i/o BPA que contaminarien la mostra. Així, convé utilitzar taps de tefló (PTFE) o en el cas que siguin de plàstic, posar paper d'alumini com a barrera entre la mostra i el propi tap. Un cop s'ha recollit la mostra, els envasos s'han de tancar bé, i mantenir a baixa temperatura durant el transport, i evitar també el contacte de llum directe que podria produir fotodegradació. A part, la baixa temperatura també evita la possible volatilització dels compostos.

Les mostres d'aigua es van recol·lectar fixant tres períodes de canvis estacionals que influeixen en la dinàmica d'un riu: al juliol del 2013, al novembre i al març del 2014. Les mostres es van emmagatzemar en ampolles de vidre de color àmbar d' 1 litre prèviament netejades. Durant el mostreig les mostres es mantenien fredes en neveres portàtils. El protocol de neteja de les ampolles consistia en rentar-les amb detergent Extran (Merck) i esbandint amb aigua desionitzada i acetona. Després d'aquesta neteja, s'ha d'embolicar el material amb paper d'alumini i muflar-lo a 450°C durant 4 hores per eliminar qualsevol possible resta de compostos orgànics.

Es van mostrejar 19 punts (Taula 13) distribuïts pels diferents afluents i el propi riu Besòs (Figura 12). Els punts de presa de mostra van ser escollits a partir de dues premisses: per una banda comprovar l'impacte dels plastificants causat per la densitat poblacional i per una altra banda, comprovar si es donava l'efecte dilució dels afluents al riu Besòs. Per aquest motiu, es van distribuir els punts de capçalera cap a desembocadura i es va realitzar el mostreig en 3 èpoques diferents per estudiar possibles tendències geogràfiques.

Taula 13. Punts de mostreig del riu Besòs.

Punt	Riu	Emplaçament	Coordenades
1. Tagamanent	Congost	Urbà	41°44'13,73"N 2°15'59,10"E
2. Riells del Fai	Tenes	Urbà	41°41'59"N 2°11'57"E
3. Sant Feliu de Racó	Ripoll	Urbà	41°37'40,74"N 2°4'7,72"E
4. La Garriga	Congost	Industrial	41°39'58,44"N 2°17'5,30"E
5. Llinars Vallès	Mogent	Urbà	41°38'7,73"N 2°24'8,86"E
6. Caldes de Montbui	Riera de Caldes	Urbà	41°37'53,23"N 2° 9'54,05"E
7. Roca del Vallès	Mogent	Industrial-Urbà	41°35'22,57"N 2°19'15,29"E
8. Parets del Vallès	Riera de Tenes	Urbà	41°33'54"N 2°13'51"E
9. Montornès del Vallès	Mogent	Urbà	41°32'47,57"N 2°15'54,26"E
10. Santa Perpètua de Mogoda	Riera de Caldes	Industrial-Urbà	41°32'4,56"N 2°10'46,04"E
11. Ripollet	Ripoll	Industrial	41°29'32"N 2°9'21"E
12. Moncada i Reixac	Ripoll	Industrial	41°29'17,07"N 2°11'13,16"E
13. Montmeló	Congost	Industrial	41°33'8"N 2°15'9"E
14. Montmeló	Besòs	Industrial	41°32'48"N 2°14'55"E
15. Sant Fost de Campsentelles	Besòs	Industrial	41°31'47,33"N 2°13'12,58"E
16. entre Riera Caldes i riu Ripoll	Besòs	Urbà	41°29'26"N 2°11'16"E
17. Moncada i Reixac	Besòs	Urbà	41°28'32,40"N 2°11'22,49"E
18. Santa Coloma de Gramanet	Besòs	Urbà	41°26'51,29"N 2°12'14,11"E
19. Sant Adrià de Besòs	Besòs	Urbà	41°25'17,07"N 2°13'48,27"E

Al camp es va mesurar la temperatura de l'aigua, el pH i l'oxigen dissolt de cada punt, a més de determinar les coordenades geogràfiques. Les mostres es van obtenir en zones on la profunditat era superior a 25 cm i l'aigua circulava. Un cop al laboratori es van guardar a la nevera a 4°C. L'extracció es va realitzar en un període de menys de 24 h per tal d'evitar la degradació microbiana (Rodríguez-Mozaz et al., 2004). Els cabals mitjans estan indicats a la Taula 14. S'observa que els cabals oscil·len entre 2,6 i 6,3 m³ s⁻¹, i aquests valors són molt baixos comparat amb altres rius de Catalunya (com l'Ebre o el Ter). Això representa que l'impacte de la contaminació ambiental pot ser molt elevat degut al baix efecte de dilució que té aquest riu. A més, si es considera que el Besòs rep l'impacte dels efluents de moltes depuradores, els contaminants que aquests contenen poden ser una important font de contaminació.

Taula 14. Cabals en m³ s⁻¹ del Besòs i afluents segons l'estació (Agència Catalana de l'Aigua). * = valor mitjà de l'any 2011).

Riu	Estació d'aforament	2013		2014
		Juliol	Novembre	Març
Besòs	Santa Coloma de Gramanet	5,72	6,28	2,61
Congost	La Garriga	0,05	0,31	0,24
Mogent	Montornès del Vallès	0,09	0,71	0,26
Tenes	Lliçà de Vall	0,63*	0,63*	0,63*
Riera de Caldes	Santa Perpètua de la Mogoda	0,19*	0,19*	0,19*
Ripoll	Montcada i Reixac	0,89*	0,89*	0,89*

Per analitzar les mostres es va emprar un cromatògraf de líquids Acquity (Waters, Estats Units) acoblat a un triple quadrupol TQD (Waters, Estats Units). La columna va ser una Acquity UPLC BEH C18 de 100 x 2,1 mm, amb una mida de partícula de 1,7 μm , de la mateixa casa comercial, amb la seva respectiva precolumna, VanGuard, de 5 x 2,1 mm i la mateixa mida de partícula que la columna. Les extraccions es van fer mitjançant el mètode desenvolupat amb cartutxos d'HLB Oasis de 200 mg i eluint amb una mescla de dicloromèta, hexà i acetona, tal com s'ha indicat en el capítol 3.



Figura 12. Presa de mostra en diversos punts del Riu Besòs, realitzat el març de 2014. a) Parets del Vallès, b) Tagamanent, c) Montcada i Reixach, d) Montmeló, e) Sant Adrià del Besòs i f) Montornès del Vallès.

4.1.2 Nivells detectats

En el mapa de la Figura 13 s'observa com les concentracions dels plastificants augmenten del naixement del riu cap a la desembocadura, tant en el Besòs com en els afluents, a excepció dels punts 10 i 11, prop de Ripollet, on es troben les concentracions més elevades degut al pas dels rius per una zona amb una gran densitat industrial. Considerant tota la conca, l'impacte antropogènic que les àrees urbanes i industrials causen al riu és evident. A l'inici del riu i les diverses capçaleres, les concentracions de tots els compostos estudiats van presentar nivells molt baixos i això es deu a que són zones semiprotegides (com el Parc Natural del Montseny), on les mesures de conservació i protecció eviten l'abocament de qualsevol contaminant. A la confluència del Congost i el Mogent es va observar un efecte de dilució (al punt de mostreig 14, Montmeló), ja que la concentració d'ambdós rius abans d'unir-se era major. En el mapa s'indiquen en rosa l'àrea urbana, en gris l'àrea industrial i en verd les àrees naturals protegides. Així, s'observa fàcilment com la conca està molt massificada, amb la presència d'indústria especialment a la part central, i amb zones habitades en pràcticament tots els punts a partir de Montornès del Vallès en direcció a la desembocadura del Besòs. Només a les capçaleres, aquesta pressió és molt baixa o inexistent. Cal destacar que a prop de la desembocadura, la tendència de les concentracions és disminuir respecte a punts anteriors, ja que la intrusió salina dilueix l'aigua del riu. A la Taula 15 s'observen les concentracions de cada punt en els 3 mostrejos en ng L^{-1} . Pel que fa als plastificants detectats, tal com s'observa a la Figura 14, el DEHP va ser el compost més ubic al llarg de la conca, representant un 37,5% del total dels plastificants. S'ha de considerar que aquest compost és el ftalat amb més producció i també el més utilitzat. En segon lloc, el NP va representar un 31,1% del total i en tercer lloc, el DBP, amb un 17,3%. En menor mesura, es van detectar BPA, OP i BP, cadascun representant aproximadament un 5% del total.

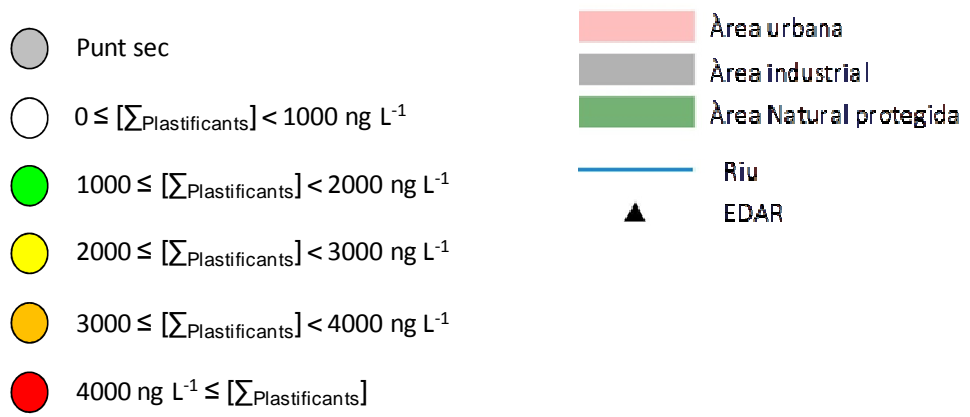
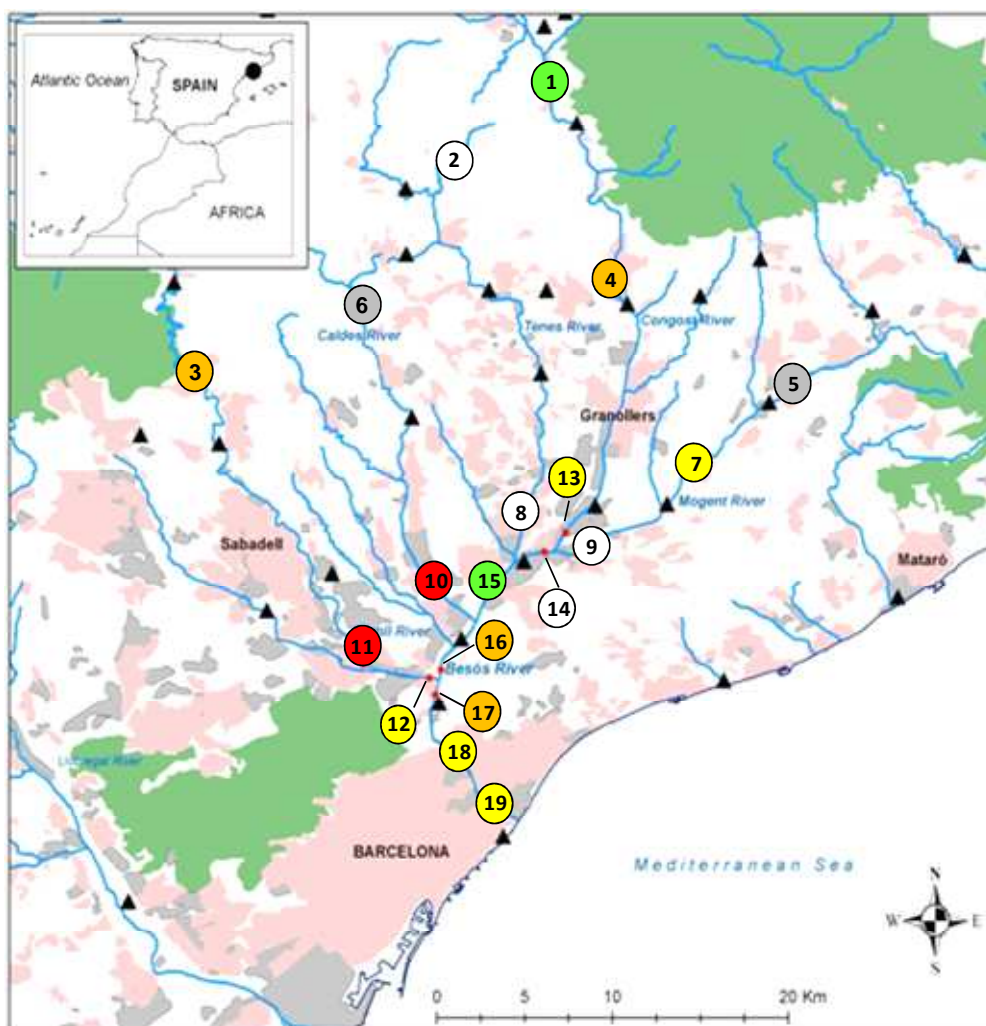


Figura 13. Mapa de la conca del Besòs, indicant els punts mostrejats i la suma total de plastificants identificats.

Si es té en compte el promig de cada compost a prop de la desembocadura del Besòs i el cabal del riu, es pot estimar la quantitat alliberada al mar. Per el DEHP i el NP, que han estat els compostos més detectats (ja que el DBP no es detecta al curs baix del Besòs), s'aboquen a 276 g dia⁻¹ el DEHP i a 353 g dia⁻¹ el NP cap a la zona costanera. Aquest valors suposen un alliberament elevat i de forma continuada cap el Mediterrani.

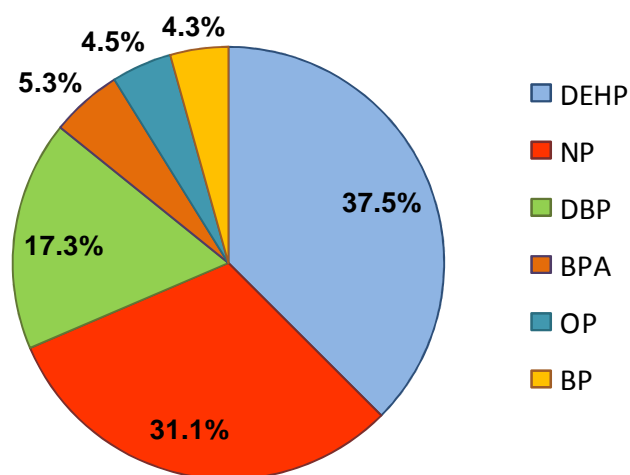


Figura 14. Contribució de cada plastificant identificat al riu Besòs en la suma de tots ells.

Dels diferents ftalats estudiats, el DEHP i el DBP van ser els dos ftalats identificats al riu Besòs. Aquests dos compostos van tenir un pic de concentració al punt de mostreig 14, a La Garriga. Això podria explicar-se degut que en aquest punt hi ha una important àrea industrial, especialitzada en metal·lúrgia, tèxtils i fabricació de mobles. A part, els punts de mostreig 10 i 11 (prop de Ripollet) també van tenir els nivells més elevats en relació a la mitjana degut que és una important àrea urbana i industrial. No obstant, ambdós ftalats van decreïxer la seva concentració

a partir d'aquest punt i només el DEHP va ser detectat a prop de la desembocadura del Besòs. Respecte la variació estacional, el novembre va presentar els nivells més elevats, mentre que al juliol, el DBP no va ser detectat. El març, aquest compost es va detectar a la capçalera i als punts centrals del riu. El DEHP va ser detectat a nivells similars al llarg del riu el juliol i només va ser detectat al punt 7 (La Roca del Vallès) el març. Els resultats obtinguts coincideixen amb altres estudis on el DEHP i el DBP són els compostos més detectats en rius. Per exemple, als rius Manzanares i Jarama (Madrid), Domínguez-Morueco et al. van quantificar el DBP a 1759 ng L^{-1} , mentre que el DEHP no va ser detectat (Domínguez-Morueco et al., 2014). Un estudi al riu Groc (Xina), en una de les zones industrials més denses de la Terra, es va detectar DEHP i DBP a 2460 i 1630 ng L^{-1} , respectivament (Xue et al., 2014). En canvi, la monitorització de 9 rius situats a la costa xinesa presentaven el DEHP i DBP entre nivells no detectats i 32 i 61 ng L^{-1} , respectivament (Wu et al., 2013).

Respecte els alquilfenols, en el riu Besòs només es van detectar el NP i l'OP. Pel NP, el novembre va presentar els nivells més elevats, mentre que per l'OP, els tres mostrejos van tenir valors similars. Respecte la tendència general, el NP va tenir dos màxims relatius de concentració en els punts propers a Montcada i Reixach (11 i 12), després una lleugera baixada, i es va tornar a incrementar del punt 16 (abans de Montcada i Reixach) fins a la desembocadura. Per altra banda, l'OP va ser més regular, i va incrementar la seva concentració gradualment, amb excepció del punt 11, a Ripollet (ja que els punts 12 a 14 van presentar concentracions menors). Després, el punt 15 (Sant Fost de Campsentelles) va ser on es van detectar les concentracions més elevades, que disminueixen gradualment fins a la desembocadura. El NP va oscil·lar entre $57,6$ i 4532 ng L^{-1} i l'OP entre $6,2$ i $635,6 \text{ ng L}^{-1}$. Comparant amb altres estudis, al riu Danubi (Hongria) no es va detectar OP i el NP es va trobar a 30 ng L^{-1} (Faludi et al., 2015).

Taula 15. Valors de concentració en ng L⁻¹ dels plastificants identificats al riu segons punt de mostreig i estació.

Mostreig	Punt de mostreig	DEHP	DBP	NP	OP	BPA	BP
Juliol 2013	1	1025	0	356	8,1	0	30,7
	2	772	0	118	6,2	20,9	13,3
	3	0	0	493	6,2	129	5,5
	4	632	0	660	13,8	0	30,2
	5	punt sec	punt sec	punt sec	punt sec	punt sec	punt sec
	6	punt sec	punt sec	punt sec	punt sec	punt sec	punt sec
	7	908	0	250	16,8	59,2	53,9
	8	punt sec	punt sec	punt sec	punt sec	punt sec	punt sec
	9	1004	0	753	9,9	0	9,1
	10	733	0	620	18,2	64,8	49,6
	11	3110	0	2259	164	638	324
	12	1629	0	2141	11,8	45,6	176
	13	0	0	1086	50,9	587	69,4
	14	0	0	646	36,3	206	54,2
	15	1261	0	1038	524	248	469
	16	2673	0	2613	492	479	309
	17	2459	0	1146	69,2	40,3	47,8
	18	0	0	1858	393	817	604
	19	1971	0	1362	138	682	177
Novembre 2013	1	0	0	404	16,7	3,8	31,9
	2	0	0	285	42,9	0	32,4
	3	4603	3277	57,6	7,7	0	137
	4	5957	2695	291	11,4	0,6	150
	5	punt sec	punt sec	punt sec	punt sec	punt sec	punt sec
	6	punt sec	punt sec	punt sec	punt sec	punt sec	punt sec
	7	0	0	324	36,9	63,7	22,6
	8	0	0	451	21,6	10,5	199
	9	0	0	214	19,7	15,1	15,1
	10	10774	5388	375	18,2	59,5	179
	11	9214	4296	1329	38	8,3	116
	12	0	0	1690	53	121	243
	13	0	0	933	83,6	72,1	105
	14	0	0	1034	106	68,5	22,2
	15	0	0	369	222	49	28,8
	16	0	0	3131	576	330	219
	17	0	0	4532	570	256	418
	18	0	0	1544	329	275	46,3
	19	0	0	442	54,7	51,2	520
Març 2014	1	0	1759	258	11,9	18,4	34
	2	0	595	97,3	22,5	0	16,6
	3	0	0	828	35,2	1,2	16,9
	4	0	1891	114	10	1	40,5
	5	punt sec	punt sec	punt sec	punt sec	punt sec	punt sec
	6	punt sec	punt sec	punt sec	punt sec	punt sec	punt sec
	7	2240	1603	414	41	321	37
	8	punt sec	punt sec	punt sec	punt sec	punt sec	punt sec
	9	0	0	277	31,1	1,51	0
	10	0	0	258	51,1	36,4	16,9
	11	0	0	358	38,5	165	27,4

Mostreig	Punt de mostreig	DEHP	DBP	NP	OP	BPA	BP
	12	punt sec	punt sec	punt sec	punt sec	punt sec	punt sec
	13	0	2176	754	119	211	113
	14	0	0	375	105	114	34,1
	15	0	0	624	636	112	47,7
	16	0	0	172	79,5	243	46,2
	17	0	0	430	123	169	431
	18	0	0	1574	445	285	69,3
	19	0	0	715	171	164	32,7

Al golf de Gdansk (Polònia) es va detectar NP i OP a 172,1 i 43,1 ng L⁻¹, respectivament (Staniszewska et al., 2014). Al riu Mondego (Portugal), Rocha et al. van detectar NP a 2770 ng L⁻¹ i OP a 1279 ng L⁻¹ (Rocha et al., 2014). Finalment, Colin et al. van analitzar el riu Loira (França) detectant NP i OP a 17 i 170 ng L⁻¹, respectivament (Colin et al., 2014), valors que s'atribueixen a les nombroses plantes de tractaments d'aigües residuals al llarg de la conca dels rius. Tots els estudis coincideixen en que l'OP es troba a concentracions més baixes en comparació el NP, i això s'atribueix al seu ús més reduït.

El BPA va ser detectat en la majoria de les mostres col·lectades al riu Besòs i els seus afluents amb concentracions creixents des del naixement a la desembocadura. A les capçaleres del riu i afluents, el BPA no es va detectar o es va trobar a molt baixa concentració, el que reflecteix la bona qualitat de l'aigua en àrees protegides com els Parcs Naturals. Una vegada els afluents descarreguen al riu, es va observar un efecte de dilució, encara que a la part més baixa del riu, la concentració va augmentar progressivament. Les concentracions més elevades de BPA es van donar al curs baix del riu Besòs, degut que aquest flueix a través d'una àrea urbana densa amb elevades descàrregues industrials. En el punt 15 (després de la confluència del Tenes i el Caldes), es va observar un efecte de dilució. A destacar que el Tenes travessa una zona lliure d'activitat industrial, fet que és palpable pels baixos nivells d'aquest compost. Finalment, el punt 18, a

prop a la desembocadura a Sant Adrià del Besòs, una àrea urbana densa, es van detectar les concentracions més elevades de BPA, especialment en juliol. Els valors totals de BPA van oscil·lar entre no detectats i 817 ng L^{-1} . Comparant aquests resultats amb altres estudis, el BPA va ser detectat a 101 ng L^{-1} al riu Ebre (Gorga et al., 2013) i al riu Ter, a 1510 ng L^{-1} (Céspedes et al., 2005), mentre que al riu Mondego a Portugal, el BPA es va trobar a un nivell de 185 ng L^{-1} (Cruceu et al., 2012; Rocha et al., 2014). Per tant, les concentracions detectades en el Besòs estan dins el rang d'altres rius de la península Ibèrica.

La concentració de BPA va mostrar diferències temporals, on els valors del juliol eren més elevats que al març i al novembre. Aquestes variacions podrien explicar-se degut al cabal del riu i les condicions meteorològiques. La temperatura elevada produeix pèrdues per evaporació especialment durant l'abril i el setembre. El cabal màxim del riu es dona al hivern, i està influenciat per les precipitacions, i el cabal mínim és a l'estiu. Per tant, s'observa que una petita disminució del cabal del riu durant els mesos d'estiu pot afectar en gran mesura les concentracions detectades. A més, el BPA es degrada en aigües de riu (da Silva et al., 2014) i això indica que malgrat les pèrdues per fotodegradació, els baixos cabals i els abocaments continuats fan que la concentració sigui més elevada a l'estiu.

La benzofenona va seguir una tendència similar al BPA, i va ser detectada en pràcticament tots els punts de mostreig durant les 3 campanyes. El juliol i novembre van ser els mesos amb els nivells més elevats. Del punt 11 al 14 (entre Ripollet i Montmeló), la concentració de BP disminueix gradualment, però és a partir del punt 15 que augmenta fins a la desembocadura. Els valors obtinguts van variar entre 5 i 604 ng L^{-1} . Comparant amb un altre estudi, la BP va ser detectada als rius Kolpa, Krka i Nadiza, a Eslovènia, entre 30 i 88 ng L^{-1} (Kotnik et al., 2014). La presència de la BP en aquest riu s'atribueix al seu ús en la indústria. Això contrasta amb la presència de BP en zones costaneres, que s'atribueix a l'ús

de cremes de protecció solar utilitzades per la gran afluència de banyistes durant l'estiu (Tovar-Sánchez et al., 2013).

Comparant els valors obtinguts amb la legislació, el NP és l'únic compost que té una concentració màxima admissible segons la Directiva 2013/39/UE, de 2000 ng L⁻¹. Aquest llindar es va superar en 3 punts del tram central del Besòs al mes de juliol, i en 2 punts propers a la desembocadura el mes de novembre, i per tant, aquest compost es troba al Besòs a nivells que impliquen una revisió i control dels abocaments que s'hi realitzen. A part, també té un valor legislat mitjà anual, de 300 ng L⁻¹. Els altres dos compostos legislat en la mateixa Directiva són el DEHP i el OP, però ambdós no tenen atribuït un màxim admissible, sinó una mitjana anual, de 1300 i 100 ng L⁻¹, respectivament. En el cas del DEHP, aquest valor es supera, però només de forma puntual. No hi ha prou dades per poder confirmar si aquests llindars mitjans es superen i si es volgués confirmar s'hauria de realitzar una monitorització més continuada de tota la conca.

4.1.3 Avaluació de la toxicitat

Mentre que les concentracions dels diferents compostos proporcionen informació molt valuosa sobre la seva presència i distribució geogràfica i temporal, no donen informació sobre l'impacte que poden ocasionar en el medi aquàtic. Per tant, és important combinar les anàlisis químiques amb estudis de toxicitat, ja que permeten definir el risc que comporta la presència de plastificants i monòmers del plàstic en el riu Besòs.

El test escollit per estudiar els plastificants va ser el test d'immobilització aguda d'EC₅₀ de 48 hores, recomanat per OECD 202 emprant *D. magna*. Per portar a terme aquest test s'han de seguir les següents condicions:

1. L'equipament que ha d'estar en contacte amb les solucions test ha de ser preferiblement de vidre.
2. Pot ser emprada qualsevol tipus d'aigua acord per cultivar *D. magna*, tant natural com reconstituïda.
3. *D. magna*, o qualsevol de les seves espècies, no ha de tenir més de 24 h de vida a l'inici del test, ha de ser aparentment saludable i amb una història coneguda.
4. Almenys 20 animals, preferiblement dividits en 4 grups de 5 animals cadascun s'haurien d'emprar a cada nivell de concentració i pels controls. Les *Daphnia* no han d'alimentar-se durant el test.
5. S'ha d'afegir a cada animal almenys 2 mL de solució.
6. El test s'ha de produir a una temperatura entre 18 i 22°C, i per cada test simple, la temperatura ha de ser constant amb una variació de $\pm 1^\circ\text{C}$.
7. El cicle de llum i foscor és opcional, ja que la completa absència de llum és acceptable. Les concentracions han d'estar en sèries geomètriques. La concentració més elevada hauria de resultar en un 100% d'immobilització, però alhora, mai hauria d'excedir de 1 g L^{-1} . La concentració més baixa a testar hauria de donar un efecte no observable.
8. Les solucions s'han de fer millor sense ajuda d'un agent per afavorir la solubilitat. La concentració de solvents orgànics, emulsionants o dispersant no hauria d'excedir els 100 mg L^{-1} .
9. L'aigua de dilució hauria de ser airejada abans de l'addició de la substància a testar, i la concentració d'oxigen (tan de controls com solucions test) ha de ser mesurada a l'inici i al final d'aquest.
10. Les substàncies volàtils s'haurien de testar en contenidors completament tancats i suficientment grans per prevenir la falta d'oxigen.
11. El pH dels controls i les solucions test s'hauria de mesurar a l'inici i al final del test, malgrat que no s'ha ajustar.

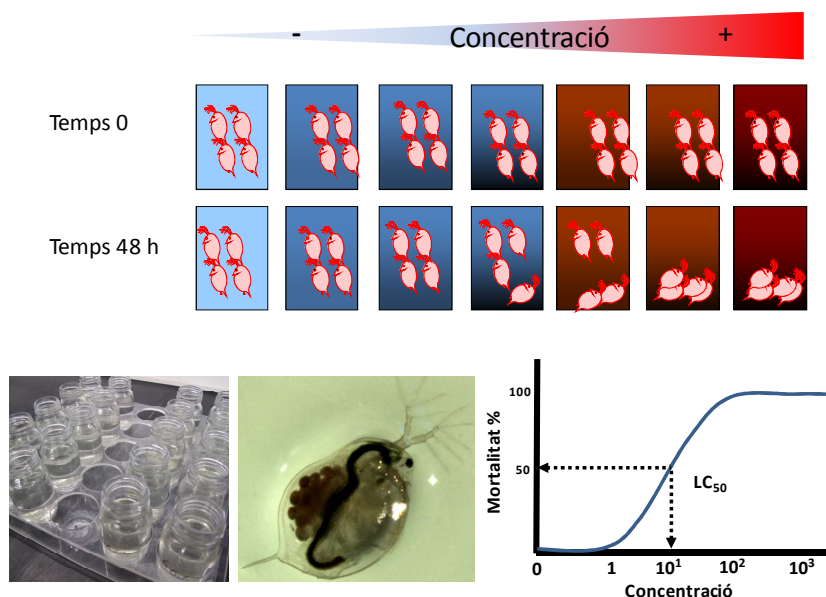


Figura 15. Efectes de les concentracions, vials de cultiu, *Daphnia magna* i corba de toxicitat per calcular la LC₅₀.

Es va dissenyar un model d'experiments per a cada substància per si sola, per tal de conèixer la seva toxicitat aguda en estudis estandarditzats de 48 hores, en els quals els organismes van ser exposats a concentracions creixents de cada plastificant a nivell individual (entre 100 i 500 μM), i es va monitoritzar la seva supervivència durant aquest temps, en un experiment com el de la Figura 15. Es van preparar solucions stock d'1 mM en acetona el mateix dia de l'experiment. La concentració màxima d'acetona en els organismes exposats va ser del 5%. Els organismes exposats a 0,1 mg L⁻¹ en acetona es van emprar com un vehicle de control, per tal d'assegurar que les *D. magna* no es veien afectades pel propi dissolvent.

Així, les relacions de concentració i resposta es van modelitzar biomètricament (Schölze et al, 2001) i es va aplicar el model de regressió de Hill, tal com s'indica a l'equació:

$$E(\%inh) = \frac{100}{1 + (EC_{50}/x)^p}$$

on "E" és l'efecte en percentatge d'inhibició, "p" és el pendent, "EC" és la concentració efectiva i "x" la concentració de cada compost (μM).

A la Figura 16 es poden observar els resultats obtinguts, indicant les corbes de toxicitat per a cada compost així com el valor de LC_{50} . Per cada plastificant o additiu, la resposta de mortalitat va seguir una forma sigmoïdal, la qual va poder ser modelada mitjançant la funció de la regressió de Hill. En tots els casos estudiats, els residuals de la regressió van tenir una distribució normal, donant coeficients de regressió superiors a 0,8, indicant una bona aproximació del model.

Com es desprèn de les dades obtingudes, els valors de LC_{50} a 48 hores estan estretament relacionats amb l'estructura i propietats del compost. El DMP i el TTBP són els únics compostos que no estan presents a la Figura 16 degut que els seus valors de LC_{50} van ser superiors a $500 \mu\text{M}$, que es consideren no tòxics. Si es compara amb la bibliografia, l'EPA considera tòxic el TTBP, encara que no especifica les condicions de l'estudi (EPA 2003), mentre que pel DMP, els valors de toxicitat són relativament alts en tots els casos (LeBlanc, 1980; Verschueren, 1996).

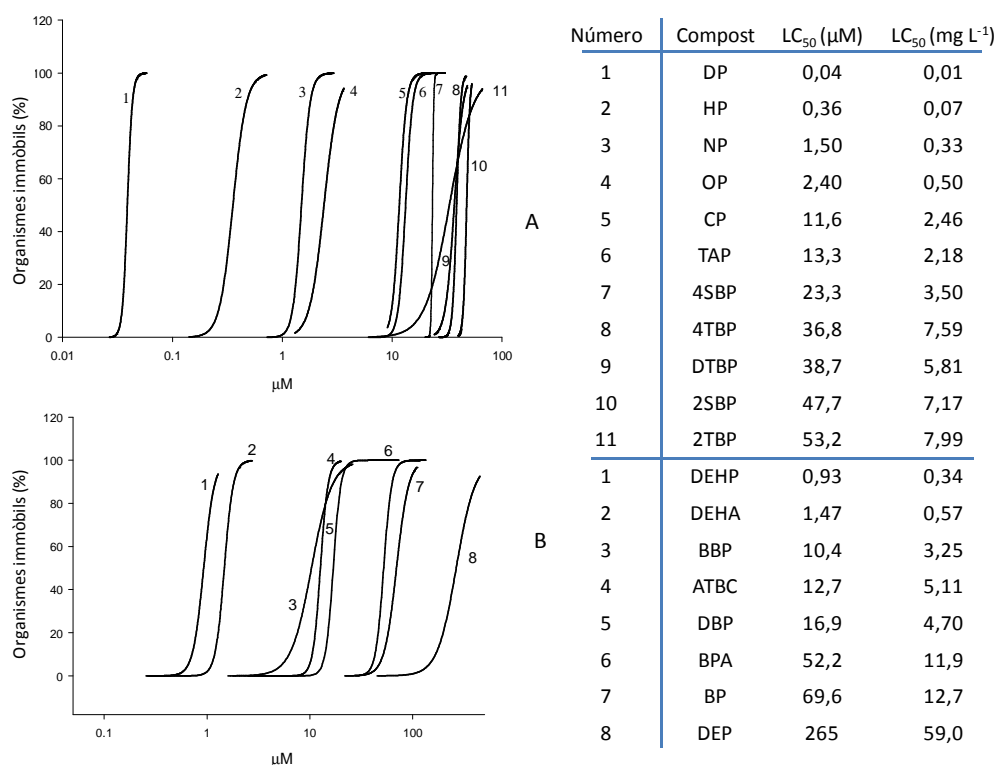


Figura 16. Corbes de toxicitat i valors de LC₅₀ utilitzant *Daphnia magna*, ordenat de major a menor concentració. A) Alquilfenols. B) Ftalats, BPA i BP.

Respecte els alquilfenols (Figura 16. A), es va observar com a tendència que els de cadena més llarga, com el dodecilfenol, tenen una toxicitat major que disminueix a mesura que la llargada de la cadena alquíllica disminueix. L'única excepció és l'heptilfenol, que va tenir un valor de toxicitat entre el DP i el NP. A més, una ramificació més elevada fa que augmenti el valor de logK_{ow}, i per tant també fa augmentar la toxicitat. Aquesta diferència de toxicitat també va ser observada en estudis bibliogràfics previs, on s'indica que els butilfenols tenen menor toxicitat que l'OP i el NP (Bringmann i Kuehn, 1982). Respecte la toxicitat dels butilfenols, cal destacar que els substituïts en la posició *para* de l'anell van ser més tòxics que els de la posició *orto*. En aquest cas, més que per les seves propietats, la toxicitat es podria veure afectada pels impediments estèrics que produeixen les ramificacions en les diferents posicions, ja que la posició *para* podria afavorir la

seva biodisponibilitat. En el darrer cas, el DTBP, amb les dos posicions *orto* substituïdes, és menys tòxic que els de la posició *para*, però sí és més tòxic que els mono substituïts en la mateixa posició. En aquest cas, el $\log K_{ow}$ augmenta amb el número de ramificacions.

Una aproximació que es va realitzar va ser la representació dels valors de toxicitat obtinguts en front dels valors del $\log K_{ow}$, el primer en funció logarítmica, tal com es pot observar a la Figura 17.

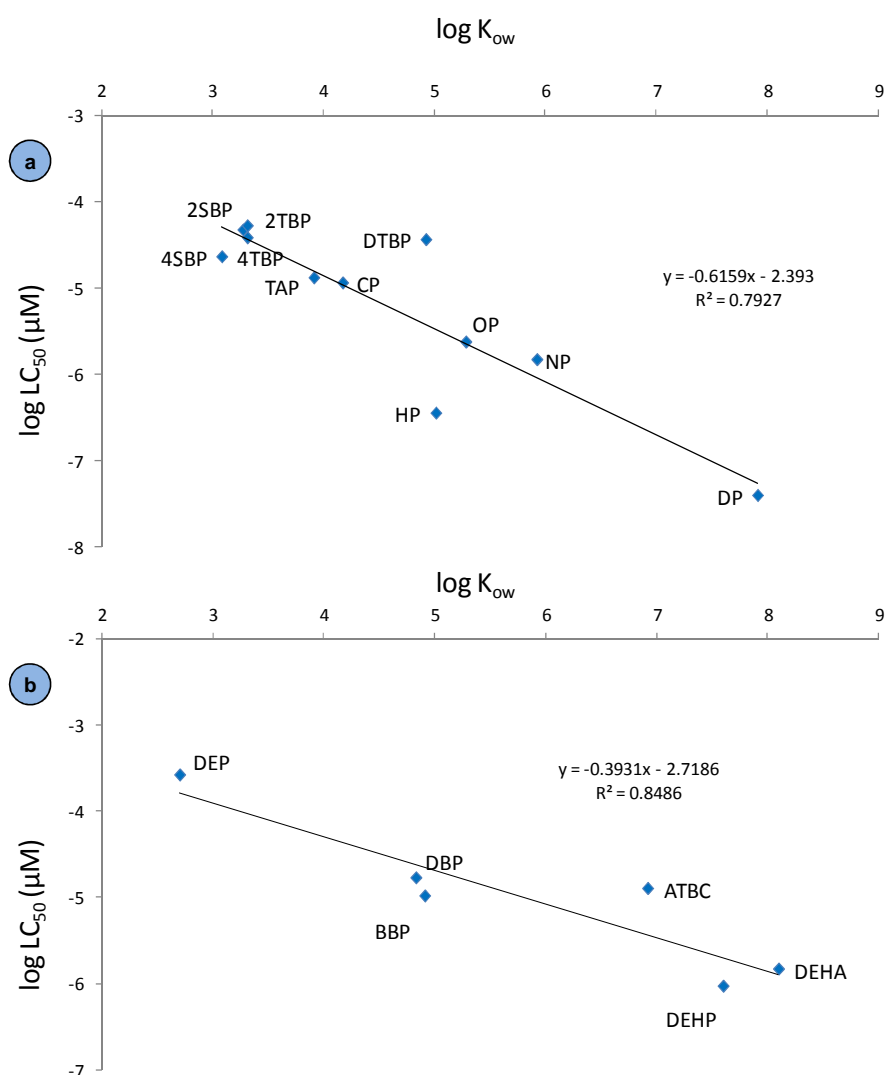


Figura 17. Relació dels logaritmes de la toxicitat i el $\log K_{ow}$ dels alquilfenols (a) i els ftalats (b).

Les dues famílies de compostos tenen una regressió relativament elevada, especialment pels ftalats, el que indica que la toxicitat d'aquests compostos està estretament relacionada amb el seu $\log K_{ow}$. Com major és el seu valor, més facilitat té la molècula per ser absorbida per la membrana cel·lular d'un organisme, de manera que augmenta la seva disponibilitat i capacitat per produir efectes tòxics.

Els valors de LC_{50} obtinguts així com les corbes de toxicitat van demostrar ser molt útils per avaluar el risc que representen la presència de plastificants i BPA en rius.

4.1.4 Estudi de risc

Aplicant els valors toxicològics obtinguts en les proves amb *D. Magna* en els nivells de contaminants detectats al llarg del riu Besòs es pot obtenir un valor de risc o impacte ambiental. L'avaluació de risc pot ajudar a determinar les zones on hi ha un potencial tòxic i a on cal prendre mesures per al control de la contaminació. Aquesta es va portar a terme a partir de les concentracions detectades dels compostos en aigua del riu Besòs i els valors d' EC_{50} obtinguts de *D. magna*. Es van calcular els coeficients de risc (RQ) segons la següent fórmula:

$$RQ = \frac{MEC}{PNEC} = \frac{MEC}{EC_{50}/f}$$

On "MEC" és la concentració ambiental mesurada i "PNEC" és la concentració sense efecte predita. Aquesta última va ser estimada amb un coeficient a partir

de la concentració toxicològica mesurada en *D. magna* (EC_{50}) i un factor de seguretat (f) de 1000, el qual s'aplica de forma arbitrària. Per a la interpretació de dades, el risc màxim probable per efectes ecològics d'aigües contaminades es va seguir segons Wentsel et al. (Wentsel et al., 1996):

$RQ < 1,0$ indica que no hi ha risc significatiu;

$1,0 \leq RQ < 10$ indica un baix potencial per efectes adversos;

$10 \leq RQ < 100$ indica un potencial significatiu per efectes adversos;

$RQ \geq 100$ indica que s'haurien d'esperar efectes adversos.

La Figura 18 presenta els valors de coeficient de risc obtinguts pel BPA, BP, NP, OP, DBP i DEHP en l'aigua de riu. Els punts de mostreig estan ordenats de les capçaleres del Besòs i afluent, fins a la desembocadura. També estan indicats els 3 mostrejors, per comparar les diferències estacionals. Com els RQs són directament proporcionals a les concentracions, aquests gràfics serveixen tant per interpretar el risc com per observar les tendències geogràfiques i temporals.

El DEHP i el DBP es van detectar a concentracions entre 632 i 10774 $ng L^{-1}$, i 595 i 5388 $ng L^{-1}$, respectivament. Tenint en compte els valors de LC_{50} , de 0,34 $mg L^{-1}$ pel DEHP i 4,70 $mg L^{-1}$ pel DBP, s'observa que malgrat tenir ambdós concentracions molt similars, el DEHP va mostrar valors de RQ bastant més alts, degut a la seva major toxicitat (LC_{50} més baixa). De fet, el DBP no va presentar cap potencial per efectes adversos, exceptuant el punt 10 (Santa Perpètua de Mogoda) al novembre 2014, arribant a un valor d'1,2. Per altra banda, el DEHP va presentar els valors de RQ més elevats d'aquest estudi, obtenint els majors valors el novembre, entre 10 i 30 a prop de La Garriga i Ripollet, indicant un potencial significatiu per produir efectes adversos. D'aquesta manera, s'ha identificat una zona on caldria prendre mesures per reduir la presència de DEHP, ja que aquest pot representar un risc pel medi aquàtic.

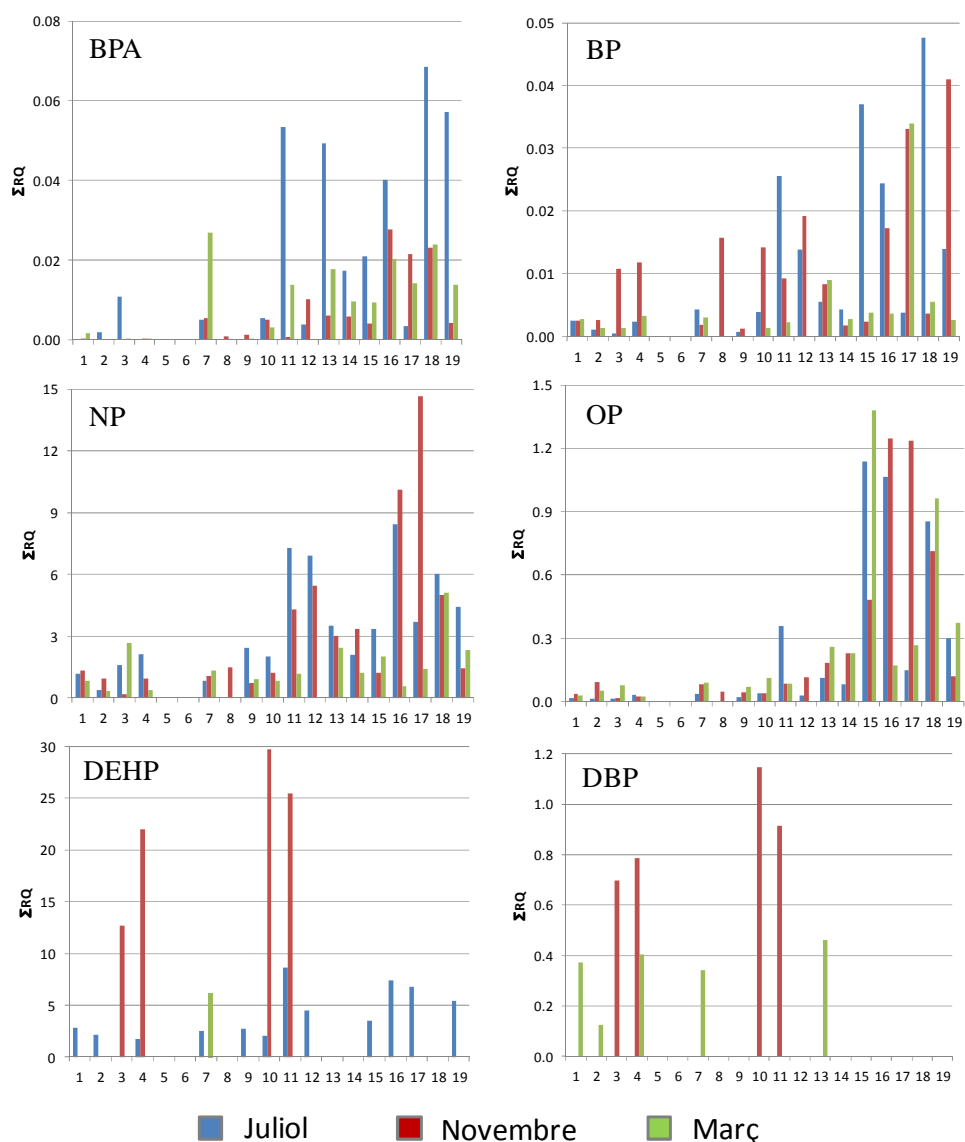


Figura 18. Valors de RQ al llarg del Besòs en els diferents mostrejos.

L'OP i el NP es van detectar a concentracions entre 11,4 i 576 ng L⁻¹, i 57,6 i 4532 ng L⁻¹, i els valors de LC₅₀ van ser de 0,50 i 0,33 mg L⁻¹, respectivament. Per l'OP, en 5 ocasions (en els tres mostrejos) va tenir coeficients de risc lleugerament superiors a 1, el que significa un potencial baix per efectes adversos. Aquest risc es va trobar pels punts de mostreig 15, 16 i 17 (els tres a prop de Montcada i

Reixac), i també en els 3 mostrejos efectuats. En el cas del NP, els valors de RQ van ser considerablement més elevats bàsicament per la seva major toxicitat, i la seva major presència en el riu. Així, la majoria de punts de mostreig van tenir valors de RQ superiors a 1. El cas més extrem va ser el punt 17 (Montcada i Reixach), que el novembre va arribar a quasi un valor de 15, indicant un punt amb un potencial significatiu per efectes adversos que podria afectar a la mortalitat de les espècies aquàtiques que viuen en aquest tram del riu.

Pel cas del BPA i la BP, es van detectar a concentracions entre no detectat i 817 ng L⁻¹, i 5,51 i 604 ng L⁻¹, respectivament. Els valors de LC₅₀ van ser de 11,9 mg L⁻¹ pel BPA i de 12,7 mg L⁻¹ per la BP. Ambdós compostos van tenir coeficients de risc per sota de 1 al llarg de tota la conca i en els 3 mostrejos, indicant que no s'espera cap risc. Al comparar la toxicitat d'aquests dos compostos amb la dels alquilfenols, es pot observar que es troben de l'ordre de 100 vegades més baixes, i com les concentracions es troben del mateix ordre o fins i tot més baixes, la quantitat necessària de BPA o BP perquè suposessin un risc és molt elevada.

Els resultats obtinguts al calcular el coeficient de risc confirmen que les concentracions detectades d'alguns dels plastificants són molt elevades, especialment en el cas del DEHP. Aquest compost, a part de ser l'ftalat més emprat per la indústria, va ser el que es va trobar a concentracions més elevades, superant els nivells màxims admissibles legislats, i al ser un dels plastificants més tòxics, el risc que representa per l'ecosistema pot tenir un impacte important.

4.2 Potabilitzadora de Sant Joan Despí

El Llobregat és l'altre riu que travessa pel sud la zona metropolitana de Barcelona. L'aigua d'aquest s'utilitza com font d'aigua potable, ara bé, primer ha de rebre una sèrie de tractaments que facin possible el consum humà. La planta potabilitzadora encarregada està situada a Sant Joan Despí i realitza les etapes necessàries per la potabilització. A part, es porta un control de qualitat molt extens i de forma continuada, que engloba propietats organolèptiques i contaminants orgànics, inorgànics i biològics, i que permet verificar tant que l'aigua del riu és apte pel seu tractament com l'aigua finalment distribuïda a la xarxa.

La potabilitzadora de Sant Joan Despí, inaugurada l'any 1955, depura l'aigua del riu Llobregat per subministrar-la a tota l'àrea metropolitana de Barcelona, amb més de tres milions d'habitants. Per reforçar els alts nivells de demanda, també s'agafa aigua del riu Ter (potabilitzadora Ter-Llobregat) i dels aqüífers del Llobregat i del Besòs. Aquesta planta és capaç de tractar fins 5300 litres per segon, una de les més elevades d'Europa, i el seu esquema es pot observar a la Figura 23. La Figura 24 mostra imatges de diferents tractaments portats a terme a la pròpia planta.

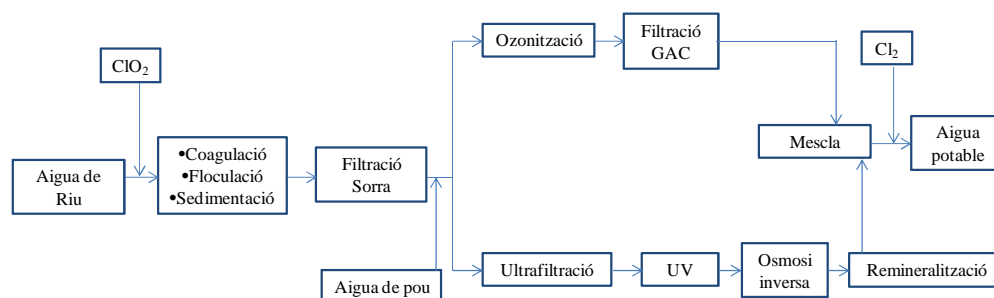


Figura 23. Esquema de les etapes de la potabilitzadora de Sant Joan Despí.

4.2.1 Descripció i mostreig

Per potabilitzar l'aigua del Llobregat, la planta de tractament de Sant Joan Despí col·lecta l'aigua a través d'unes reixes a nivell del fons del riu, que estan formades per diverses barreres de formigó disposades en forma paral·lela. Sota aquestes reixes, unes galeries fan arribar l'aigua a l'interior de la potabilitzadora, on serà desarenada. En aquest moment, l'aigua del riu rep una càrrega d'aigua de pou, que ajudarà a diluir la primera i aconseguir unes millors propietats, i té lloc a la cambra de mescla. És també en aquest punt on s'afegeix el coagulant (basat en sals d'alumini), que servirà per aglutinar les partícules en aigua de menor mida formant-ne de majors, les quals pel propi pes, es separaran per gravetat. Aquesta mescla passa cap a uns vessadors on es subministra diòxid de clor (produït in situ a la planta, a partir d'aigua clorada i clorit de sodi). Aquest reactiu fa que l'aigua es desinfecti i també pot oxidar alguns metalls com el ferro i el manganès, a part de molta matèria orgànica. Després d'aquesta etapa, l'aigua és transvasada per la seva decantació.

L'aigua clarificada és transvasada a uns filtres de sorra, que asseguraran l'eliminació completa de partícules coagulades que no hagin sedimentat. Els filtres tenen diverses capes de sorra i grava de diferent granulometria. Abans de les etapes principals, es capta aigua subterrània provinent de l'aqüífer del riu Llobregat que es mescla amb l'aigua acabada de filtrar per sorra, permetent cobrir la demanda d'aigua en casos de necessitat. Un cop mesclades, l'aigua es reparteix en dues línies independents: una línia de tractament per ozó i filtració de carbó actiu, i una segona línia amb de tractament per membranes d'ultrafiltració, osmosi inversa i remineralització.

Pel que fa a la primera línia, comença amb l'ozonització, que juntament amb el carbó actiu, serveix per millorar les propietats organolèptiques de l'aigua (color, gust i olor). L'ozó té efectes biocides i oxidants, permetent l'eliminació de

microorganismes i l'oxidació de la matèria orgànica. Després de l'ozonòlisi, l'aigua arriba als filtres de carbó actiu, on s'eliminen els compostos orgànics, que queden adsorbits als grans del carbó actiu granular (CAG).



Figura 24. Fotografies de diverses etapes de la potabilitzadora del Llobregat: a) sedimentació, b) ultrafiltració, c) osmosi inversa , i d) remineralització.

La segona línia s'inicia amb la ultrafiltració (UF), unes membranes d'elevada tecnologia. El cabal dividit que passa per aquesta línia s'ha d'acidificar prèviament amb àcid sulfúric per tal d'ajustar el pH per optimitzar al màxim la retenció de

l'alumini residual en la primera etapa d'ultrafiltració. Aquestes membranes estan submergides i funcionen per aspiració de l'aigua cap a l'interior. Tenen una mida que impedeix qualsevol pas de bacteris, però no és suficient pels virus. L'osmosi inversa (OI) necessita que l'aigua de la UF rebi un tractament previ, consistent en radiació ultraviolada, addició de reactius, filtració per cartutx i una altra vegada radiació UV, per tal d'assegurar la protecció de les membranes d'osmosi. La primera radiació serveix per desinfectar i eliminar bacteris i virus que puguin encara resistir les anteriors etapes, o possibles creixements que podrien produir-se. Finalment, la radiació UV torna a aplicar-se per eliminar el possible creixement bacterià que podria tenir lloc en els cartutxos. Un cop aquest tractament previ s'ha efectuat, l'aigua ja pot ser osmotitzada. La OI és una barrera total per a virus i bacteris, i elimina de forma pràcticament total els compostos orgànics i inorgànics. Els valors de conductivitat i TOC queden a nivells molt baixos. L'última etapa d'aquesta segona línia és la remineralització, que serveix per ajustar el contingut de sals minerals, i així, l'aigua obtinguda no sigui ni massa agressiva ni incrustant. Aquesta etapa es realitza en filtres de calcita (carbonat càlcic) on l'aigua es fa passar a través d'un llit d'aquest material.

Un cop acabat el procés en les dues línies, l'aigua es mescla en una cambra específica. Després, té lloc la cloració, que elimina pràcticament el total de contingut d'amoní provinent del tractament d'ozonització i CAG, i garanteix la desinfecció de l'aigua. Un cop acabat el tractament, els cabals s'acumulen en dos dipòsits els quals són bombejats per transportar l'aigua des de la planta fins a la xarxa de distribució (AGBAR).

Les plantes de tractament d'aigua, i especialment les potabilitzadores, tenen com a objectiu principal eliminar qualsevol tipus de compost químic que pugui ser perjudicial per la salut humana. Durant el tractament, l'aigua es bombeja a través de canonades que degut als tipus de materials emprats poden ser una font de contaminació. Això és degut principalment a la utilització de canonades de PVC

en el major dels casos, les quals poden ser una font de BPA i plastificants, especialment d'ftalats i alquilfenols. L'aigua, pel fet de trobar-se en contacte amb aquest material pot veure's afectada per la migració de plastificants de les canonades cap a l'aigua. Aquest efecte també es dona a les llars ja que la majoria de canonades arreu d'Europa són de PVC (Skjevrak et al., 2003).

L'estudi té com objectiu avaluar la presència dels plastificants i BPA a l'entrada i sortida de la depuradora. S'ha demostrat que aquests compostos poden afectar a diferents nivells la salut humana, i per tant, s'han de tenir en compte ja que l'aigua es distribueix a un número molt elevat d'habitants de la regió metropolitana de Barcelona. A part, els propis materials utilitzats en filtres, canonades, dipòsits i membranes poden també afectar la qualitat de l'aigua degut als processos de migració i contribuir a la qualitat final.

Per analitzar les mostres es va emprar un cromatògraf de líquids Acquity (Waters, Estats Units) acoblat a un triple quadrupol TQD (Waters, Estats Units). La columna va ser una Acquity UPLC BEH C18 de 100 x 2,1 mm, amb una mida de partícula de 1,7 µm, de la mateixa casa comercial, amb la seva respectiva precolumna, VanGuard, de 5 x 2,1 mm i la mateixa mida de partícula que la columna. Les extraccions es van fer mitjançant el mètode desenvolupat amb cartutxos d'HLB Oasis de 200 mg i eluint amb una mescla de dicloromèta, hexà i acetona, tal com s'ha indicat en el capítol 3.

4.2.2 Nivells detectats

El riu Llobregat, a l'entrada de la planta de Sant Joan Despí, contenia concentracions elevades de plastificants, a nivells entre 800 i 7000 ng L⁻¹, el que s'atribueix a un baix cabal del riu i unes elevades densitats industrial i urbana al llarg de tota la conca. Els compostos detectats, ordenats de major a menor nivell

van ser el DEHP > DBP > BPA > NP > BP > OP. La presència i concentració d'aquests compostos coincideix amb l'estudi del riu Besòs. El DEHP i el DBP es van trobar a concentracions superiors a 1000 ng L⁻¹, lleugerament inferiors que al Besòs, però també són els que estan a major concentració respecte la resta. El BPA, en canvi, es va detectar a concentracions majors i va superar les del NP. A la Figura 25 es pot observar les concentracions d'aquests compostos en el riu i després del procés de tractament.

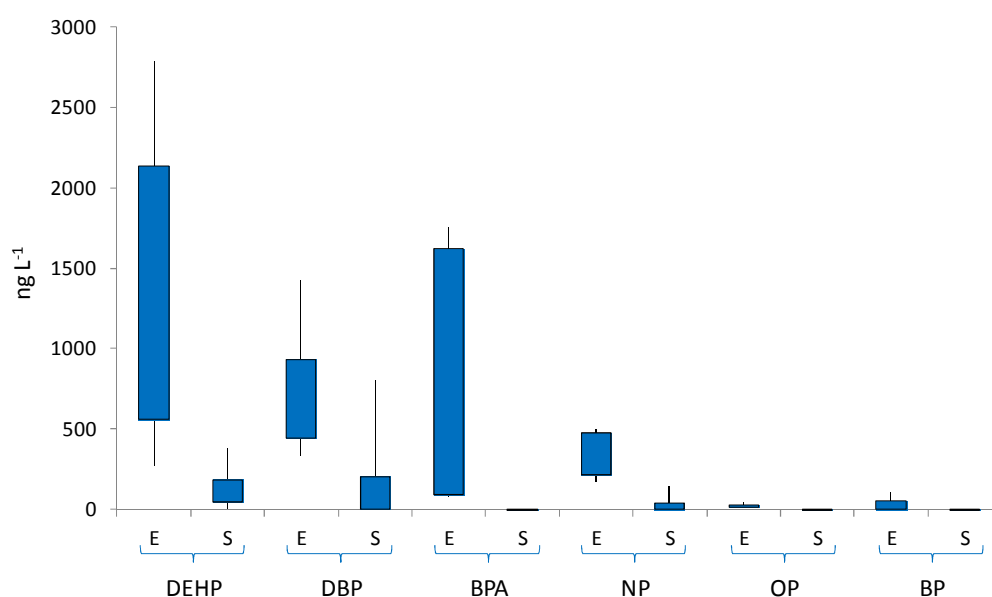


Figura 25. Concentracions dels plastificants detectats a l'entrada (E) i a la sortida (S) de la potabilitzadora de Sant Joan Despí, restant la contribució de la canonada.

Els ftalats presents al Llobregat van ser el DEHP i el DBP. El primer es va detectar a una concentració entre 266 i 1920 ng L⁻¹, més baixes que les detectades al mateix riu l'any 2005, de fins a 3090 ng L⁻¹ (Céspedes et al., 2005). Pel que fa al DBP, els nivells detectats van oscil·lar entre 568 i 1667 ng L⁻¹, similars als determinats 10 any abans, amb un màxim de 1300 ng L⁻¹ (Céspedes et al., 2005).

Al riu Manzanares, a Madrid, es van detectar concentracions de DBP a un màxim de 1759 ng L^{-1} (Domínguez-Moruco et al., 2014). La presència d'aquests dos ftalats s'atribueix al seu ampli i elevat ús, i per tractar-se de rius (com el Llobregat) amb una pressió antropogènica elevada. Les diferències en mostrejos no van ser molt apreciables en el cas del DBP, però més grans en el DEHP, que va oscil·lar pràcticament un ordre de magnitud entre el valor més baix i el més elevat (entre 250 i 2800 ng L^{-1}). Els mostrejos més propers a l'hivern, en ambdós compostos, van presentar els nivells més elevats, superiors als 1000 ng L^{-1} .

El BPA es va detectar entre 96 i 1750 ng L^{-1} al riu Llobregat al llarg dels 4 mostrejos, amb una tendència a trobar-se a concentracions més elevades a l'hivern (uns 1500 ng L^{-1}) que a l'estiu (100 ng L^{-1}). Aquest comportament és similar al del riu Besòs on es va trobar aquesta mateixa tendència. El riu Besòs pateix canvis de fluxos molt acusats, i això es va atribuir a un cabal molt baix durant l'estiu. En canvi, el riu Llobregat no pateix tant les diferències de cabals, excepte quan hi ha riuades, i per tant, els nivells més elevats a l'hivern es deuen a la menor fotodegradació, a l'igual que passa per altres contaminants (Boleda et al., 2013). Aquest compost s'ha detectat en nombrosos rius arreu del planeta, el que reflecteix el seu ús i descàrrega a les aigües superficials. Al riu Ebre es va detectar a nivells de 61 ng L^{-1} (Gorga et al., 2013) i a concentracions entre 327 i 2575 ng L^{-1} (Navarro et al., 2011). En els dos casos, les concentracions d'aquest monòmer es van trobar de forma creixent al llarg de la conca, similar al perfil obtingut en l'estudi del riu Besòs.

Respecte els alquilfenols, malgrat ser compostos amb un alt volum de producció, només es van detectar el NP i l'OP. Pel seus usos, es podia esperar la presència d'altres APs al llarg del riu, degut a les descàrregues d'aigua, però cap es va detectar, malgrat tenir MDL entre $0,46$ i $13,3 \text{ ng L}^{-1}$. La seva solubilitat oscil·la entre $0,014$ i 960 mg L^{-1} , i la probabilitat de trobar-los en aigua seria bastant alta. Ara bé, els alquilfenols de cadena llarga, amb valors de $\log K_{ow}$ superiors a $4,5$, es

podrien trobar adsorbits en la matèria particulada o sediments, tal com s'ha constatat per el NP i l'OP (Milinovic et al., 2004). Com el mètode desenvolupat està optimitzat per determinar tant la part dissolta com la particulada, hauria de ser capaç de detectar els compostos més apolars. Per altra banda, els alquilfenols de cadena curta, degut a l'elevada constant d'Henry, tenen una alta volatilitat, el que podria explicar que no es detectin en aigua. Malgrat això, l'explicació més raonable és que en l'àrea d'estudi, aquests compostos no s'utilitzen.

Segons el valor estàndard de qualitat ambiental de 2000 ng L^{-1} pel NP, el mètode desenvolupat va permetre la seva identificació en aigua de riu. El NP va oscil·lar entre 229 i 525 ng L^{-1} , més baixos que els valors de qualitat ambiental i més baixos que un estudi previ al mateix riu amb un màxim de 2970 ng L^{-1} (Céspedes et al., 2005). Al riu Mondego (Portugal), el NP es va detectar a nivells de 1003 ng L^{-1} (Rocha et al., 2014), un riu amb una elevada presència d'indústria pesada. A Catalunya, al riu Ebre (Navarro et al., 2011), el NP i OP es van detectar entre 152 i 24288 ng L^{-1} i 7 i 1542 ng L^{-1} , respectivament. Aquest riu també rep una forta pressió humana, amb 2,7 milions d'habitants a la seva conca.

La BP es va detectar al riu Llobregat a un rang entre no detectada i 195 ng L^{-1} , i com que es tracta d'un compost poc estudiat, és important determinar el seu destí durant el seu tractament de potabilització de les aigües. Al riu Krka (Eslovènia) es va detectar a 190 ng L^{-1} (Kotnik et al., 2014) i la seva presència s'atribueix a la crema de protecció solar, que conté nivells elevats d'aquest compost, i és molt utilitzada en aquest riu pels nombrosos banyistes durant la temporada estival. És per aquesta mateixa raó que la BP ha estat detectada en aigua de mar (Tovar-Sánchez et al., 2013).

Com el riu Llobregat s'utilitza com a font per potabilitzar l'aigua, es va analitzar els nivells dels plastificants un cop les aigües són tractades. Ambdós ftalats es van trobar en l'aigua final. Pel DEHP, la concentració en l'aigua tractada es va

determinar entre 266 i 2788 ng L⁻¹, el que suposaria una eliminació del 93 ± 12% si es compara amb els nivells de concentració de l'aigua de captació corresponent a cada mostreig. En el cas del DBP, els nivells que es van determinar al riu van ser entre 329 i 1429 ng L⁻¹, i comparant amb la corresponent aigua tractada, equivaldria a una eliminació del 81 ± 6%. Aquestes eliminacions són majors que les trobades per Wang et al. (Wang et al., 2015), on el DEHP s'eliminava només en un 34% en una potabilitzadora a Xina. En aquest estudi, altres ftalats, com el DMP es van eliminar fins a un 70%. Aquesta eliminació l'atribueixen als processos d'oxidació i carbó actiu, i consideren que la coagulació i sedimentació no contribueixen en l'eliminació d'aquest compost. A part, degut a les canonades de la planta, l'eliminació completa dels ftalats és gairebé impossible. Viecelli et al. (Viecelli et al., 2011) van analitzar DEHP en influents i efluent d'una EDAR i van determinar una eliminació de només el 20%, mentre que Lee et al. (Lee et al., 2014), també en depuradora, l'eliminació va ser del 72% pel mateix compost. Els dos atribueixen causes similars a Wang et al. i per tant, les eliminacions baixes poden ser causades pel sistema de canonades de la pròpia planta. Comparant amb altres estudis, el DBP es va detectar en aigua d'aixeta d'Espanya entre 336 i 909 ng L⁻¹, encara que el DEHP no es va detectar (Domínguez-Morueco et al., 2014). Per altra banda, en una altra aigua d'aixeta, a Santiago de Compostela, no es van detectar ni el DBP ni el DEHP, encara que els MDL van ser de 125 i 135 ng L⁻¹, respectivament (Regueiro et al., 2008).

De tots els alquilfenols, només es van detectar el NP i OP. L'aigua tractada va contenir concentracions de NP entre 7 i 143 ng L⁻¹, mostrant que aquest compost no va ser eliminat de forma completa durant la potabilització. L'eficiència de l'eliminació va tenir un promig de 91 ± 8%, indicant que el procés portat a terme elimina el NP de forma bastant satisfactòria. Aquest percentatge és molt similar a l'observat per Barber et al. (Barber et al., 2015), on el NP es va eliminar en un 95% (igual que l'OP). En aquest cas, l'aigua no era potable, sinó només depurada,

i la radiació UV va ser una de les principals raons pel que fa a aquesta elevada eliminació. Ara bé, en un cas contrari, també en aigua de depuradora, Pasquini et al. (Pasquini et al., 2014) van detectar un augment de NP i es va atribuir a la degradació dels nonilfenols etoxilats que podien arribar a la planta, que fàcilment es degradaven a NP, augmentant-ne la concentració final. Les traces observades per Pasquini et al. en l'aigua es poden atribuir al material emprat per recobrir l'interior dels tancs on s'emmagatzema l'aigua abans de la seva distribució a la xarxa. Un altre estudi realitzat a la potabilitzadora de Sant Joan Despí (Petrović et al., 2003) indicà la presència de NP a un nivell màxim de 800 ng L^{-1} . En el cas de l'OP, aquest va ser completament eliminat durant el procés de potabilització. Si s'apliquen els percentatges d'eliminació del NP a l'OP sobre les concentracions al riu, aquest últim es trobaria per sota del MDL, i per tant, no es detecta.

El BPA va ser completament eliminat a través del procés d'addició de ClO_2 , abans de la filtració per sorra. Així, la cloració és eficient per l'eliminació del BPA, encara que aquest procés podria formar espècies clorades degut que la seva aromaticitat fa que sigui molt reactiu al clor (Gallard et al., 2004). El més comú seria la reacció d'òxid de clor amb el grup benzil. El BPA no es va detectar tampoc a l'aigua tractada, pel que el procés elimina el 100% la presència d'aquest compost. En un estudi previ, Rodríguez-Mozaz et al. (Rodríguez-Mozaz et al., 2004) va detectar BPA de forma esporàdica amb un màxim de 5 ng L^{-1} a la mateixa planta de Sant Joan Despí. Respecte les eliminacions, no totes les plantes aconseguen aquest 100%, i per exemple, Dupuis et al. (Dupuis et al., 2012) va identificar un 79% en una potabilitzadora, mentre que en una depuradora al nord d'Itàlia, Viecelli et al. (Viecelli et al., 2011) només eliminà el 40%, encara que en aquest darrer cas, la planta no disposava de tractaments gaire avançats.

La BP, per altra banda, no es va detectar en l'aigua potabilitzada. Això podria explicar-se per les etapes de cloració, que poden reaccionar amb alguns compostos amb dobles enllaços conjugats i degradar-los (Gallard et al., 2004).

Aquest compost no s'ha detectat en estudis previs en aigües destinades al consum humà.

Les plantes de tractament d'aigua potable tenen una elevada capacitat per eliminar els plastificants presents en l'aigua que capten dels rius. Compostos com el BPA, OP i BP poden ser eliminats en la seva totalitat, mentre que els ftalats com el DEHP i el DBP, o el NP, ho són de forma parcial, però amb eficiències superiors al 80%.

Això pot fer pensar que alguns materials utilitzats en les canonades puguin alliberar algun d'aquests compostos. De fet, es va observar que aigües agafades de les canonades de PVC contenien nivell entre 200 i 3500 ng L⁻¹ d'ftalats. En totes les mostres d'aigua de distribució analitzades, les concentracions detectades estaven a nivells d'ultra traça, la qual cosa indica la bona efectivitat i control de l'aigua de Barcelona.

5. Degradació del BPA

El BPA és el monòmer més utilitzat en la fabricació de plàstics, especialment el PVC i les resines epoxi. En el capítol 3 es va constatar que el BPA es troba en aigua de riu a concentracions properes a 1000 ng L^{-1} i que degut a la seva elevada LC_{50} no produeix cap risc pels organismes aquàtics. Malgrat tot, hi ha certa controvèrsia sobre l'impacte ambiental que representa el BPA, ja que la seva presència és constant i contínua. Per tant, és important conèixer el comportament d'aquest compost al medi, en especial pel que fa a la seva estabilitat. Així, es va avaluar la seva fotodegradació i es va estudiar la seva cinètica de degradació així com els fotoproductes formats durant aquest procés. Aquest sistema pretén simular els processos que poden tenir lloc de forma natural, malgrat que els experiments es van realitzar exposant el BPA a llum UV i no solar, de manera que s'acceleraria la velocitat de degradació d'aquest compost. La fotodegradació es va fer sota exposició a llum UV en aigua milli-Q, aigua milli-Q fortificada amb àcids húmics a 5 mg L^{-1} (concentració habitual en rius) i dues aigües del riu Besòs, de Tagamanent (aigua propera al naixement del riu) i de Sant Adrià del Besòs (la desembocadura). Els àcids húmics són una mescla de compostos amb grups carboxílics i poden generar espècies radicalàries sota llum UV, de manera que poden afectar la degradabilitat d'un compost. Els fotoproductes del BPA es van identificar mitjançant cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses d'alta resolució (LC-HRMS) utilitzant un TOF. Per tal de determinar la toxicitat de les espècies formades, la *D. magna* es va emprar com organisme model al qual es van exposar les diverses alíquotes de BPA exposat a llum UV.

5.1 Condicions de fotodegradació

El procés de fotodegradació es va monitoritzar al laboratori mitjançant l'espectroscòpia UV, on una sèrie d'espectres UV van ser enregistrats en funció

del temps. Els canvis de les bandes d'absorció contenen la informació necessària per descriure l'evolució del procés sota estudi i l'anàlisi de les alíquotes a diferents temps per LC-HRMS permet identificar les espècies formades.

La degradació de les mostres va portar-se a terme mitjançant la làmpada UV de 254 nm/12W connectada en línia amb un espectrofotòmetre Diode Array Agilent 8453 controlat per un ordinador per tal de portar a terme l'adquisició de dades durant la monitorització. L'espectre va comprendre de 190 a 1100 nm, però les dades es van analitzar de 190 a 400 nm, rang on el BPA presenta absorbència. Per cada matriu d'aigua, una solució de BPA de 20 ng μL^{-1} va ser exposada a la llum UV i l'espectre va ser enregistrat just encendre la làmpada i cada minut en un experiment que va durar 4 hores. Les dades dels espectres van ser processades mitjançant un model de corba de resolució multivariable i alternança dels quadrats (MCR-ALS). Aquesta informació dona resultats qualitius i quantitius sobre les espècies químiques formades i el procés cinètic. Els paràmetres cinètics van ser calculats a partir de la disminució de la concentració de BPA en el temps, el qual va seguir una reacció cinètica de primer ordre. Els resultats van ser donats emprant el logaritme natural de la concentració de l'analit com una funció del temps. La constant cinètica es va determinar per una anàlisi de regressió. La fotodegradació d'un compost es descriu mitjançant una equació cinètica de primer ordre, on C és la concentració del compost degradat en el temps i K és la constant de velocitat de fotodegradació. Integrant l'anterior equació:

$$C(t) = C_0 - Kt$$

que també es pot expressar com:

$$\ln C(t) = \ln C_0 - Kt$$

Es pot descriure la degradació d'un compost a partir del temps de vida mitjana

que és el temps que triga la concentració inicial d'una molècula a reduir-se a la meitat. Per tant:

$$C = \frac{C_0}{2}$$

$$\ln\left(\frac{C_0}{2}\right) = \ln C_0 - Kt_{1/2}$$

$$\ln C_0 - \ln 2 = \ln C_0 - Kt_{1/2}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K}$$

S'ha avaluat la vida mitjana del BPA en diferents tipus d'aigua, incloent l'aigua de riu, per determinar l'estabilitat d'aquest compost simulant unes condicions el més semblants a la realitat. Tot i així, la làmpada utilitzada emet radiació UV a una única longitud d'ona i a una intensitat elevada, que són condicions més extremes que les de la radiació natural que emet el Sol.

5.2 Identificació de fotoproductes

Per tal d'identificar els productes de fotodegradació formats es van fer els experiments utilitzant aigua milli-Q per evitar la presència de compostos interferents que podrien dificultar llur identificació. Les alíquotes van ser agafades a 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 90, 120 i 180 minuts d'irradiació UV i guardades en vials cromatogràfics àmbar, els quals van ser ràpidament congelats per prevenir la continuació del procés de degradació. Es van agafar 500 µL de mostra, i s'hi van afegir 500 µL de metanol i la solució va ser directament injectada a LC-HRMS. Es va utilitzar un cromatògraf de líquids Agilent 1200 RRLC (Agilent, Waldbronn, Germany) acoblat a un analitzador híbrid

quadrupol-temps de vol (Q-TOF) QSTAR Elite (ABSciex, Concord, Ontario, Canada). La columna per a la separació va ser una Zorbax Eclipse XDB C18 150 x 2,1 mm de diàmetre intern, 5 µm (Agilent). El flux de treball va ser de 0,4 mL min⁻¹ i el volum d'injecció de 5 µL. Les fases mòbils van consistir en aigua milli-Q (A) i metanol (B). La separació va tenir lloc en 20 minuts en les següents condicions, per tal de tenir la màxima resolució cromatogràfica: 0 minuts, 20% de B; 15 minuts, 100% de B; 20 minuts 100% de B. La columna fou equilibrada durant 5 minuts abans de cada anàlisi. L'adquisició d'espectrometria de masses va tenir lloc en ionització amb electrospai en mode negatiu emprant adquisició d'informació depenent (information-dependent acquisition, IDA) entre m/z 90 i 1100. Els paràmetres d'ionització van ser: voltatge de esprai iònic, -4200 V; potencial anticluster, -60 V; temperatura, 400°C amb gas cortina (N₂), 50 a.u. (unitats arbitràries), gas auxiliar, 50 a.u. i gas nebulitzador (N₂), 50 a.u. L'IDA es va fer emprant el següent criteri: ions que excedien 5 counts, tolerància iònica de 50 mDa i una energia de col·lisió fixada a -30 V. La composició elemental de cada fotoproducte va ser calculada segons la massa acurada i el patró isotòpic segons el software de Formula Finder, Analyst QS 2.0 (ABSciex).

5.3 Resultats i discussió

El BPA és un compost que es troba de forma ubiqua en aigües de riu però no ocasiona cap risc tenint en compte la seva toxicitat aguda, tal com s'ha descrit al Capítol 4. Tanmateix, és un compost que en els darrers anys ha generat molta controvèrsia degut al seu potencial tòxic i nivells que es detecten en diferents rius (Herrero-Hernández et al., 2013; Rocha et al., 2012). Per avaluar el risc real, és important estudiar el seu destí ambiental en condicions reals. La fotodegradació és segurament el procés més important pel qual un contaminant orgànic soluble és degradat en el medi ambient (Stone i Watkinson, 1983). Per tal d'avaluar el

destí del BPA en aigua de riu, es va simular la seva fotodegradació en condicions controlades al laboratori. En primer lloc, l'espectre d'UV del BPA té dos màxims d'absorció a 225 i 275 nm (Figura 19), i indica que aquest compost té una important càrrega aromàtica, i que podria ser subjecte a una fotodegradació, ja que les espècies radicalàries formades amb la llum UV tenen una gran afinitat pels electrons que tenen una posició relativament lliure en anells de benzè (en el cas del BPA) o en dobles enllaços conjugats, en el cas general.

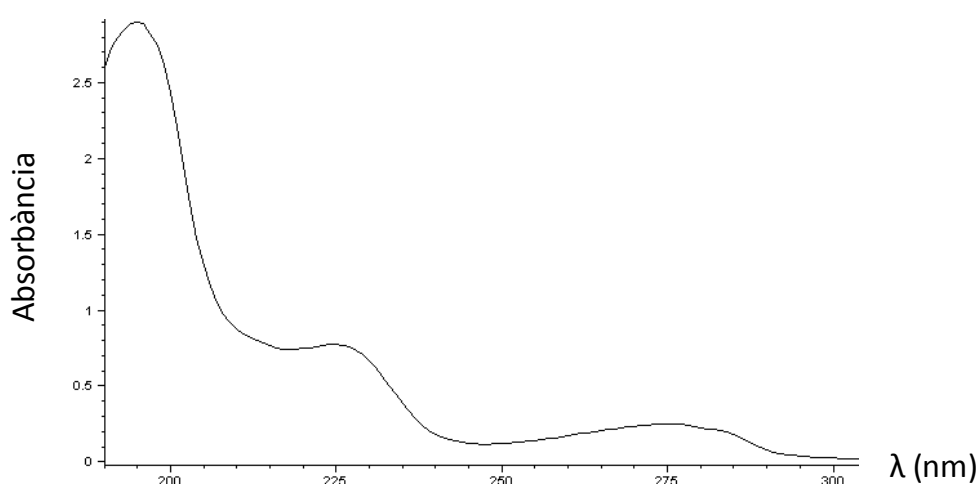


Figura 19. Espectre UV del BPA.

La Figura 20 mostra l'espectre obtingut de la monitorització espectroscòpica de 20 mg L⁻¹ de solució de BPA en aigua milli-Q durant les 4 h d'irradiació. S'observa un canvi de l'espectre d'absorbància que correspon a les diferents espècies que es van formant en el temps. A més, la superposició dels diferents espectres posen en evidència que el compost s'està transformant i la disminució de la concentració inicial de BPA comporta la formació d'altres productes que tenen un espectre característic que s'entrecrua amb el del BPA per la presència de màxims d'absorbància diferents. Les constants cinètiques mesurades per

espectrofotometria i modelatge de dades es mostren a la Taula 16 i segueixen el següent ordre: aigua milli-Q > aigua milli-Q espicada amb àcids húmics > aigua de la desembocadura > aigua del naixement.

Taula 16. Paràmetres cinètics obtinguts pel BPA en cada tipus d'aigua, amb els corresponents valors de TOC.

Mostra	R ²	K (min ⁻¹)	t _{1/2} (min)	TOC (mg L ⁻¹)
Aigua Milli-Q	0,929	0,0365	19,0	< 1
Aigua àcids húmics	0,938	0,025	27,7	5
Aigua Besòs (Sant Adrià del Besòs)	0,964	0,022	36,5	10,7
Aigua Congost (Tagamanent)	0,962	0,017	40,8	3,12

Amb un temps de vida mitjana ($t_{1/2}$) de 19-41 minuts, aquests resultats són comparables amb els obtinguts per da Silva et al. (da Silva et al. 2014), els quals descriuen una fotòlisi en aigua milli-Q amb un temps de vida mitjana de 69 minuts pel BPA, el qual és major que l'obtingut en aquest estudi. Ara bé, da Silva et al. van utilitzar una làmpada UV amb una potència menor (9 W) i un rang de longituds UV més ampli (200-280 nm) en comparació a les condicions emprades en aquest estudi (12 W i 254 nm). La degradació del BPA en aigua milli-Q fou més ràpida que la degradació en aigua fortificada amb àcids húmics i aigües de riu. La presència de carboni orgànic té una gran influència ja que és capaç de competir amb els radicals OH produïts a partir de la llum UV. En aigua de riu, la degradació de BPA és afectada pels àcids húmics, així com també pels àcids fúlvics i altres compostos inorgànics capaços de reaccionar amb els radicals OH, inhibint en part la degradació del BPA (Souza et al. 2014). Aquests compostos interfereixen en la

reacció reduint el número d'aquests radicals i per tant, afecten de forma considerable la cinètica (González et al., 2007).

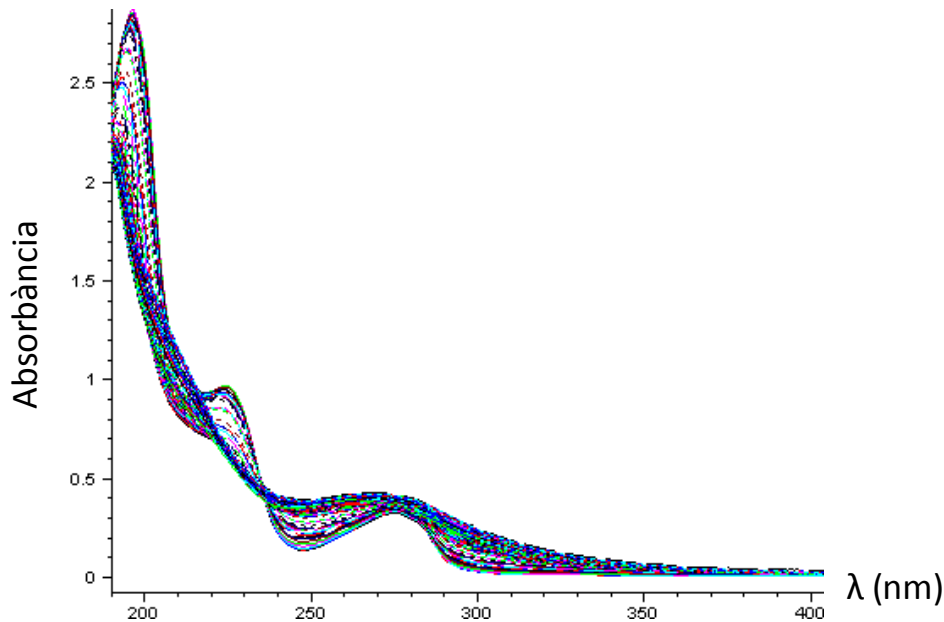


Figura 20. Evolució de l'espectre d'absorció del BPA al llarg de 3 hores sota la llum UV. Als 60 min, els màxims d'absorbància van desaparèixer.

Malgrat que la matèria orgànica pot afectar de forma que allarga la vida mitjana del BPA, tal com expliquen da Silva et al. i Crain et al. (da Silva et al., 2014; Crain et al., 2007), altres autors han experimentat comportaments diferents. Per exemple, Chin et al. (Chin et al., 2004) van observar com la presència de matèria orgànica podia accelerar la reacció de fotodegradació, especialment en presència d'alguns cations inorgànics com el Fe^{3+} , que actuava com a catalitzador. També consideren que la radiació solar pot afectar molt poc a la degradació del BPA, ja que només afectaria a la part més superficial del riu, mentre que a major profunditat, l'efecte seria molt menor. S'ha de comentar que els experiments

portats a terme per Chin et al. es van realitzar amb un simulador UV d'una intensitat més baixa que el present treball, i al cap d'unes 40 hores, la degradació del BPA encara no era completa. De forma similar, Peng et al. (Peng et al., 2006) van determinar un comportament similar, també amb àcids húmics i ions de ferro, però en aigua de llac fortificada a 10 mg L^{-1} . La reacció cinètica es va veure incrementada en aquestes condicions. De fet, conclouen que el BPA amb llum solar per si sola és poc reactiu. Aquesta conclusió contrasta amb els autors citats anteriorment i amb l'experiment portat a terme en aquesta tesi, on només amb aigua milli-Q i radiació UV el BPA es va degradar de forma completa en menys de 2 hores. La vida mitjana del BPA va ser de 36,5 minuts en aigua de riu sota les condicions donades en aquesta tesi, mentre que en condicions de degradació natural, aquest temps és de 4,5 dies (Crain et al., 2007). Així, la fotodegradació va tenir lloc prop de 180 vegades més ràpid en aigua de riu exposada a llum UV que sota llum natural. Això és principalment degut que només un 10% de la llum emesa pel Sol es troba dintre del rang UV.

Andreozzi et al. (Andreozzi et al., 2003) van estudiar diferents contaminants orgànics, especialment fàrmacs, amb estructures aromàtiques, i van avaluar l'efecte que produïa la presència dels àcids húmics. Per exemple, pel diclofenac, la presència d'aquests compostos van alentir la reacció, mentre que per l'oflaxocina, van actuar com uns catalitzadors accelerant la reacció. Com a conclusió, les estructures dels compostos contribueixen en gran manera a la cinètica de fotodegradació, i pel BPA no hi ha un clar consens. Ara bé, en experiments en condicions més extremes de llum UV, sembla que els àcids húmics poden inhibir aquesta fotodegradació per reaccions de competició pels radicals $\text{OH}\cdot$ formats.

L'estudi MCR-ALS va permetre la identificació del BPA i dos productes de degradació amb diferents espectres d'absorció i on el màxim d'absorbància varia. En tots els experiments, la descomposició dels valors singulars (SVD), aplicant les

restriccions de no negativitat en la direcció espectral i de concentració, i de selectivitat i sistema tancat, en la direcció de concentració, va senyalar la presència d'aquests 3 components. A la Figura 20 es pot observar com l'espectre (on cada línia representa un minut) va canviant al llarg del temps i s'hi produeixen interseccions. Aquestes normalment són degudes a l'aparició de noves espècies, que com tenen màxims d'absorbància diferents, es poden apreciar en aquests encreuaments. L'estudi MCR-ALS va confirmar el fet que es detectessin 3 compostos, el BPA i 2 fotoproductes, i es va quantificar la cinètica a partir de l'ordre de reacció (1) pel procés de fotodegradació. Malgrat que aquesta tècnica permet la identificació del nombre d'espècies que es formen durant el procés de fotodegradació, és insuficient per identificar-les. A part, algunes espècies que no presenten aromaticitat o tenen màxims d'absorció similars entre ells no es poden dilucidar. Per tal d'identificar les espècies formades, es va utilitzar la LC-HRMS ja que es poden elucidar les possibles estructures a partir de la massa exacta de cada espècie (Krauss et al. 2010). Per LC-HRMS, es van identificar 5 productes de fotodegradació del BPA en aigua milli-Q (Figura 21). A la Figura 22 es pot observar l'evolució de la reacció de fotodegradació, amb la formació i eliminació de cada fotoproducte. A temps 0, només es va detectar BPA, mentre que a partir de la primera mostra, presa al minut 5, també es van detectar els productes I, III i IV. El II i el V només es van detectar entre els minuts 20 i 40, compostos que són poc estables. A partir dels 60 minuts, el BPA desapareix, i només es va observar el fotoproducte I, que passats 120 min encara es va detectar, i per tant, és el més estable a la llum UV.

L'espectre de masses d'elevada resolució de cada pic cromatogràfic va permetre proposar la fórmula molecular de cada fotoproducte amb errors baixos propers als 5 mDa. La Taula 17 mostra el temps de retenció per a cada fotoproducte, les masses teòriques i experimentals, els seus respectius errors, la composició elemental i l'estructura proposada. Els productes de fotodegradació I i II es van

formar per la hidroxilació del BPA. Els grups hidroxils són molt reactius amb molècules aromàtiques presents en aigua, i la llum UV intensifica la formació dels radicals hidroxils, seguint la llei de Markovnikov (Yuzawa et al. 2013). Els temps de retenció també concorden amb les estructures moleculars, ja que la presència de més grups hidroxils incrementen la polaritat de la molècula i per tant, tenen un temps de retenció menor. El fotoproducte III presenta un grup quinona format de l'oxidació de I. El fotoproducte IV es podria formar de la hidroxilació de I i una reducció dels anells de benzè, perdent les propietats aromàtiques. El fotoproducte V podria ser format per l'addició d'un hidroxil al C2 de I, seguit d'una fragmentació fenòlica (da Silva et al. 2014).

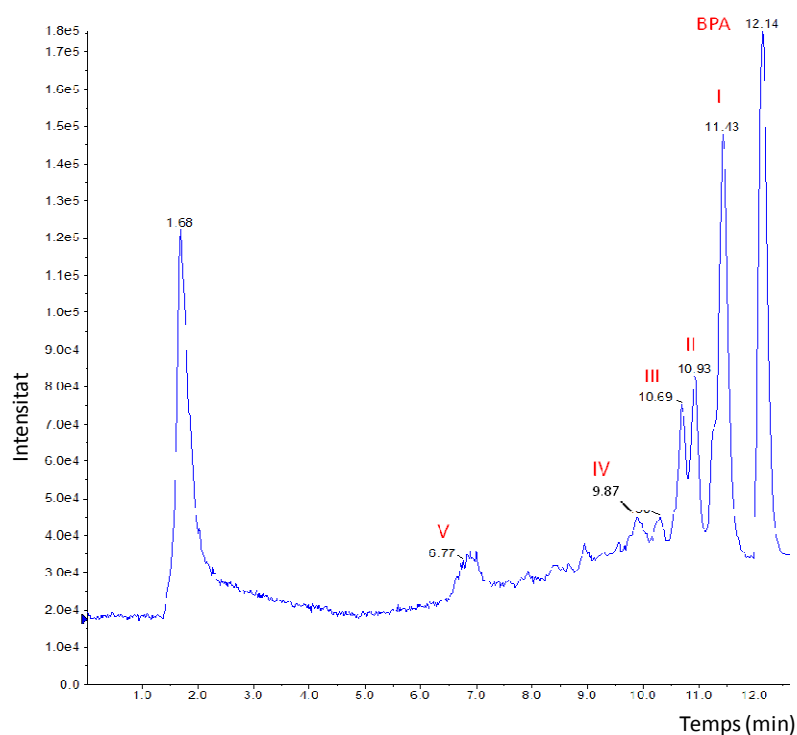


Figura 21. Cromatograma HRMS dels BPA i els seus productes de fotodegradació a temps 25 minuts.

Mentre que es van identificar 5 fotoproductes per LC-HRMS, només dos fotoproductes van ser observats per espectrofotometria i MCR-ALS. La raó principal és que el fotoproducte IV no té propietats aromàtiques i per aquesta raó, no podia ser detectat per espectrofotometria. A més, altres fotoproductes, com són el I i el II, tenen una estructura química molt similar, pel que podrien tenir un espectre d'absorbància similars, i per tant, l'estudi MCR no va ser suficient per resoldre'ls. Cal observar també que les posicions dels grups hidroxils, en el cas de tots els fotoproductes, no s'han pogut confirmar en aquest estudi i les que s'han proposat provenen de l'estudi de da Silva et al. citat anteriorment (da Silva et al., 2014).

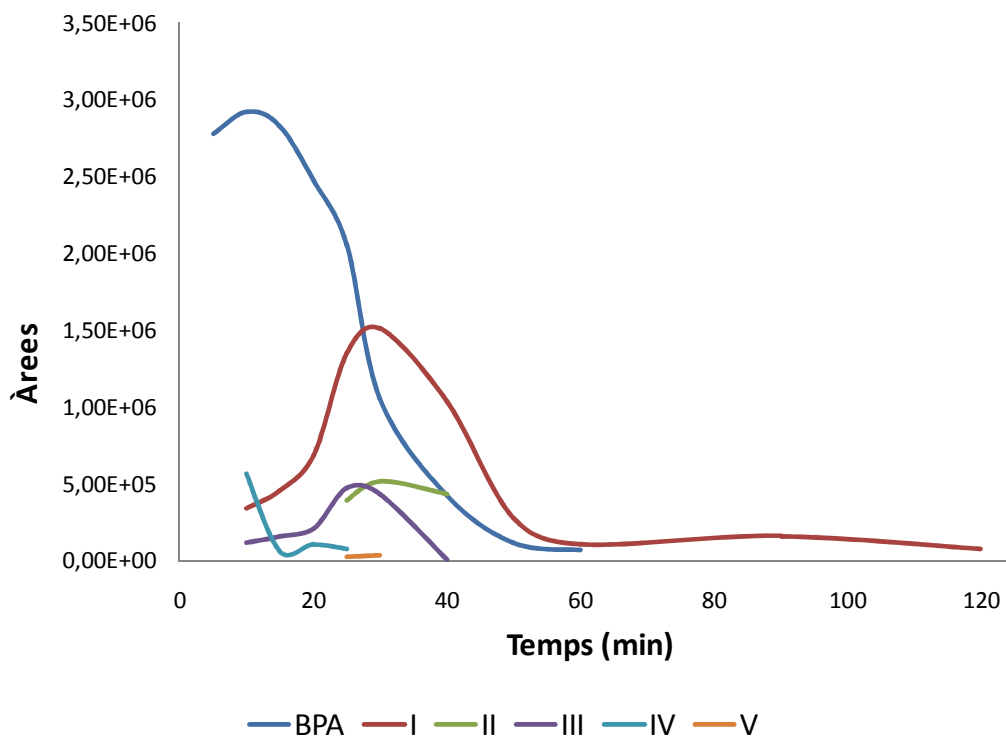


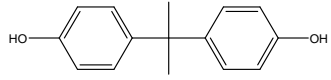
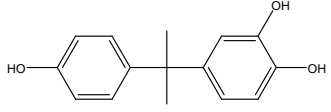
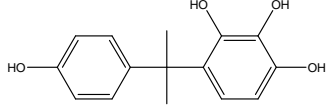
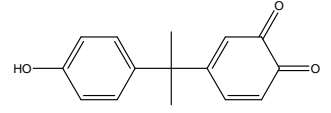
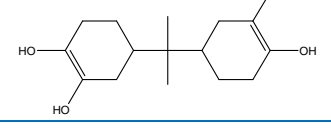
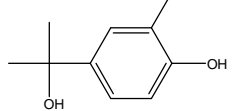
Figura 22. Evolució del BPA i els 5 fotoproductes durant 120 hores de reacció i anàlisi per LC-HRMS.

Pocs investigadors han centrat el seu treball en la identificació dels fotoproductes del BPA, pel que la comparació amb estudis previs és complicada. Zhan et al. (Zhan et al., 2006) van estudiar la fotodegradació en presència de nitrats i es va observar que reaccionaven amb l'anell de benzè del BPA i formava noves estructures. Algun dels fotoproductes identificats en l'estudi de Zhan et al. van resultar inestables, i també es van degradar, donant lloc a espècies amb només un anell de benzè i grups hidroxils, molt similars a les del fotoproducte V.

Barbieri et al. (Barbieri et al., 2008), els quals van treballar sota condicions de llum solar natural i en presència de riboflavina i condicions de pH alcalines, van identificar 7 fotoproductes ja que s'afavoria la reacció pel BP. Dos dels fotoproductes identificats en aquest estudi coincideixen amb els fotoproductes I i II obtinguts en aquesta tesi.

Les implicacions d'aquest estudi són importants, ja que demostren que el BPA té una certa estabilitat com a producte químic, però que en presència de llum i al llarg d'un temps determinat, aquest pot degradar-se i formar altres fotoproductes. L'estudi dels fotoproductes és important ja que poden produir certa toxicitat, de forma similar al BPA, de manera que són compostos que potencialment poden afectar el medi ambient.

Taula 17. BPA i els seus productes de degradació, amb els valors experimentals obtinguts i les possibles estructures formades.

Compost	t_R (min)	Massa experimental (m/z)	Massa calculada (m/z)	Fórmula	Error (mDa)	Estructura proposada
BPA	12,14	227,1093	227,1108	$C_{15}H_{15}O_2$	1,5465	
I	11,44	243,1079	243,1131	$C_{15}H_{15}O_3$	5,2519	
II	10,68	259,1037	259,1098	$C_{15}H_{15}O_4$	6,1172	
III	10,92	241,0942	241,0990	$C_{15}H_{13}O_3$	4,8819	
IV	9,88	263,1333	263,1377	$C_{15}H_{19}O_4$	4,4171	
V	6,77	167,7062	167,7110	$C_9H_{11}O_3$	4,8320	

Un cop es van identificar els productes de degradació, es va decidir realitzar un estudi toxicològic en *Daphnia magna* per tal de determinar la toxicitat dels fotoproductes. L'experiment va consistir en exposar els organismes seguint les especificacions recomanades al Capítol 4 a alíquotes corresponents a diversos punts de degradació: al minut 0, on només hi ha presència de BPA, a punts intermedis de 10, 20, 30 i 40 minuts, i a 180 min, on el BPA s'havia eliminat de forma completa. A la Taula 18 s'indiquen els fotoproductes corresponents a cada alíquota i la LC₅₀ (en mg L⁻¹) corresponent.

Taula 18. Fotoproductes presents a diferents temps de la fotodegradació del BPA i LC₅₀ en *D. magna* de la mescla.

Temps de degradació (min)	LC ₅₀ (mg L ⁻¹)	Fotoproductes presents
0	21,2	BPA
10	18,6	BPA, I, III i IV
20	>30	BPA, I, III i IV
30	21,4	BPA, I, II, III, IV i V
40	18,9	BPA, I, II i III
180	>30	I

Tal com es pot observar, els valors de toxicitat van variar al llarg del temps i no van seguir una tendència lineal, sinó que la toxicitat de la alíquota a 10 minuts va augmentar mentre que la toxicitat de la de 20 min va disminuir considerablement. Després, als 30 minuts la toxicitat va ser similar a l'inicial i als

40 min es va incrementar lleugerament, i finalment, al minut 180, la toxicitat va ser mínima.

Si es comparen els resultats de LC_{50} i els fotoproductes presents, tal com estan indicats a la Taula 18 i a la Figura 22, es pot explicar de forma descriptiva la toxicitat de cada fotoproducte. En primer lloc, el fotoproducte I resulta poc tòxic, ja que al minut 180 no presenta toxicitat, malgrat encara trobar-se a una concentració relativa considerable. Així, a l'alíquota del minut 10, la toxicitat augmenta malgrat disminuir la concentració de BPA, i d'aquí és després que els fotoproductes III i IV tenen una toxicitat major que el propi BPA (de forma conjunta). Si aquest valor és degut a efectes sinèrgics o a la toxicitat de només un d'ells no es podria discernir a primera vista. Però es pot observar com a l'alíquota de 20 minuts, que pràcticament no és tòxica, el fotoproducte IV disminueix considerablement, el III arriba al seu màxim i l'I augmenta. Així, la desaparició del IV i la desaparició de toxicitat van lligades, i fa suposar que aquest és el més tòxic. El III no presentaria toxicitat, i l'I, malgrat també trobar-se en el punt màxim de concentració, tampoc fa disminuir el valor de LC_{50} . A l'alíquota de 30 min es on la toxicitat torna a augmentar. En aquest cas, es pot atribuir a l'aparició dels fotoproductes II i V, mentre que el BPA i el IV es detecten a baixa concentració. Com en el cas anterior, per poder diferenciar la toxicitat del II i el V, és suficient observar el minut 40 de reacció: la toxicitat augmenta i el fotoproducte V ja no es va detectar, mentre que la concentració del II es va mantenir constant, el qual és el que contribueix de major forma a la toxicitat observada.

S'han identificat els fotoproductes II i IV com els més tòxics i ambdós van correspondre a compostos que presenten 4 grups hidroxils units als grups fenols. Aquest fet augmenta la polaritat dels compostos i podria fer augmentar la seva biodisponibilitat per la *D. magna*, augmentant així la toxicitat. L'estabilitat d'aquests compostos en aigües exposades a llum UV és baixa i l'alíquota a 180 minuts només va presentar el fotoproducte I. Per tant, malgrat que s'han de tenir

en consideració aquests productes de degradació, la llum solar podria ser capaç tant de generar-los a partir del BPA, com eliminar-los finalment. La seva toxicitat però, s'hauria d'estudiar més profundament per tal de determinar com el BPA i els seus productes de degradació poden suposar un risc pel medi ambient.

En resum, l'estudi de la fotodegradació del BPA en condicions controlades de laboratori ha permès determinar que aquest compost es degrada sota llum UV i que aquest procés genera fotoproductes que poden ser més tòxics que el producte parental. Malgrat que les condicions de laboratori no es poden extrapolar al medi ambient, aquest estudi ha permès identificar els fotoproductes generats i això és de primordial importància per a poder-los detectar en el medi ambient. A més, cal destacar que els riscos que pot generar el BPA als organismes aquàtics pot ser degut a la presència de fotoproductes i no al BPA com a tal. Per últim, per determinar els efectes, caldria avaluar la seva degradació en condicions reals, és a dir, utilitzant aigües de riu exposades a llum solar.

6. Monitorització de begudes

Les begudes refrescants constitueixen un producte d'elevat consum i presenten una gran varietat tant de tipus com de formats d'envasament, on els més habituals són les llaunes i les ampolles de PET. Degut al procés d'envasat o al temps d'emmagatzematge del producte, les begudes refrescants poden contenir nivells de plastificants a través de la migració. Si aquests es troben a concentracions elevades, poden representar un risc per la salut humana al ser ingerits en condicions habituals de consum d'aquests productes.

Així, l'objectiu d'aquest estudi va ser avaluar la presència dels monòmers i additius dels plàstics en les begudes. A la bibliografia es troben molts treballs enfocats a aliments sòlids, però les begudes refrescants han estat poc estudiades. Això és degut que no hi ha una legislació per al control de plastificants i també per la seva dificultat d'anàlisi, ja que contenen elevades quantitats de sucres i additius i polpa de fruita. S'ha constatat que les begudes contenen plastificants i monòmers procedents del propi envàs (Braunrath et al., 2005) i per tant, l'anàlisi d'aquesta matriu té un important interès pel que fa a la salut humana. Per aquesta raó, es va decidir fer un ampli mostreig de begudes presents al mercat espanyol així com avaluar la seva toxicitat, tant pel que equival a la ingesta diària (i comparada amb el TDI) com pel que fa a la toxicitat utilitzant les cèl·lules cancerígenes de placenta humana JEG-3 com a model per avaluar els efectes a nivell de disrupció cel·lular.

6.1 Presa de mostra

Es van seleccionar 50 begudes representatives del mercat espanyol, segons les més consumides. Martín et al. (Martín et al., 2014) van realitzar un estudi i les begudes de cola i de fruita eren les més consumides, mentre que les tòniques les que menys, i a partir d'aquests consums es van escollir el número de begudes de cada grup. Les diverses marques es van agrupar en 7 categories: coles, tòniques,

begudes energètiques, isotòniques, begudes amb te, sodes i begudes amb alt contingut de suc de fruites. La proporció d'aquestes categories està indicada a la Figura 26. En tots els casos que va ser possible, es van adquirir les mostres en format llauna i ampolla de PET per tal de comparar la migració dels diferents plastificants i monòmers del plàstic segons el tipus d'envàs. Les begudes es van comprar a diferents supermercats de Barcelona a l'octubre de 2014, i es van guardar a temperatura ambient (20°C) fins la seva anàlisi.

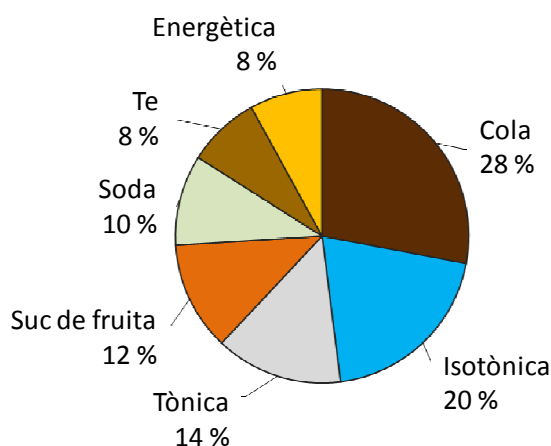


Figura 26. Proporció de tipus de begudes analitzades

Les mostres, sense especificar marques, estan indicades a la Taula 19. Estan agrupades per begudes energètiques, amb te, isotòniques, amb suc de fruita, tòniques, sodes i coles, i en el cas de ser la mateixa mostra i només canviar l'envàs, s'indiquen ambdues amb el mateix número. Les mostres de begudes es van extreure mitjançant el mètode d'extracció líquid-líquid desenvolupat a partir d'una beguda de cola i descrit en el Capítol 3. Un cop extretes, es van analitzar mitjançant la tècnica LC-MS/MS. Els compostos que es van analitzar van ser el BPA, BP, CP, TAP, HP, OP, NP i DP.

6.2 Nivells detectats

Els nivells trobats a les begudes estan indicats a la Taula 19. Dels 8 plastificants estudiats, només es van detectar NP, BPA i BP. La resta de compostos, malgrat tenir un mètode d'extracció eficient i amb bons límits de detecció no es van detectar degut que el CP, TAP, HP, OP i DP segurament no s'utilitzen com a additius dels plàstics utilitzats per la fabricació d'envasos de begudes. En canvi, el BPA s'utilitza en els recobriments de resines epoxi a les llaunes, i el NP i la BPA poden ser additius del PET. Cal tenir en compte que teòricament, l'envàs hauria de ser del tot inert i que no produís la migració de cap dels seus components, i que per tant, caldria esperar que no hi haguessin traces de plastificants ni BPA en les begudes refrescants. Malgrat tot, es van detectar el NP, BPA i BP de forma recurrent a concentracions que variaven segons el tipus d'envàs, tipus de beguda i marca comercial. En aquest estudi no es pot discernir si la contaminació prové de l'aigua de partida o de la migració de l'envàs, però degut que els nivells detectats són molt superiors als de les aigües potables de Barcelona (Capítol 4), és molt probable que la contaminació s'origini per migració des de l'envàs.

De totes les mostres analitzades (n=50), el NP es va detectar en un 50% de les mostres. En segon lloc, el BPA es va detectar en un 22%, i finalment, la BP, en un 20%. Les concentracions detectades oscil·laven entre 10 i 2301 ng L⁻¹ pel NP, 58 i 7158 ng L⁻¹ pel BPA i entre 116 i 1891 ng L⁻¹ per la BP. Aquests nivells de concentració són similars als detectats en aigua de riu i majors que els trobats en aigües de potabilitzadora, on el BPA i la BP es van eliminar completament durant el tractament. Per aquesta raó, la migració es considera fonamental per explicar els nivells tan elevats dels plastificants en begudes refrescants.

Taula 19. Concentració de NP, BPA i BP en ng L⁻¹ en les begudes refrescants analitzades. (nd, no detectat. slq, per sota del límit de quantificació).

Beguda	NP	BPA	BP
Beguda energètica 1 (llauna)	672	1316	nd
Beguda energètica 2 (llauna)	slq	slq	192
Beguda energètica 3 (llauna)	slq	slq	165
Beguda energètica 4 (llauna)	nd	slq	644
Beguda amb te 1 (llauna)	335	nd	nd
Beguda amb te 1 (PET)	1908	nd	nd
Beguda amb te sense sucre 2 (llauna)	1471	nd	nd
Beguda amb te sense sucre 2 (PET)	714	nd	nd
Beguda isotònica 1 (llauna)	nd	2175	nd
Beguda isotònica 1 (PET)	nd	slq	nd
Beguda isotònica 2 (PET)	nd	slq	1072
Beguda isotònica amb gust taronja 1 (llauna)	slq	1668	nd
Beguda isotònica amb gust taronja 1 (PET)	nd	slq	nd
Beguda isotònica amb gust a taronja 2 (llauna)	slq	522	nd
Beguda isotònica amb gust a taronja 3 (PET)	nd	nd	nd
Beguda isotònica amb gust cítric 1 (llauna)	102	nd	1653
Beguda isotònica amb gust cítric 2 (PET)	118	slq	nd
Beguda isotònica amb gust a gerds 1(PET)	slq	nd	nd
Beguda amb suc de taronja 1 (llauna)	nd	slq	nd
Beguda amb suc de taronja 1(PET)	nd	slq	nd
Beguda amb suc de llimona 1 (llauna)	nd	slq	nd
Beguda amb suc de llimona 1 (PET)	nd	slq	nd
Beguda amb suc de taronja 2 (llauna)	slq	1493	nd
Beguda amb suc de llimona 2 (llauna)	nd	7158	nd
Tònica Gingerale (PET)	52	slq	nd
Tònica 1 (PET)	345	nd	499
Tònica 1 (llauna)	258	nd	1896
Tònica 2 (llauna)	slq	slq	nd
Tònica 3 (llauna)	94	306	240
Tònica light 1 (llauna)	203	757	nd

Beguda	NP	BPA	BP
Tònica amb gust de llimona 1 (llauna)	slq	nd	nd
Soda 1 (PET)	10	nd	nd
Soda 2 (llauna)	183	nd	nd
Soda amarga 1 (llauna)	slq	slq	1266
Soda amarga 2 (llauna)	nd	slq	116
Soda amb gust de llima 1(launa)	nd	nd	nd
Cola 1 (PET)	2301	slq	nd
Cola 1 (llauna)	258	58	nd
Cola 2 (PET)	177	nd	nd
Cola 2 (llauna)	85	nd	nd
Cola light 1 (PET)	208	nd	nd
Cola light 1 (llauna)	213	nd	nd
Cola light 2 (llauna)	slq	slq	nd
Cola sense sucre ni cafeïna 1 (PET)	slq	slq	nd
Cola sense sucre ni cafeïna 1 (llauna)	21	nd	nd
Cola sense sucre 1 (PET)	730	slq	nd
Cola sense sucre 1 (llauna)	368	153	nd
Cola light sense cafeïna 1 (PET)	78	278	nd
Cola light sense cafeïna 1 (llauna)	272	slq	nd
Cola sense cafeïna 1 (llauna)	slq	nd	nd

El BPA es va identificar en 11 mostres de les 50 analitzades, específicament en 10 llaunes i només 1 beguda envasada en PET. Pel que fa a les diverses categories de begudes, el BPA no va ser detectat en cap mostra de te ni soda, i els valors més elevats es van trobar en coles i begudes amb suc de fruita. El valor més elevat de BPA trobat va ser la beguda de suc de llimona (llauna) 1, amb una concentració de 7158 ng L⁻¹. En begudes de la mateixa marca es va detectar en les begudes isotòniques 1 i la de gust de taronja 1, en ambdós casos en el format llauna i no en el de plàstic. La presència de BPA en llaunes s'ha observat en estudis previs on es van fer comparatives entre els dos tipus de materials, ja siguin la mateixa beguda en dos formats (Yang et al., 2014b) o mostres de sodes sense especificar marques (Sakhi et al., 2014). En ambdós estudis s'observa la mateixa tendència on el BPA es va detectar en més del 50% de mostres analitzades, major que el

22% del present estudi. Això indica una clara tendència que la font principal de BPA en llaunes prové de les resines epoxi que recobreixen la capa interior de les llaunes. En el cas del PET, la presència de BPA podria ser causada en part per la qualitat de l'aigua emprada o durant el procés d'envasat, i no deguda a la migració, ja que aquest monòmer no s'empra en la fabricació de PET.

El NP es va detectar en tots els tipus de mostres, menys les de suc natural, és a dir, en 11 mostres envasades en PET i 14 en llauna. Es van detectar valors especialment elevats en coles i begudes amb te. Respecte la variació entre tipus d'envàs, com ja es va observar a la bibliografia (Sakhi et al., 2014; Yang et al., 2014b), és difícil trobar una relació entre les concentracions detectades de NP i el material. L'exemple més clar es troba en les begudes amb te. Mentre que la beguda 1 té una concentració de més de 5 cops major de NP en l'envàs de PET que en l'envàs de llauna, en la beguda 2 (de la mateixa marca però sense sucre), això s'inverteix. Pel que fa a la resta, l'envàs de llauna té una concentració de NP el doble que la de plàstic PET, en general. Per altra banda, les mostres que es disposaven només en un format, aquest plastificant es va detectar en 4 ampolles de PET i en 5 llaunes. La seva presència es podria atribuir en part a la migració en el cas del PET, però en el cas de les llaunes, la qualitat de l'aigua utilitzada per la fabricació de la beguda podria ser la raó principal. Tanmateix, es desconeix si els materials o canonades utilitzats durant l'envasat poden contribuir en la migració de NP cap al producte envasat.

La BP no es va detectar ni en te, ni coles ni begudes amb suc de fruita, i els valors més elevats es van detectar en sodes, tòniques i en begudes isotòniques. En el cas de la tònica 1, la llauna va tenir una concentració 4 vegades major que la de PET. Per la resta de mostres, en les quals la marca només es disposava en un tipus d'envàs, es van trobar 10 mostres positives en llauna i només 1 positiva en PET. La presència d'aquest compost es pot atribuir a la utilització d'aquest com a plastificant per tal d'evitar que el contingut es vegi afectat per la radiació solar.

S'ha observat que el tipus d'envàs pot produir la migració de NP, BPA i BP en una beguda refrescant. El BPA i la BP tenen una lleugera tendència a trobar-se en llaunes mentre que el NP es troba preferiblement en PET. En el cas del BPA, això s'atribueix a les resines epoxi. Les llaunes, per evitar el contacte directe de l'alumini amb l'aliment, tenen una capa d'aquest material i això podria explicar la migració de BPA cap a l'aliment o beguda (Niu et al., 2015). Pel que fa a la BP, utilitzada per protegir el contingut de la radiació UV, fa més difícil la seva explicació, degut que en ambdós tipus d'envasos interessa aquest tipus de protecció. Pel que fa al NP, com s'utilitza per les seves propietats antioxidants en aplicacions molt variades, podria trobar-se a nivells variables depenent més del fabricant del tipus de plàstic o resina. No s'ha de descartar que la seva presència podria ser deguda a la qualitat de l'aigua emprada.

La comparativa amb altres estudis bibliogràfics és complicada ja que no es diferencien els materials, sinó només la matriu (Geens et al., 2010; Li et al., 2014a). En mostres de soda procedents de la Xina (Niu et al., 2015; Wu et al., 2015; Yang et al., 2014b), es van trobar diferències molt grans entre els valors de plastificants, depenent de la regió, que podrien estar directament relacionades amb la contaminació durant la producció dels materials destinats a l'envasat. Si la qualitat de l'envàs és baixa i el plàstic no s'ha polimeritzat de forma correcta, la migració pot ser més elevada. Niu et al. senyalen també que la qualitat de l'aigua utilitzada per produir les begudes pot afectar de forma directa la qualitat del producte final, ja que algunes begudes es fabriquen dissolent els ingredients que subministra una fàbrica en aigua del país on es vol comercialitzar, per tal d'evitar els costos de transport de la beguda en format líquid.

Cao et al. (Cao et al., 2009) van detectar BPA en més del 85% de les 72 mostres a nivells màxims de 4500 ng L^{-1} , mentre que al 15% no es va detectar. Atribueixen la detecció del BPA a una millora dels límits de detecció del mètode respecte a estudis previs (Braunrath et al., 2005). Només no van detectar BPA en tres

mostres, que corresponen a dues begudes de tònica i una beguda energètica, on els problemes van ser la recuperació del patró intern BPA-d16. Aquesta falta de recuperació l'atribueixen a la quinina, un dels ingredients principals d'aquest tipus de beguda i que dóna la seva amargor característica, la qual podria interferir amb l'anàlisi del compost. El nivell més baix de BPA, de 32 ng L^{-1} es va detectar en una soda light, de la mateixa forma que el BPA en el present estudi es va detectar en 2 de les 5 mostres de les sodes analitzades però per sota del límit de quantificació. Per altra banda, els valors més elevats, de 4200 i 4500 ng L^{-1} detectats per Cao et al. es van detectar en begudes energètiques, i Braunrath et al. van detectar el BPA a 3400 ng L^{-1} en el mateix tipus de beguda del mercat tailandès (Braunrath et al., 2005). A diferència seva, en aquesta tesi només es va detectar BPA en 1 de les 4 begudes energètiques analitzades, a una concentració de 1316 ng L^{-1} . Respecte la migració, Braunrath et al. destaquen que és negligible, degut que totes les mostres es van analitzar 14 mesos després de comprar-les i tenir-les emmagatzemades i així i tot, el 85% dels 72 refrescs analitzats van tenir nivells de BPA per sota de 1000 ng L^{-1} . Segons aquest estudi, la migració del BPA tindria lloc durant el procés de recobriment amb la resina epoxi, amb una esterilització a 121°C durant 90 minuts. Després d'aquest procés, els nivells de BPA no haurien de variar durant un període d'emmagatzematge llarg. Per tal de confirmar que el BPA migra sobretot durant el procés d'esterilització, Cao et al. van analitzar mostres 3 anys després de comprar-les i no es va observar cap tendència cap a una major concentració de BPA. En tots els casos, aquestes mostres es van adquirir amb diferents números de lot, el que podria tenir conseqüències en diferents tipus de recobriment i condicions d'envasat. S'ha de considerar que cada companyia productora de refrescs utilitza diferents tipus i quantitat de recobriment així com diferents temperatures i temps en les condicions d'esterilització, i això pot fer variar els nivells de migració. Per altra banda, el tipus de polímers utilitzats en la fabricació dels envasos també poden

tenir un paper important a l'hora de garantir l'absència de contaminants en el producte final.

Per altra banda, Geens et al. van analitzar la concentració de BPA en 45 llaunes, 4 ampolles de PET i 1 en TetraPak (Geens et al., 2010). Les concentracions van tenir un màxim de 8100 ng L^{-1} , amb un valor promig de 1010 ng L^{-1} i el BPA es va detectar en 41 de les 45 llaunes, i un 75% d'aquestes va tenir concentracions per sota de 1000 ng L^{-1} . Geens et al. van estudiar la relació entre el pH de les mostres (que va variar entre 2,5 i 4,42) amb la concentració de BPA, però no es va trobar cap tipus de correlació. Això és degut que el pKa del BPA és major de 9, i com la majoria de begudes van tenir valors lleugerament àcids, la molècula hi estava present de forma neutra.

Cunha et al. (Cunha et al., 2011) van analitzar 22 mostres de beguda, i en 15 d'elles es va detectar BPA, amb una concentració mitjana de 710 ng L^{-1} i valors que van variar entre 30 i 4700 ng L^{-1} , similars als obtinguts per altres autors (Cao et al., 2009; Shao et al., 2005). Li et al., per la seva banda, van determinar BPA, OP i NP en begudes en llaunes (Li et al., 2013). El BPA es va detectar en 6 mostres amb una concentració màxima de 806 ng L^{-1} , el OP es va trobar només en una mostra a 250 ng L^{-1} , i el NP en dues mostres, a una concentració de 220 ng L^{-1} . Les concentracions van ser més baixes que les d'altres aliments, com la llet o la carn. Un altre exemple (Sakhi et al., 2014), atribueix els alts nivells de BPA a la migració continuada de les resines epoxi, sense considerar el procés d'esterilització. Igualment, analitzant diversos tipus d'envàs, les llaunes contenien fins a 8 vegades més concentració de BPA comparat amb altres materials com el plàstic, el vidre o el cartró. Així i tot, les concentracions de les begudes envasades en llauna comprades a Noruega van estar per sota de les observades en altres països europeus, i això s'atribueix a la forta pressió mediàtica respecte els efectes adversos en la salut humana del BPA, que alhora els productors tenen en elevada

consideració, evitant aquest compost en qualsevol aplicació que impliqui un contacte alimentari.

Com s'ha pogut comprovar, els envasos de les begudes refrescants poden ser una font important de plastificants en begudes degut a processos de migració, la qual s'afavoreix durant la fabricació, envasat i durant l'etapa d'esterilització del producte. Els tipus de beguda no tenen cap contribució especial en afavorir una major presència d'aquests contaminants, independentment del seu pH. Per aquesta raó, s'ha de tenir en consideració que una bona qualitat del plàstic o les resines epoxi, així com la seva manufactura, pot ser crucial en els nivells determinats d'aquests compostos.

6.3 Toxicitat

La toxicitat que es pot esperar dels plastificants presents en les begudes es va estudiar de dues formes diferents. Una manera de determinar el potencial tòxic dels plastificants es avaluar la seva ingesta diària, i comparar-la amb els TDI legislats per la Unió Europea (Guart et al., 2011). Per altra banda, l'estudi de la toxicitat dels diferents plastificants es pot avaluar utilitzant cultius cel·lulars que permeten determinar els efectes.

TDI

La ingesta diària de BPA, NP i BP es va calcular a partir de les concentracions màximes detectades (Taula 20) en l'anàlisi de les 50 mostres de begudes del mercat espanyol. Com aquests valors normalment es calculen sobre aigua, en aquest cas es va adaptar el volum de beguda, suposant una llauna diària per persona, 330 mL. Segons el pes d'una persona de 60 kg i les concentracions màximes detectades, les ingestes diàries es van situar entre 0,00001 i 0,00004

mil·ligrams per kg de pes corporal i dia. Aquests nivells es troben molt per sota dels TDI definits a la legislació (Guart et al., 2011). En el cas de la BP, que no té un valor assignat, la ingesta diària és la més baixa dels tres plastificants.

Per mostrar les dades d'una forma diferent, s'ha calculat el volum necessari que una persona de pes mitjà hauria de consumir durant un dia per arribar als nivells legislats de TDI. Pel BPA, això suposaria beure més de 400 litres, una dada sense sentit. Per altra banda, el NP, encara que s'ha detectat a una concentració més baixa, té una legislació més estricta. El volum necessari en aquest cas seria d'uns 130 litres. Ara bé, si els nivells legislats es revisessin i es canviessin els TDI per un ordre de magnitud més baix, en el cas del NP, el volum d'ingesta seria al voltant de 10 L per arribar al TDI, i ja caldria ser tingut en compte més seriosament. Per concloure, es pot extreure que els valors obtinguts disten molt de suposar un problema per la salut humana, sempre que ens atenguem a la legislació actual. I per aquesta raó, cal una revisió constant dels TDI, així com dels estudis toxicològics on s'estableixen els seus valors.

Taula 20. Valors de concentració més elevada, ingesta, TDI i volum de beguda refrescant ingerida per arribar al TDI dels plastificants trobats.

Compost	Concentració més elevada (ng L ⁻¹)	Ingesta diària (mg kg ⁻¹ bd dia ⁻¹)	TDI (mg kg ⁻¹ bd dia ⁻¹)	Volum necessari per arribar al TDI (L dia ⁻¹)
BPA	7158	3,94E-05	0,05	419,1
NP	2301	1,27E-05	0,005	130,4
BP	1896	1,04E-05	-	-

Si es comparen els valors d'ingesta obtinguts amb els de la bibliografia, indicats a la Taula 21, es troben moltes similituds. Així, l'estudi fet a Xina per Niu et al. (Niu et al., 2015), on es troba un dels nivells més elevats de BPA, a 267000 ng L⁻¹, amb

només 11 L de refresc s'arribaria a superar els valors legiscats a Europa. S'ha de dir que aquest valor és molt proper a la quantitat que algú podria beure en un dia, propera a 1 L.

Taula 21. Valors de concentració més elevada, ingesta i volum per arribar al TDI dels plastificants en exemples bibliogràfics.

Compost	Concentració més elevada (ng L ⁻¹)	Ingesta diària (mg kg ⁻¹ bd dia ⁻¹)	Volum necessari per arribar al TDI (L dia ⁻¹)	Referència
BPA	3400	1,87E-05	882,4	(Braunrath et al., 2005)
BPA	0	0	-	(Shao et al., 2005)
NP	464	2,55E-06	646,6	
BPA	2300	1,27E-05	1304,3	(Ballesteros-Gómez et al., 2009)
BPA	4500	2,48E-05	666,7	(Cao et al., 2009)
BPA	8100	4,46E-05	370,4	(Geens et al., 2010)
BPA	4700	2,59E-05	638,3	(Cunha et al., 2011)
BPA	607	3,34E-06	4942,3	(Gallart-Ayala et al., 2011a)
BPA	100	5,50E-07	30000,0	(Cacho et al., 2012)
BP	0	0,00E+00	-	
BPA	2810	1,55E-05	1067,6	(Feshin et al., 2012)
BPA	870	4,79E-06	3448,3	(Khedr, 2013)
BPA	860	4,73E-06	3488,4	(Li et al., 2013)
NP	220	1,21E-06	1363,6	
BPA	18240	1,00E-04	164,5	(Deng et al., 2014)
BPA	245	1,35E-06	12244,9	(Li et al., 2014a)
BPA	46400	2,55E-04	64,7	(Liao and Kannan, 2014)
BPA	370	2,04E-06	8108,1	(Sakhi et al., 2014)
BPA	9700	5,34E-05	309,3	(Yang et al., 2014b)
BPA	267000	1,47E-03	11,2	(Niu et al., 2015)
NP	800	4,40E-06	375,0	

Per altra banda, també es troben casos on degut a la baixa concentració de BPA detectada, la quantitat a ingerir en un dia per superar el TDI seria de més de 5000 L (Cacho et al., 2012; Li et al., 2014a; Sakhi et al., 2014), en aquest cas una xifra impossible, i on només el contingut en sucres seria més perjudicial que els propis plastificants. El NP, en canvi, s'ha trobat a concentracions menors que en el present treball, i per tant el volum per superar al TDI és major, amb un mínim de 375 L (Niu et al., 2015). La BP, que no té TDI legislat, només s'ha estudiat en un cas de la bibliografia (Cacho et al., 2012), però no es va detectar malgrat tenir un MDL de 0,9 ng L⁻¹. Ara bé, del valor màxim detectat en aquesta tesi, la ingesta diària va ser similar a la del NP.

Tal com es desprèn dels valors d'ingesta diària indicats a la Taula 21 i dels valors presents a la bibliografia, en general, el BPA, NP i BP no presenten un risc evident per la salut humana. Les concentracions detectades al llarg de les diverses begudes i en diferents indrets estan a nivells inferiors als necessaris perquè el nivell de TDI es superi, fins i tot en casos extrems on el consum sigui molt elevat.

Ara bé, aquests nivells s'han de tenir controlats en tot moment, ja que aquests compostos han sofert diferents canvis de legislació en els darrers anys gràcies als nous estudis toxicològics.

Citotoxicitat

La toxicitat dels plastificants es va estudiar en cèl·lules humanes per tal de veure com els diferents plastificants i el BPA afectaven la viabilitat i metabolisme cel·lular. En l'apartat anterior s'ha vist com les begudes refrescants contenen plastificants, i aquests són ingerits en major o menor mesura a nivells molt inferiors al TDI. Malgrat tot, per tenir una evidència clara dels efectes que podrien ocasionar, és important estudiar els seus efectes potencials en diversos models

toxicològics. En aquesta tesi s'han utilitzat els cultius cel·lulars per avaluar la toxicitat dels plastificants i del BPA. Aquest model permet determinar els efectes a nivell de ruptura de membrana cel·lular i de metabolisme.

El cultiu cel·lular de les cèl·lules JEG-3, derivades del carcinoma de placenta humana, es va produir en un medi essencial, al qual es van addicionar certs suplementes com un 5% de serum de fetus boví, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvat de sodi, 0,1 μM d'aminoàcids no essencials, 1,5 g L^{-1} de bicarbonat de sodi i 50 U mL^{-1} de penicil·lina G i 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ d'estreptomicina, en un incubador humidificat amb 5% de CO_2 a 37°C. Les cèl·lules van ser cultivades de forma rutinària en flascons de poliestirè de 75 cm^2 . Un cop la població arribava a un 90% de confluència, les cèl·lules eren dissociades amb un 0,25% (pes/volum) de tripsina i 0,9 mM d'EDTA per fer subcultius i experiments. Aquesta metodologia ha estat descrita per Gorrochategui et al. (Gorrochategui et al., 2014).

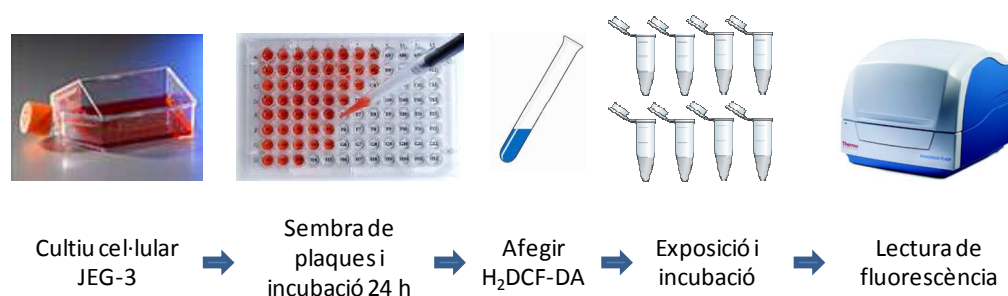


Figura 27. Procediment de treball per la viabilitat de les cèl·lules JEG-3.

La viabilitat cel·lular es va estudiar mitjançant dos tints diferents. L'activitat metabòlica es va monitoritzar amb Alamar Blue (AB) mentre que la integritat de membrana es va estudiar amb diacetat de 5-carboxifluoresceïna (CFDA-AM), com s'observa a la Figura 27. Les cèl·lules es van sembrar en 25000 per cada pouet, en

plaques de 96 pouets, i es van deixar incubar 8 hores a 37°C i a una atmosfera del 5% de diòxid de carboni. Després de 24 hores d'exposició als plastificants, el medi es va substituir per una solució dels dos tints a un volum de 100 µL. Després d'una hora d'incubació, la viabilitat cel·lular es va mesurar emprant un lector de fluorescència a les longituds d'ona de 530 i 590 nm per l'Alamar Blue, i de 485 i 530 nm pel CFDA. D'aquesta forma, es van analitzar els efectes dels plastificants per triplicat a diferents nivells de concentracions. Els assajos de citotoxicitat es van fer sobre BPA, BBP, DBP, DEHP, DMP, NP, OP, DP, HP, CP, DTBP, 4SBP, 4TBP, 2SBP, 2TBP, TAP i TTBP.

La quantitat real de contaminant que realment va entrar a la cèl·lula (intake) també va ser calculada per determinar la fracció realment biodisponible i responsable dels efectes ocasionats a nivell de disrupció cel·lular. En aquest cas, i amb les mateixes condicions d'incubació anteriors, les cèl·lules es van exposar per triplicat als diversos plastificants de forma individual a nivells entre 5 i 500 µM. Just després de l'exposició (temps 0), i a temps de 1, 3, 4, 8 i 24 hores d'incubació, es va aspirar el medi, i les cèl·lules es van reconstituir amb PBS, tintades amb tripsina, i es van centrifugar durant 10 minuts a 3600 rpm. El sobrenedant es va decantar i les cèl·lules es van guardar a -80°C fins a l'anàlisi, de forma que es van tenir com a mostres les cèl·lules en si i el medi on es van cultivar.

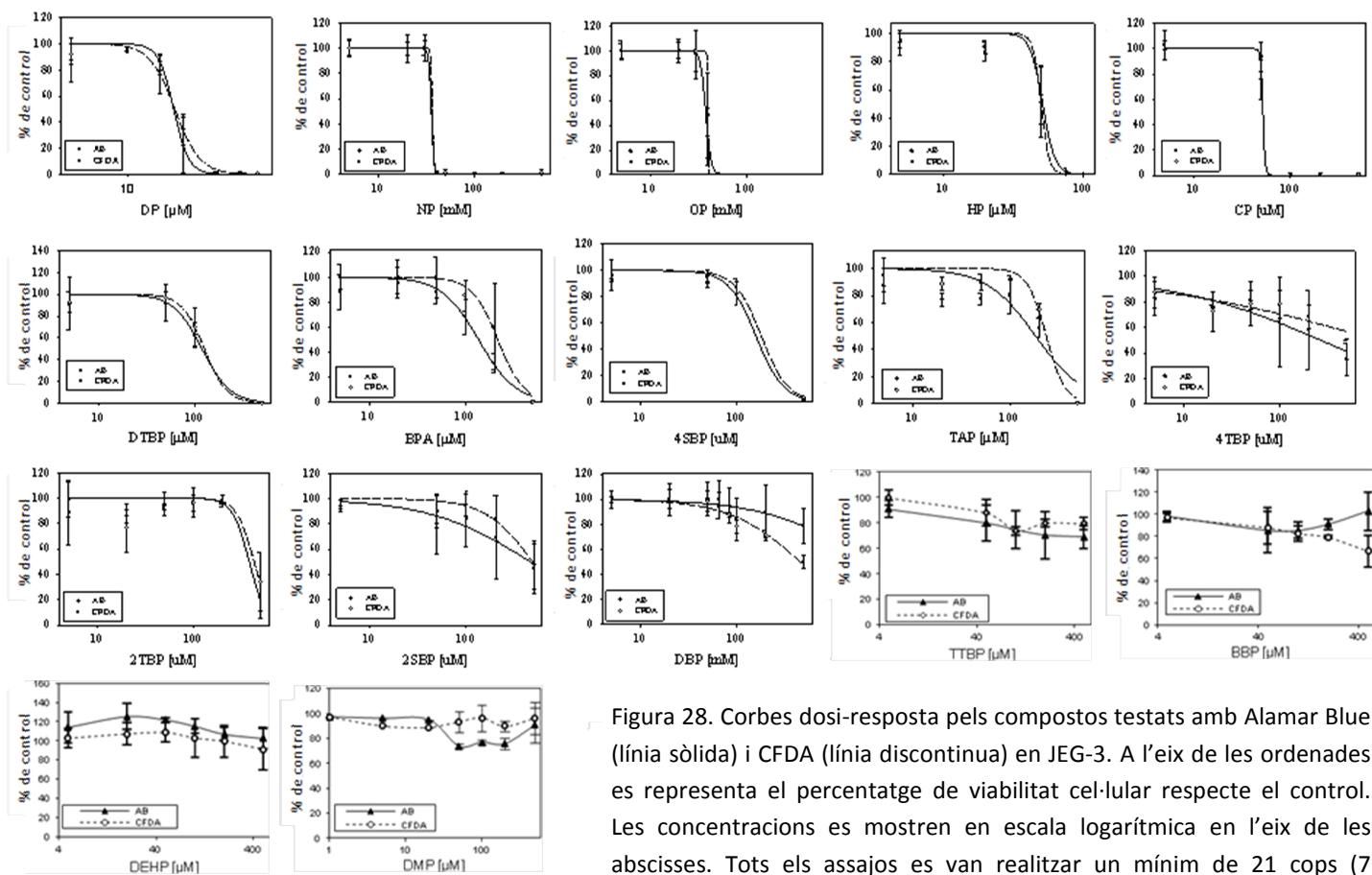


Figura 28. Corbes dosi-resposta pels compostos testats amb Alamar Blue (línia sòlida) i CFDA (línia discontinua) en JEG-3. A l'eix de les ordenades es representa el percentatge de viabilitat cel·lular respecte el control. Les concentracions es mostren en escala logarítmica en l'eix de les abscisses. Tots els assajos es van realitzar un mínim de 21 cops (7

Per les cèl·lules, els plastificants van ser extrets afegint 100 ng dels patrons interns corresponents (BPA-*d*16, NP-*d*8 i DPP-*d*4) als pellets cel·lulars i es va afegir 1 mL de metanol. Tot seguit, les mostres es van homogeneïtzar i extreure en un bany d'ultrasons durant 10 minuts per triplicat. El sobrenedant es va evaporar a sequedat i es va reconstituir amb 125 µL d'aigua i 125 µL de metanol. Pel medi, es va seguir un procediment similar, encara que el dissolvent d'extracció no havia de ser miscible amb aigua, i es va seleccionar l'acetat d'etil. Així, es van afegir 500 µL d'aquest dissolvent a 100 µL de medi. Les mostres es van homogeneïtzar i extreure també en un bany d'ultrasons per triplicat. Es va decantar l'aigua, agafant només el dissolvent orgànic, i per acabar, es va evaporar i reconstituir de la mateixa forma que les cèl·lules. En ambdós matrius, es van realitzar estudis de recuperació per tal d'assegurar que els plastificants s'extreien correctament. Les recuperacions van ser entre el 87 i el 105%, amb desviacions estàndard per sota del 10%. Aquests càlculs només es van realitzar sobre els APs, ja que els ftalats i el BPA no es van poder analitzar per problemes de baixa reproductibilitat.

Les corbes dosi-resposta i les LC_{50} es mostren a la Figura 28 i la Taula 22, respectivament. Es pot comprovar com entre tots els compostos estudiats, el DP, NP, OP, HP i CP van produir major toxicitat en la línia JEG-3 (valors d' EC_{50} entre 18 i 52 µM) d'una forma gradual dependent de la longitud de les cadenes de carboni, sent més tòxic el de cadena més llarga. Després segueixen el DTBP, el BPA, 4SBP, TAP i 4TBP (119-267 µM), i per acabar, 2TBP, DBP i 2SBP (385-483 µM). Per altres compostos, com el TTBP, BBP, DEHP i DMP no es va detectar cap toxicitat a la concentració més elevada assajada, de 500 µM. Per representar els valors es va emprar el software Sigmaplot.

De la mateixa forma que amb la toxicitat per *Daphnia magna*, es va representar la relació dels logaritmes de la toxicitat i el $\log K_{ow}$ per les cèl·lules JEG-3, tal com es pot observar a la Figura 29.

Taula 22. Concentració \pm error estàndard ($p < 0,05$) pels plastificants testats en cèl·lules JEG-3, a la qual s'ha detectat LC_{50} en els assajos amb AB i CFDA. La resta de compostos (BBP, DEHP, DMP i TTBP) no han superat el 50% de toxicitat a la concentració més elevada assajada i no es mostren a la Taula. ("-", no tòxic).

Compost	ALAMAR BLUE		CFDA	
	μM	$mg L^{-1}$	μM	$mg L^{-1}$
DP	$17,7 \pm 0,5$	$4,64 \pm 0,1$	$18,0 \pm 0,4$	$4,72 \pm 0,1$
NP	$35,5 \pm 0,5$	$7,82 \pm 0,1$	$36,3 \pm 3,6$	$8,00 \pm 0,8$
OP	$38,0 \pm 0,1$	$7,84 \pm 0,02$	$40,0 \pm 0,01$	$8,25 \pm 0,2$
HP	$50,2 \pm 1,2$	$9,65 \pm 0,2$	$51,3 \pm 1,9$	$9,86 \pm 0,4$
CP	$51,6 \pm 0,4$	$11,0 \pm 0,08$	-	-
DTBP	$118,8 \pm 15,5$	$24,5 \pm 3,2$	$125,6 \pm 20,4$	$25,9 \pm 4,2$
BPA	$138,1 \pm 12,9$	$31,5 \pm 2,9$	$218 \pm 13,6$	$49,8 \pm 3,1$
4SBP	$160,6 \pm 38,8$	$24,1 \pm 5,8$	$182,8 \pm 21,9$	$27,5 \pm 3,3$
TAP	$184,5 \pm 52,1$	$30,3 \pm 8,6$	$237,6 \pm 30,2$	$39,0 \pm 5,0$
4TBP	$266,6 \pm 87,9$	$40,0 \pm 13,2$	-	-
2TBP	$433,2 \pm 90,2$	$65,1 \pm 9,8$	$385,1 \pm 52,2$	$57,8 \pm 7,8$
2SBP	$457,8 \pm 121,9$	$68,8 \pm 18,3$	$482,6 \pm 63,7$	$72,5 \pm 9,6$
DBP	-	-	$466,3 \pm 63,1$	$129,8 \pm 17,6$

Els alquilfenols, tal com en el cas de la *D. magna*, presenten una correlació entre la seva toxicitat per les cèl·lules i el seu valor de K_{ow} . Aquesta relació és clarament visible pels alquilfenols amb cadenes de 5 o més carbonis, però no resulta tan clara pel cas dels butilfenols. Els substituïts en la posició *para* del grup fenol van presentar una major toxicitat, degut a una possible major biodisponibilitat que no van presentar els substituïts en posició *orto*. La toxicitat és comparable als valors obtinguts en estudis realitzats per l'EPA, tal com es feia referència en el capítol 1, però no existeix una bibliografia prou extensa sobre valors de LC_{50} d'aquests compostos en *Daphnia magna*.

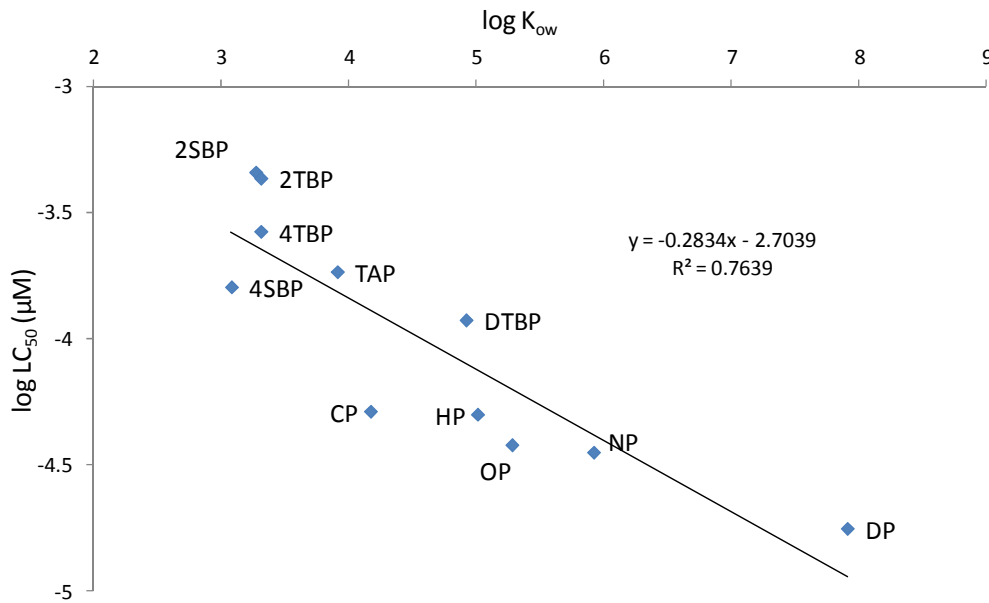


Figura 29. Relació entre la toxicitat i el logK_{ow} dels alquilfenols per les cèl·lules JEG-3.

Els alquilfenols presenten una correlació entre la seva toxicitat per les cèl·lules i el seu valor de K_{ow}. Aquesta relació és clarament visible pels alquilfenols amb cadenes de 5 o més carbonis, però no resulta tan clara pel cas dels butilfenols. Els substituïts en la posició *para* del grup fenol van presentar una major toxicitat, degut a una major biodisponibilitat que no van presentar els de posició *orto*.

L'estudi de la quantitat real que entra a les cèl·lules (o "intake") permet determinar la fracció biodisponible i establir les concentracions reals que produeixen els efectes. Per tant, la toxicitat real és major o menor segons la fracció de compost que ha penetrat a dins la cèl·lula. Aplicat a concentracions ambientals, les concentracions que es troben dels plastificants en begudes, poden afectar molt més a les cèl·lules si el compost està més biodisponible. Els resultats dels intakes estan indicats a la Taula 23. Tal com s'observa, la major part dels alquilfenols es troben dissolts al medi, i en molt baixa proporció entren dintre les cèl·lules.

Taula 23. Mitjana i desviació estàndard de cada alquilfenol trobat al medi i a les cèl·lules (“-”, no detectat).

Compost	% Medi	% Cèl·lules
2SBP	-	-
2TBP	66,9 ± 6,5	44,6 ± 5,9
4SBP	115,6 ± 10	2,1 ± 2,0
4TBP	67,4 ± 6,8	22,3 ± 1,9
DTBP	-	-
TTBP	-	-
CP	116,7 ± 5,1	-
TAP	67,5 ± 4,3	-
HP	111,8 ± 11,9	15,5 ± 3,8
OP	95,7 ± 5,7	-
NP	106,3 ± 3,6	4,4 ± 2,1
DP	12,4 ± 0,8	11,8 ± 4,8

En el casos particulars, el 2SBP no es va trobar en cap de les dues matrius, però si els altre 3 butilfenols, i sempre a una major concentració en el medi que en les pròpies cèl·lules. Els alquilfenols doble i triplement ramificats tampoc es van detectar ni en el medi ni en les cèl·lules. El CP, TAP i OP no es van detectar a les cèl·lules. Mentre que el CP i l’OP es van detectar al medi a valors del 100%, el TAP s’hi va detectar en menor proporció, la qual cosa pot indicar que s’hagi degradat durant el procés d’incubació. Finalment, el HP i el NP es van detectar tant en medi com en cèl·lules, amb un percentatge més elevat en el primer, mentre que el DP es va trobar a parts iguals en ambdues fraccions, malgrat que també es va observar certa degradació. En general, s’observa que la presència de plastificants en cèl·lules és molt baixa, i que per tant, només una petita fracció serà

responsable dels efectes observats. Això indica la importància de determinar la fracció biodisponible per reflectir la toxicitat real d'un compost.

Les LC_{50} determinades per NP i BPA en les cèl·lules JEG-3 s'han comparat amb els nivells detectats a les begudes. En el cas del NP, tant per Alamar Blue com CFDA es va determinar una LC_{50} similar al voltant de 8 mg L^{-1} . Aquest valor està molt per sobre de la concentració màxima detectada en una beguda, de $2,3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. El BPA va ser menys tòxic que el NP, però sí es va diferenciar més entre els dos tipus de toxicitat, i va ser major per l'Alamar Blue, amb una LC_{50} de 31 mg L^{-1} , nivell molt més elevat que el màxim trobat en una beguda, de $7,1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

Els resultats obtinguts dels diferents estudis de citotoxicitat han permès entendre millor el comportament dels plastificants i els possibles efectes que poden ocasionar utilitzant cèl·lules humanes, com a primera aproximació per avaluar els efectes sobre la salut. A partir de les LC_{50} s'ha observat que els compostos més tòxics són els alquilfenols de cadena llarga, i la toxicitat disminueix segons decreix la longitud d'aquesta cadena (seguint una relació lineal amb el $\log K_{ow}$ dels compostos). Pels ftalats, a diferència dels estudis realitzats en *D. magna*, la toxicitat per les cèl·lules ha estat pràcticament inexistent. Destacar el cas del DEHP, un dels ftalats més tòxics en els invertebrats, però no en cèl·lules humanes. Comparant aquests resultats amb els valors detectats en begudes de NP, BPA i BP, els dos primers són els que s'han de tenir més en consideració, ja que malgrat la BP s'ha detectat en algunes mostres, els nivells són molt baixos, no està legislada i no presenta una toxicitat gaire aguda. NP i BPA en canvi, s'han mostrat com plastificants presents de forma habitual en begudes refrescants, i malgrat que les concentracions no presenten un problema segons el TDI, cal sempre una revisió constant dels productes que es consumeixen així com una actualització dels estudis toxicològics per tal d'adequar una legislació que protegeixi la ingesta de plastificants i per tant, la salut humana.

7. Conclusions

Els estudis portats a terme en aquesta tesi han permès arribar a les següents conclusions:

1. S'ha desenvolupat un mètode basant en la LC-MS/MS per determinar la presència de 21 monòmers i additius del plàstic en mostres ambientals i en begudes refrescants. Aquest mètode ha demostrat tenir una bona resolució cromatogràfica i ha permès identificar nivells traça d'aquests compostos.
 - a. S'ha optimitzat el mode i les condicions d'ionització de manera que es pugui realitzar l'anàlisi simultani de tots els compostos objecte d'estudi. Els ftalats i la BP s'han analitzat en ESI positiu mentre que els APs i el BPA s'han analitzat en ESI en mode negatiu.
 - b. L'extracció en fase sòlida ha permès la determinació de tots els compostos en aigües de riu i de begudes, i s'han obtingut bons rendiments d'extracció. Degut a la presència dels ftalats en els blancs, s'han calculat els límits de detecció metodològics tenint en compte la seva contribució.
 - c. L'extracció en fase sòlida no ha estat adequada per l'anàlisi de begudes refrescants degut a l'elevada concentració en sucres i extractes de fruita. Per tant, s'ha desenvolupat un mètode d'extracció basat en l'extracció líquid-líquid, que ha permès recuperar de forma eficient els APs, la BP i el BPA. En canvi, els ftalats no han estat analitzats degut a l'elevada contribució en els blancs metodològics i a la poca reproductibilitat del mètode d'extracció per aquests compostos.

2. La conca del riu Besòs rep un impacte important de plastificants.
 - a. S'han identificat el DEHP, NP, DBP, BPA, OP i BP com els compostos més freqüentment detectats i a majors concentracions.
 - b. S'ha calculat la LC_{50} de cada un dels compostos de forma individual i s'ha trobat una bona relació entre la toxicitat i el $\log K_{ow}$, la qual cosa indica que els compostos més hidrofòbics tenen un efecte més elevat.
 - c. L'estudi de risc a partir de les LC_{50} calculades per la *D. magna* ha donat com a conseqüència un potencial significatiu per efectes adversos, atribuït bàsicament al NP i el DEHP.
 - d. S'han identificat les zones amb un impacte ambiental més elevat, que estan relacionades amb zones altament industrialitzades o urbanitzades.
 - e. S'han observat certes tendències temporals que s'atribueixen bàsicament a diferències estacionals amb el cabal del riu.

3. S'ha estudiat la presència de plastificants a les aigües de captació i aigües tractades de la potabilitzadora de Sant Joan Despí. En aigües de captació s'ha detectat el BPA, BP, DBP, DEHP, NP i OP a nivells de fins 3000 ng L⁻¹, i s'observen diferències segons el període mostrejat.
 - a. El BPA, la BP i l'OP són eliminats completament durant el tractament i no s'observen traces en aigües de distribució.
 - b. El NP, DBP i DEHP són eliminats en un 80% i es detecten en aigües de distribució a nivells traça.
 - c. S'ha estudiat la fotodegradació del BPA i mitjançant espectrofotometria i anàlisi per MCR-ALS s'han resolt 2 productes de degradació, mentre que s'han identificat 5 fotoproductes mitjançant LC-QTOF.

- d. S'han estudiat les cinètiques de degradació en aigua milli-Q, aigua amb àcids húmics i aigües de riu, i s'ha observat com la matèria orgànica afecta la reacció, augmentant el temps de vida mitjana del BPA.
 - e. S'ha determinat la toxicitat dels fotoproductes utilitzant *D. magna* i s'ha observat que la toxicitat augmenta degut a la degradació a compostos potencialment més tòxics.
4. S'ha desenvolupat un mètode per determinar la presència d'APs, BPA i BP en begudes i s'han detectat BPA, BP i NP. S'ha identificat la presència d'almenys un o més plastificants en totes les mostres analitzades.
- a. La presència de BPA està associada a les resines epoxi que s'utilitzen en la fabricació de les llaunes.
 - b. La presència de NP està més associada a les ampolles de PET, tot i que no es descarta que aquest producte provingui de l'aigua utilitzada per la fabricació de les begudes o al procés d'envasat.
 - c. Els nivells de plastificants detectats estan molt per sota dels valors de TDI i per tant, les concentracions detectades no van suposar cap risc per la salut, segons la legislació actual.
 - d. S'ha estudiat la viabilitat de les cèl·lules JEG-3 i s'han calculat les LC_{50} . S'ha determinat la fracció de compostos biodisponibles a partir de l'anàlisi de les cèl·lules exposades i del medi. La fracció biodisponible (que entra a la cèl·lula) és molt baixa, la qual cosa indica que la toxicitat observada depèn de la quantitat de compost capaç de penetrar a la cèl·lula.

8. Annex

Article científic

Transformation Products of Alkylphenols

M. Cortina-Puig, G. Bolívar-Subirats, C. Barata and S. Lacorte

Transformation Products of Emerging Contaminants in the Environment: Analysis, Processes, Occurrence, Effects and Risks, First Edition. Wiley & Sons, 2014

19

Transformation Products of Alkylphenols

Montserrat Cortina-Puig¹, Gabino Bolívar-Subirats²,
Carlos Barata² and Silvia Lacorte²

¹*Escola Universitària Salesiana de Sarrià, Spain*

²*Department of Environmental Chemistry, IDAEA-CSIC, Spain*

19.1 Alkylphenols: Types, Properties and Uses

Alkylphenols (APs) are starting materials for the production of many surfactants and antioxidant stabilizers used in commercial products like detergents, plastics and textiles. They are used in the synthesis of alkylphenol ethoxylates (APEs) and are also generated by the decomposition of these substances in the environment. APEs are one of the most widely used classes of nonionic surfactants in domestic and industrial products [1].

APs consist of one or more alkyl chains bound to a phenol. Their general structural formula is shown in Figure 19.1. The alkyl chain can be linear, as depicted in the figure, or branched, the most usual. The position of the hydroxy group on the aromatic ring may vary, although the predominant positional isomer is the para-isomer. APs are formed through the acid-catalyzed Friedel-Craft alkylation of a phenol with an olefin [2]. The olefins used vary from single species, such as isobutylene, to complicated mixtures, such as propylene tetramer (dodecene). The alkene reacts with phenol to produce monoalkylphenols, dialkylphenols and trialkylphenols.

APs range generally from C1 to C16 alkyl groups. Most common members of the APs category are 4-cumylphenol, 2-*sec*-butylphenol, 2-*tert*-butylphenol, 4-*tert*-butylphenol, 4-*sec*-butylphenol, 2,4-di-*tert*-butylphenol, 2,6-di-*tert*-butylphenol, 2,4-di-*tert*-pentylphenol, 4-*tert*-amylphenol, 4-hexylphenol, 4-heptylphenol, 4-*tert*-octylphenol, 4-octylphenol, 4-nonylphenol, 4-dodecylphenol and 2,3,6-trimethylphenol. Among them, the most

Transformation Products of Emerging Contaminants in the Environment: Analysis, Processes, Occurrence, Effects and Risks, First Edition. Edited by Dimitra A. Lambropoulou and Leo M. L. Nollet.
© 2014 John Wiley & Sons, Ltd. Published 2014 by John Wiley & Sons, Ltd.

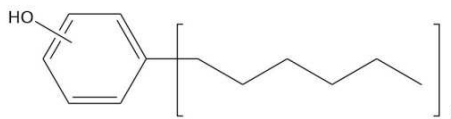


Figure 19.1 Chemical structure of APs (n denotes the number of C atoms in the alkyl chain).

representative are nonylphenols (NPs), with a C9-alkyl group and octylphenols (OPs), with a C8-alkyl group. The OPs are manufactured by the catalytic reaction of phenol and diisobutylene to produce predominantly 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol isomers. On the other hand, NP is produced by the reaction of phenol with branched nonene. Commercial synthesis results in a mixture of various branched NP isomers rather than a discrete chemical structure [3]. NP is the most commercially prevalent of the APs family, representing approximately 85% of the APs market.

Long-chain APEs are prone to metabolize in the natural environment, leading to the formation of APEs with short ethoxylate chain length (typically 1–3), APs and carboxylated APEs, which are more toxic and persistent than their precursor [4]. The environmental fate of these metabolites is of significant interest because of their potential endocrine disrupting effects [5]. For instance, NP ethoxylates are easily transformed, under anaerobic conditions, to their main metabolite, NP which is approximately 10 times more toxic than its ethoxylate precursor [6] and is known to disrupt normal hormonal functioning in the body [7,8]. Of all APE metabolites, OP is the strongest xenoestrogen and can induce significant effects in fish at concentrations of 3 ppb [9]. On the other hand, NP is active at concentrations of 8.3 ppb [10].

Since 1998, 4-NP and 4-OP are listed by OSPAR as chemicals for priority action [11] and both APs are present in the Water Framework Directive (Directive 2000/60/EC) of substances and substance groups prioritized for action to achieve good quality surface water [12,13]. The aim of these regulations is to ensure that emissions and losses of these substances to surface waters must be reduced to zero within the next two decades.

The fate of APs in different environmental media (surface waters, groundwater, air, sediments, soils and biota) is controlled predominantly by their physicochemical properties, which are summarized in Table 19.1 [14]. APs are generally solids, with the exception of the ortho-substituted APs and 4-dodecylphenol, which are liquids. APs have low to moderate water solubility, except for 2,3,6-trimethylphenol, which has a high water solubility. Vapor pressures range from low to moderate. They are expected to have low to moderate mobility in soil. Volatilization of APs from water and moist soils is considered low to moderate, based on their Henry's constants. APs are expected to have a range of persistence from moderate to high, with persistence increasing with increasing degree of branching, and bioaccumulation potential ranges from low to high, since some compounds can be metabolized and excreted as glucuronides.

APs are produced in high volumes and are basically used as intermediates for the chemical industry in the production of APEs, phenolic oximes (mineral ore extraction chemicals) and phenolic resins (plastics). In particular, 2-*sec*-butylphenol is used as a chemical intermediate in the synthesis of insecticides, herbicides and as a polymerization inhibitor. 2-*tert*-Butylphenol is used as a starting material for the synthesis of flavor and fragrance chemicals, anti-oxidants, insecticides, and phenolic resins. Para-substituted APs are used in fragrances,

Transformation Products of Alkylphenols 579

Table 19.1 Physicochemical properties of the main APs.

Substance	CAS	Chemical formula	Molecular weight	Water solubility at 25 °C (mg/L)	Log K_{ow}	Boiling point (°C)	Melting point (°C)	Henry's Constant (atm·m ³ ·mol ⁻¹)	Vapor pressure at 25 °C (mmHg)
4-cumylphenol	599-64-4	C ₁₂ H ₁₄ O	212.29	84	4.12	335	72	8.8 × 10 ⁻⁶	2.3 × 10 ⁻³
2-sec-butylphenol	89-72-5	C ₁₀ H ₁₄ O	150.22	1.7 × 10 ¹	3.27	224	14	1.5 × 10 ⁻⁶	5 × 10 ⁻²
2-tert-butylphenol	88-18-6	C ₁₀ H ₁₄ O	150.22	7 × 10 ²	3.31	223	-7	1.5 × 10 ⁻⁶	9.0 × 10 ⁻²
4-tert-butylphenol	98-54-4	C ₁₀ H ₁₄ O	150.22	8 × 10 ² (at 20 °C)	3.31	237	100	1.2 × 10 ⁻⁶	3.8 × 10 ⁻³
4-sec-butylphenol	99-71-8	C ₁₀ H ₁₄ O	150.22	9.6 × 10 ²	3.08	239-241	53-62	1.5 × 10 ⁻⁶	3.7 × 10 ⁻²
2,4-di-tert-butylphenol	96-76-4	C ₁₄ H ₂₂ O	206.33	12 (at 20 °C)	5.19	264	56.5	3.7 × 10 ⁻⁶	7.5 × 10 ⁻³ (at 20 °C)
2,6-di-tert-butylphenol	128-39-2	C ₁₄ H ₂₂ O	206.33	3.9 (at pH 4) 4.1 (at pH 7) 4.7 (at pH 9)	4.5	253	36-37	3.7 × 10 ⁻⁶	7.6 × 10 ⁻³ (at 20 °C)
2,4-di-tert-pentylphenol	120-95-6	C ₁₆ H ₂₆ O	234.38	1.6	6.31	273	26	6.0 × 10 ⁻⁶	8.4 × 10 ⁻⁵
4-tert-amylphenol	80-46-6	C ₁₁ H ₁₆ O	164.25	1.7 × 10 ²	4.03	263	94-95	1.9 × 10 ⁻⁶	2 × 10 ⁻³
4-hexylphenol	2446-69-7	C ₁₂ H ₁₈ O	178.27	29.71	4.52	281	70	2.55 × 10 ⁻⁶	7.2 × 10 ⁻⁴
4-heptylphenol	72624-02-3	C ₁₃ H ₂₀ O	192.31	12.2	4.5	256-280	No data	3.4 × 10 ⁻⁶	8.5 × 10 ⁻⁵
4-tert-octylphenol	140-66-9	C ₁₄ H ₂₂ O	206.33	17-19 (at 22 °C)	4.12	280-283	79-82	4.5 × 10 ⁻⁶	1.6 × 10 ⁻³
4-octylphenol	1806-26-4	C ₁₄ H ₂₂ O	206.33	3.1	5.5	296	44-45	4.5 × 10 ⁻⁶	9.8 × 10 ⁻⁵
4-nonylphenol	84852-15-3	C ₁₅ H ₂₄ O	220.36	1.2	3.8-4.77	310	24.5	6.0 × 10 ⁻⁶	3 × 10 ⁻⁵
4-dodecylphenol	210555-94-5	C ₁₈ H ₃₀ O	262.44	2.1	7.1	308	-9	1.4 × 10 ⁻⁵	6.9 × 10 ⁻⁷
2,3,6-trimethylphenol	2416-94-6	C ₉ H ₁₂ O	136.19	1.4 × 10 ³	2.72	222	65	7.5 × 10 ⁻⁷	3.5 × 10 ⁻²

demulsifiers, biocides, oil field chemicals, surfactants, tackifier resins, ink resins and stabilizers, lube oil additives, as a co-solvent, as well as intermediates in the synthesis of antioxidants, phenolic resins and oil additives. Di- and trisubstituted APs are used as antioxidants, stabilizers for polyols, PVC, polyurethane, adhesives, functional fluids and also as intermediates in the manufacture of phenolic antioxidants, UV stabilizers, surfactants, and fuel additives.

19.2 Transformation of Alkylphenols and Identification of Transformation Products

APs can be transformed following different techniques, namely biodegradation, photodegradation and sonolysis, with biodegradation being the most widely used. These processes are generally studied under laboratory conditions to define kinetics and eventually to identify the TPs formed through gas chromatography (GC), liquid chromatography (LC) or high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry (MS).

19.2.1 Biodegradation

Biodegradation is the transformation of a substance into new compounds through biochemical reactions or by the actions of microorganisms such as bacteria and is the dominant transformation process of APs in the environment. Biodegradation has been studied extensively using soils, sludge and bioreactors and different bacteria strains.


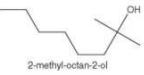
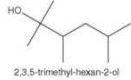
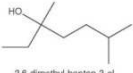
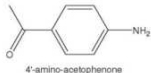
Several strains of sphingomonad bacteria isolated from activated sludge, including *Sphingomonas* sp. strain TTNP3 [15,16] and *Sphingobium xenophagum* Bayram [17–19], can degrade branched 4-NP and utilize it as a sole carbon source. Both strains metabolize various NP isomers by type II *ipso* substitution. Growth on NP appears to be limited to those isomers that contain fully substituted alpha carbons on the alkyl side chain. Different biodegradation procedures and analytical methods have been used to identify the TPs of 4-NP (Table 19.2). Tanghe *et al.* [15] used a *Sphingomonas* sp. strain diethyl ether extract for injection in the GC-MS with an ion trap mass analyzer. 2,4,4-Trimethyl-2-pentanol was identified as a TP of OP. Gabriel *et al.* [19] used HPLC-MS and tandem mass spectrometry (MS/MS) in the negative mode using a turbo ion spray ionization to obtain structural information about the UV-active NP metabolites, studying their fragments. 2-Methyl-octan-2-ol, 3,6-dimethyl-heptan-3-ol and 2,3,5-trimethyl-hexan-2-ol were identified by GC-MS using a quadrupole mass analyzer (Fisons Instruments) [18].

Sphingomonas sp. (S-strain) was also found to be efficient in the degradation of NP [23]. In this case, TPs were analyzed by GC-MS in electron ionization. More than 95% of the NP was degraded within 10 d and aromatic compounds other than NP were not identified, suggesting that the phenolic part of NP was completely degraded. The potential of S-strain for bioremediation applications was also examined. S-strain cells immobilized on chitosan or alginate beads retained their NP-degrading activity in flask-scale experiments. Furthermore, the chitosan-bound cells in a lab-scale bioreactor were found to be persistent for repeated use, suggesting that S-strain could be applicable to the treatment of NP-contaminated wastewater.

Other NP-degrading bacteria are *Pseudomonas* sp. strain JC1 [20] and *Bacillus sphaericus* strain CT7 [24]. In both cases the degradation was followed by GC-MS with electron

Transformation Products of Alkylphenols 581

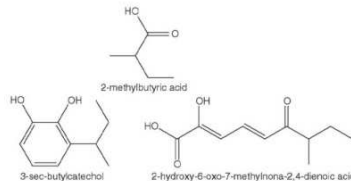
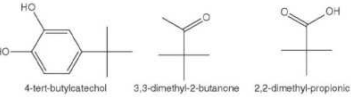
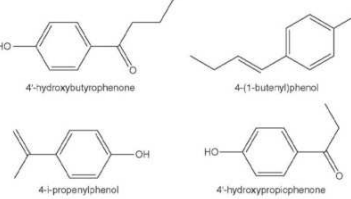
Table 19.2 Identification of transformation products produced in biodegradation experiments.

Species	Compound	Metabolites found	Technique	Ref.
<i>Sphingomonas</i> sp. Strain TTNP3	4-NP	 2,4,4-trimethyl-2-pentanol	GS-IT	15
<i>Sphingobium</i> <i>xenophagum</i> Bayram	4-NP	 2-methyl-octan-2-ol  2,3,5-trimethyl-hexan-2-ol  3,6-dimethyl-heptan-3-ol	HPLC-TIS-MS	19
<i>Pseudomonas</i> sp. strain JCI	4-NP	 4-amino-acetophenone	GC-EI-IT	20

(continued)

582 Transformation Products of Emerging Contaminants in the Environment

Table 19.2 (Continued)

Species	Compound	Metabolites found	Technique	Ref.
<i>Pseudomonas</i> sp. strain HBP1	2-sec-butylphenol	 <p>2-methylbutyric acid 3-sec-butylcatechol 2-hydroxy-6-oxo-7-methylnona-2,4-dienoic acid</p>	GC-EI-MS	21
<i>Sphingobium</i> <i>fuliginis</i> strain TIK-1	4-tert-butylphenol	 <p>4-tert-butylcatechol 3,3-dimethyl-2-butanone 2,2-dimethyl-propionic acid</p>	GC-MS	12
<i>Thauera</i> sp. strain R5	4-APs	 <p>4-hydroxybutyphenone 4-(1-butanyl)phenol 4-propenylphenol 4-hydroxypropicphenone</p>	GC-MS	22

ionization and an ion trap mass analyzer and the identified intermediate was 4'-aminoacetophenone.

Other strains of sphingomonas bacteria can degrade OPs. Namely, *Sphingomonas* sp. strain PWE1, isolated from activated sludge, was found to be able to transform OP to hydroquinone [25], according to GC-MS characterization.

Several *Pseudomonas* strains can degrade medium-length n-APs and utilize it as a sole carbon source. They include *Pseudomonas* sp. strain HBP1 [21], *Pseudomonas* sp. strain MS-1 [12], *Pseudomonas putida* MT4 [26] and *Pseudomonas veronii* strain INA06 [27]. *Pseudomonas* sp. strain HBP1, isolated from municipal sewage sludge, was found to be able to grow on 2-*sec*-butylphenol as the sole carbon and energy source [21]. Strain HBP1 could degrade 2.0 mM 2-*sec*-butylphenol within 40 h and 3-*sec*-butylcatechol, 2-hydroxy-6-oxo-7-methylnona-2,4-dienoic acid and 2-methylbutyric acid were found as intermediates. These metabolites were analyzed by GC with a flame ionization detector (FID) and GC-EI-MS with electronic ionization and chemical ionization with methane as the reagent gas and ion trap mass analyzer.

Pseudomonas sp. strain MS-1, isolated from freshwater sediment, was another bacterium that could use 2-*sec*-butylphenol as the sole carbon and energy source [12]. Within 30 h, this bacterium could completely degrade 1.5 mM 2-*sec*-butylphenol in basal salt medium, with concomitant cell growth. 3-*sec*-butylcatechol, 2-hydroxy-6-oxo-7-methylnona-2,4-dienoic acid and 2-methylbutyric acid were found as intermediates. These metabolites were analyzed by GC-MS. The collected culture was acidified with 1 N HCl, shaken for 3 min with an equal volume of 1:1 (v:v) ethyl acetate:n-hexane, and centrifuged (9600 g, 4 °C, 10 min); the organic layer was then extracted. The extract was dried under a nitrogen flow and subjected to TMS using a BSTFA-acetonitrile solution at 60 °C for 1 h.

Pseudomonas putida MT4, isolated from a mixture of activated sludge samples from four sewage treatment plants, was able to degrade 1.0 mM 4-*n*-butylphenol in 20 h [26]. The TP 4-*n*-butylcatechol was detected by GC-MS. Studies showed that the recombinant strain degraded 4-*n*-APs with an alkyl chain of $\leq C7$, although the wild-type MT4 was unable to assimilate 4-*n*-APs with an alkyl chain of $\geq C5$. The wide range of NP isomers with a highly branched alkyl chain did not overlap with those of known NP-degrading *Sphingomonas* strains, which could degrade NP isomers with a highly branched alkyl chain preferentially, but not APs with a medium-length alkyl chain [16,18,23]. Therefore, MT4 could contribute to the total removal of APs in soils and aquatic environments in combination with such *Sphingomonas* strains.

Pseudomonas veronii strain INA06 isolated from activated sludge, was found to degrade 4-*n*-amylphenol and 4-*n*-hexylphenol as the sole source of carbon [27]. It could also cometabolically degrade linear 4-NP. This bacterium was not able to degrade 4-*n*-heptylphenol or larger chain 4-*n*-APs as the sole source of carbon.

Sphingobium fuliginis strains [13] and *Spirodela polyrrhiza* [28] strains are the only two microbes known to grow on 4-*tert*-butylphenol as a sole carbon and energy source. *Sphingobium fuliginis* strain TIK-1, isolated from the rhizosphere sediment of the emergent aquatic plant *Phragmites australis*, was able to completely degrade 1.0 mM 4-*tert*-butylphenol in a basal salts medium within 12 h [13]. 4-*tert*-butylcatechol and 3,3-dimethyl-2-butanone were identified as internal metabolites. Actually, studies showed that strain TIK-1 cell could degrade 4-APs with various sized and branched side chains (ethyl, *n*-propyl, isopropyl, *n*-butyl, *sec*-butyl, *tert*-butyl, *n*-pentyl, *tert*-pentyl, *n*-hexyl, *n*-heptyl, *n*-octyl, *tert*-octyl, *n*-nonyl and branched nonyl) via a meta-cleavage pathway,

but not 2- or 3-APs. The metabolites of 4-*tert*-butylphenol and other APs were analyzed by GC-MS, as described in [12].

Spirodela polyrrhiza strain OMI, isolated from the rhizosphere *Spirodela polyrrhiza*, was also able to degrade 4-*tert*-butylphenol and almost the same range of APs as *Sphingobium fuliginis* strain TIK-1 [28]. 4-*tert*-Butylphenol metabolites were analyzed by GC-MS. The culture sampled at each sampling time was acidified with 2 N HCl to pH 2–3, shaken for 3 min with an ethyl acetate: n-hexane mixture (2:1, v/v) and centrifuged (378 × g, 10 min) and the organic layer was collected. For trimethylsilylated (TMS) derivatization, the extract (100 μL) was dried under nitrogen flow and then TMS at 60 °C for 1 h using 100 μL of BSTFA–acetonitrile solution (1:1, v/v). GC-MS analysis with two oven programs was used to analyze the metabolites with and without TMS derivatization. Seven metabolites were identified and three structures were determined: 4-*tert*-butylcatechol, 3,3-dimethyl-2-butanone and 2,2-dimethyl-propionic acid.

Biodegradation of 2,6-di-*tert*-butylphenol was accomplished using two effective bacterium strains, F-1-4 and F-3-4, which were isolated from an acrylic fiber wastewater [29,30]. Strains were immobilized in calcium alginate gel through different immobilization methods, namely immobilization of single, homogeneously mixed, and stratified strains. Results indicated that the stratified immobilization yielded the highest degradation efficiency and 91% of 2,6-di-*tert*-butylphenol could be biodegraded after 12 days of incubation.

Transformation of 4-n-OP and 4-n-NP by ammonia-oxidizing bacteria *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 was investigated by Sun *et al.* [31]. TPs of the reaction between nitrite and 4-n-OP and 4-n-NP were nitro-n-OP and nitro-n-NP, respectively, which had less estrogenicity than their parent compounds. All these compounds were identified by UPLC and a quadrupole-time of flight (Q-TOF) mass spectrometer.

There are few studies on the biodegradation of APs under anaerobic conditions. Shibata *et al.* [32] reported that 4-n-propylphenol was degraded anaerobically in a paddy soil, whereas APs with long and branched alkyl chains (4-n-butylphenol, 4-*sec*-butylphenol, 4-*tert*-butylphenol and 4-*tert*-OP) were poorly degraded over 224 days of incubation. Later the same research group demonstrated the anaerobic biodegradation of 4-n-butylphenol and 4-*sec*-butylphenol in a paddy soil supplemented with nitrate [33]. This anaerobic microbial degradation occurred via oxidation of the alpha carbon in the alkyl chain. Although the supplementation of nitrate enhanced dramatically the degradation of APs in the paddy soils, aerobic degradation of 4-*tert*-butylphenol, 4-*tert*-OP and 4-n-OP was still not observed. In both studies, the microorganism involved in the anaerobic degradation was not elucidated. For this reason, Shibata and Katayama [22] isolated and characterized the microorganism responsible for the biodegradation of 4-APs under nitrate-reducing conditions. This microorganism was the anaerobic bacterium *Thauera* sp. strain R5, which could co-metabolically transform 4-APs to the corresponding metabolites (ketone, alkene and alcohol derivatives) with an oxidized alpha carbon in the alkyl chain, accompanied by nitrate reduction. In the presence of 4-hydroxybenzoate as a carbon source, the possible anaerobic metabolic pathways of 4-n-butylphenol by strain R5 were proposed as follows: dehydrogenation of 4-n-butylphenol to 1-(4-hydroxyphenyl)-1-butene; hydroxylation to 1-(4-hydroxyphenyl)-1-butanol; and then dehydrogenation to 4'-hydroxybutyrophenone. In the degradation of 4-APs with linear and medium length alkyl chains ($\leq C6$), 1-(4-hydroxyphenyl)alkanones were observed. 1-(4-hydroxyphenyl)alkenes were detected in the degradation of linear APs with medium or long chain lengths of up to eight plus the secondary alkyl chain. These

results suggested that the degradability of 4-APs by strain R5 might decrease with increasing chain length and bulky size. GC-MS was used to detect the four metabolites with retention times of 8.5, 9.4, 10.4 and 10.7 min and identified as 4-isopropenylphenol, 4-(1-butenyl)phenol, 4'-hydroxypropiophenone and 4'-hydroxybutyrophenone by comparison of their spectra with those of authentic standards, the fragment patterns and the molecular ion peaks.

Some research groups have studied the degradation of NP in soils amended with sewage sludge. Hesselsoe *et al.* [34] studied the degradation of 4-NP in homogenous and non-homogeneous mixtures of soil and sewage sludge and demonstrated that degradation was dependent on oxygen availability. The mineralization of ^{14}C -labeled NP in both homogenized and nonhomogenized sludge-soil mixtures was investigated and the results showed that NP was degraded within 38 d in aerobic homogenized mixtures, whereas in nonhomogeneous mixtures containing sludge aggregates its degradation was generally not completed within 3 months. Mortensen and Kure [35] studied the degradation of NP in spiked soils and in soils treated with organic waste products, including both anaerobic and aerobic sludge, compost and pig manure. They showed that more complete degradation of NP was observed in sludge amended soil compared with compost-treated soil. They also studied the influence of plant growth on the degradation and demonstrated that when NP was added as waste to the soil, plant growth significantly stimulated the degradation.

Mineralization of ^{14}C -labeled NP was also used in wheat cell cultures [36]. After incubating 1 ppm NP in the cell culture, more than 90% of the applied radioactivity could be extracted from the cells. Hydrolysis of metabolites resulted in two major TPs which were less polar than the parent metabolite substance but more polar than 4-NP. Both the metabolites and the TPs of the hydrolysis were analyzed by GC-EI-MS using a double-focusing Kratos MS 50 fast scan mass spectrometer. 4-n-NP derivatives were dissolved in methanol containing 0.1% ammonia and injected in a LC-MS/MS with electrospray. The identified TPs were glucose, glucuronic acid, aglycon, 1,5-diacetyl-2,3,4,5-tetramethylglucitol, and 1,2,3-triacetyl-3,4,6-trimethylglucitol.

The same degradation method was used to study the biotransformation of 4-*tert*-OP in isolated rat hepatocytes [37]. After a 15 min incubation of hepatocytes with 30 μM ^{14}C -labeled 4-*tert*-OP, over 97% of the 4-*tert*-OP was metabolized to a complex mixture of metabolites, which were detected by radio-HPLC (Figure 19.2a) and identified by GC-MS (Figure 19.2b). The initially formed metabolites were identified as products of hydroxylation of the aromatic ring to form catechols and methylated catechols, as well as glucuronide conjugates of the catechol metabolites or parent phenol. These TPs were further metabolized by hydroxylation of the alkyl chain, followed by glucuronide conjugation of the alkoxy group. The identified TPs were 2-hydroxy-4-(1',1',3',3'-tetramethylbutyl)phenol (I), 4-(1',1',3',3'-tetramethylbutyl)phenoxy- β -glucuronide (II), 2-methoxy-4-(1',1',3',3'-tetramethylbutyl) phenoxy- β -glucuronide (III), 2-hydroxy-4-(1',1',3',3'-tetramethylbutyl)phenoxy- β -glucuronide (IV), 2-hydroxy-5-(1',1',3',3'-tetramethylbutyl) phenoxy- β -glucuronide (V), 2-methoxy-4-(2'- β -glucuronoxo-1',1',3',3'-tetramethylbutyl)phenol (VI), 4-(2'- β -glucuronoxo-1',1',3',3'-tetramethylbutyl) phenol (VII), 2-methoxy-4-(2'-hydroxy-1',1',3',3'-tetramethylbutyl)phenoxy- β -glucuronide (VIII), 4-(2'-hydroxy-1',1',3',3'-tetramethylbutyl) phenoxy- β -glucuronide (IX) and 2- β -glucuronoxo-4-(2'-hydroxy-1',1',3',3'-tetramethylbutyl)phenol (X). The proposed pathways for the degradation of *tert*-OP in rat hepatocytes as well as the structures of the metabolites are shown in Figure 19.2c.

586 Transformation Products of Emerging Contaminants in the Environment

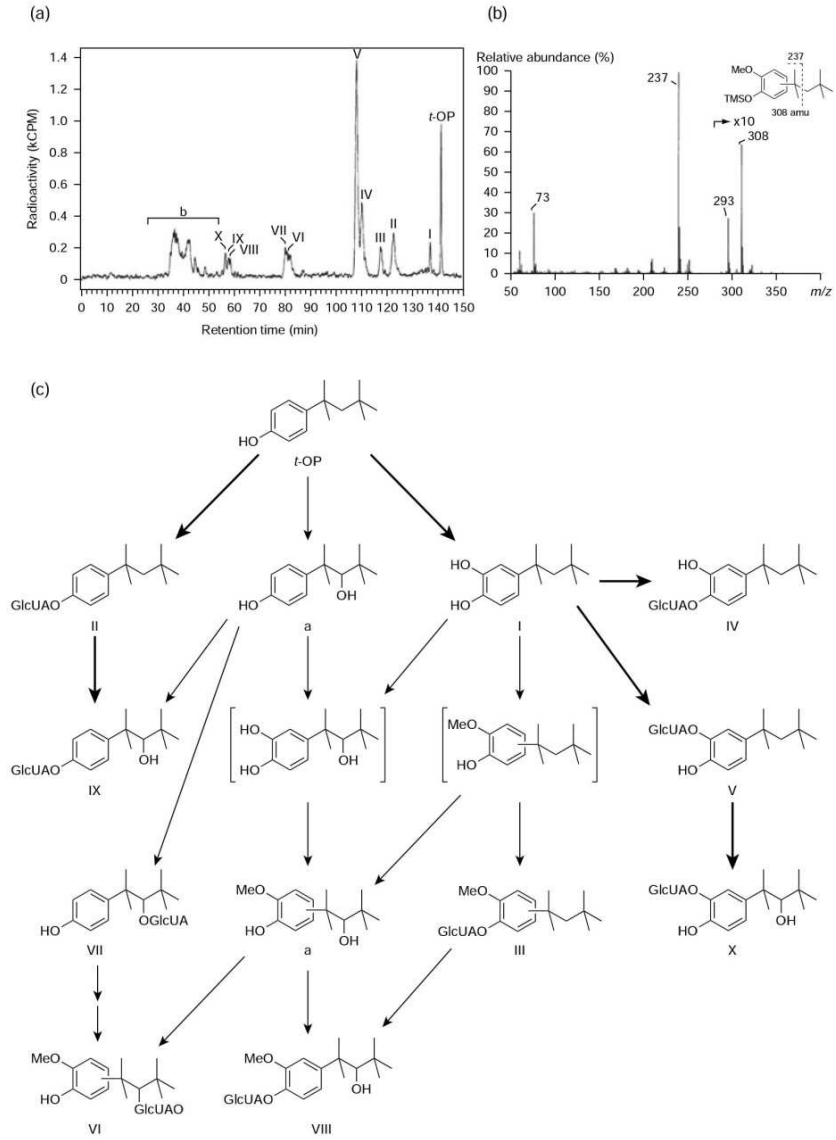


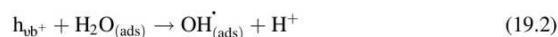
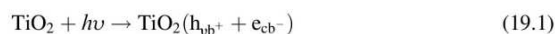
Figure 19.2 (a) Radio-HPLC profile of radioactive metabolites. Reprinted with permission from [37] Copyright (2000) Elsevier Ltd. (b) GC-MS spectra of the trimethylsilyl ether of the aglycone of metabolite III, Reprinted with permission from [37] Copyright (2000) Elsevier Ltd. (c) Proposed pathways of tert-OP in rat hepatocytes.

19.2.2 Photodegradation

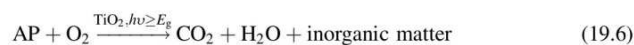
The photodegradation process is gaining importance in the study of the fate of APs in the environment. Different photodegradation techniques have been used to degrade APs: (i) photocatalysis, (ii) photochemical degradation, and (iii) direct photolysis. The main oxidizing reagents involved in these methods are ozone, oxygen, and hydrogen peroxide (H_2O_2). These reagents, and sometimes water, can produce highly reactive species, such as hydroxyl radicals (OH^\bullet) and singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), under appropriate conditions. The main reducing reagents involved are electrons or zero valent metals, such as iron. These species can be introduced by addition or by *in situ* reactions. In photodegradation processes, UV radiation is used as the energy source to directly decompose ozone and hydrogen peroxide or, through a photosensitizer, to degrade oxygen or water to create reactive radicals. UV radiation itself can sometimes be used to directly photolyze pollutants. Combinations of UV and oxidizing reagents are flexible.

Photocatalysis is the main photodegradation technique used to degrade APs. The main factors that influence the photocatalytic degradation of APs are the presence of photosensitizers and the light intensity. A good photosensitizer should be chemically and biologically inert, photocatalytically active, easy to produce and use, and activated by sunlight. Semiconductors (e.g., TiO_2 , ZnO , Fe_2O_3 , CdS and ZnS) can act as photosensitizers for light-reduced redox processes due to their electronic structure, which is characterized by a filled valence band and an empty conductance band [38]. When a photon with energy of $h\nu$ matches or exceeds the bandgap energy, E_g , of the semiconductor, an electron, e_{cb}^- , is promoted from the valence band into the conductance band, leaving a hole, h_{vb}^+ , behind. This positive hole may react directly with the surface-sorbed organic molecules or indirectly oxidize organic compounds via formation of OH^\bullet radicals, which are the most potent oxidizing agents.

Among the different photosensitizers, TiO_2 is considered the most efficient semiconductor for environmental applications. It has some significant advantages over other semiconductors, such as its low cost, its high chemical stability and its capacity to generate highly oxidizing holes and electrons. The generated holes can produce OH^\bullet and superoxide ($\text{O}_2^{\bullet-}$) radicals, which are strong oxidizing agents. Therefore, they play an important role in the photocatalytic degradation processes:



Then these active species oxidize organic compounds present in solution, eventually mineralizing them to CO_2 , H_2O and simple inorganic ions. The reaction describing the process for the implementation of this semiconductor in the degradation of APs is given by the following equation:



One of the major products of this reaction is CO_2 , as the result of oxidation of organic compounds.

Tanizaki *et al.* [39] used a porous and nanostructured TiO₂ immobilized on a photoreactor to photocatalytically degrade amyl-, hexyl-, heptyl-, octyl-, 4-*tert*-octyl- and NP. With the photocatalyst, about 90% of their initial concentration was decomposed within 60 min of UV irradiation. They found that the longer the alkyl chain length of the APs, the faster the decomposition rate. They also showed that the decomposition rate of straight-chained APs was faster than that of branched ones.

TiO₂/UV was also used to investigate the photocatalytic destruction of 2,4,6-trimethylphenol in aqueous suspensions [40]. The authors found that the more diluted the initial concentration of the AP, the faster the degradation.

Davezza *et al.* [41] applied TiO₂/UV photocatalysis to treat soil washing extracts containing 4-*tert*-butylphenol in the presence of non-ionic (C₁₂E₈, C₁₂E₂₃ and Brij 35) and anionic (SDS) surfactants and some of their binary mixtures. It was proven that Brij 35 allowed faster photocatalytic treatment of the soil washing wastes.

An important disadvantage of TiO₂ is that it only works under UV light irradiation ($\lambda \approx 380$ nm) and this wavelength only corresponds to 8% of the sunlight energy. Furthermore, TiO₂ is usually used as a powder in aqueous suspensions and the recovery of the material from the solution at the end of the process is very difficult and expensive. In order to increase the efficiency of the photocatalytic process in TiO₂, reduced forms of TiO₂, such as TiO_x ($x < 2$), have been used [42]. NP was completely degraded in 30 min under visible light by using a 350 nm thick layer of TiO_{1.8} grown on a soda lime substrate.

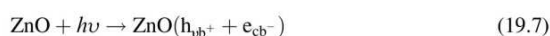
Ardizzone *et al.* [43] combined TiO₂/UV photocatalysis and ozonation to successfully degrade 4-cumylphenol to CO₂. 4-Cumylphenol (0.2 mM) was completely mineralized after 90 min of the combined treatment. The success of the process was largely due to the presence of sandwiched TiO₂ layers deposited onto an Al lamina. The stable and purposely rough TiO₂ surface offered a large number of adsorption sites for both the pollutant and ozone, thus promoting synergistic, highly oxidizing reaction steps. The possible formation of *ortho/para* bisphenols as oxidation intermediates was suggested as the main starting step leading to ring opening intermediates and finally to CO₂.

Wu *et al.* [44] developed a spiral photoreactor system for the efficient degradation of 4-*tert*-OP in a water solution with TiO₂ used as photocatalyst. A single layer TiO₂ film prepared with 13.6% of TiO₂ precursor was proven to be the optimal photocatalytic reaction condition, under which 90% of 4-*tert*-OP could be degraded in 30 min when the initial concentration was 10 mg/L. The intermediate products of 4-*tert*-OP degradation were probably some hydroxy group containing substances which could be decomposed further in the reaction sequences. There were 3 TPs identified with by LC-MS: 4-(2,4,4-trimethylpentan-2-yl)benzene-1,2-diol, 4-(3-hydroxy-2,4,4-trimethylpentan-2-yl)phenol and 4-(2,3,3-trimethylpentan-2-yl)benzene-1,3-diol.

BiVO₄ was also reported as a photocatalyst to degrade 4-n-NP under irradiation from a solar simulator [45]. The photocatalytic activity of BiVO₄ to degrade 4-n-NP was comparable to that of TiO₂ in an air saturated solution and, further, became greater in an O₂ saturated solution under solar light. However, the CO₂ mineralization yield was quite low since the photooxidation power was not sufficient to oxidize intermediate products. The same photocatalyst was applied to the degradation of propyl-, butyl-, pentyl-, hexyl-, heptyl-, octyl- and NP under solar light [46]. Degradation rates became faster with increasing alkyl chain length. The amount of adsorption on the BiVO₄ surface was much larger for longer hydrophobic APs, showing the suitability of BiVO₄ to degrade the endocrine disruptors OP and NP. BiVO₄ was shown to be also effective for the degradation of branched 4-NP. The

analyses of TPs were carried out on a GC-MS instrument (Hewlett-Packard 6890/5973) equipped with a chiral capillary column. Later the same research group used silver fine-particles loaded on BiVO₄ to efficiently degrade 4-n-NP and 4-n-OP under visible light irradiation [47]. By using silver as a co-catalyst, the electron-hole charge separation at the photocatalyst/co-catalyst interface became very efficient, improving the photocatalytic activity. Furthermore, the metallic silver particles contributed to an increase in the reaction rates and CO₂ mineralization yields for the degradation of NP. A common TP was identified as *cis*, *cis*-4-alkyl-6-oxo-2,6-hexadienoic acid.

Babaei *et al.* [48] described the modeling of NP degradation by the UV-vis/ZnO process. In this regard, a full factorial experimental design was performed to study the main variables affecting the degradation process. ZnO was proposed as an alternative to TiO₂ since the pathway of OH• radical generation is similar to that of UV/TiO₂. Thus, it can be described by Equations 19.7 and 19.2–19.5:



The main advantage of ZnO in comparison to TiO₂ is that it absorbs over a larger fraction of the UV spectrum and the corresponding threshold of ZnO is 425 nm. They concluded that the degradation rate constant decreased with an increase in the initial concentration of NP while it increased with ZnO loading until a concentration of 0.5 g/L. The degradation rate constant also increased with the pH up to pH10, after which a significant decrease was observed.

Trivalent iron was also chosen as a photosensitizer because Fe(III)-aquo complexes are very efficient at forming hydroxyl radicals. Fe(III)-aquo complexes are known to undergo photolysis upon irradiation with wavelength $\lambda > 300$ nm, yielding Fe(II) and OH• radicals. Among Fe(III)-aquo complexes, Fe(OH)²⁺ is photolyzed with the highest quantum yield [49], according to the following reaction.



Brand *et al.* [50] investigated the degradation of 4-OP photoinduced by Fe(III) in water/acetonitrile solution (95 : 5). In this case, OH• radicals did not react with the AP, but with acetonitrile, leading to acetonitrile-derived radicals. The photoproducts were identified by LC-ESI-MS. The first photoproduct was confirmed with *m/z* 222 for the molecular peak and *m/z* 151 for the major fragment, the 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)pyrocatechol. The second and the third photoproducts were benzoquinone and 4-hydroxyacetophenone and were identified by comparison with the authentic standards. The photoproducts IV–VII came from the oxidation on the different sites of 4-OP alkyl chain. Dimeric photoproducts were not identified.

Direct photolysis using UV-solar simulating light was also employed to degrade APs. Neamtu and Frimmel [51] showed that the degradation of OP in an aqueous solution by using direct photolysis was much slower than when the photodegradation took place in the presence of H₂O₂, due to the generation of OH• radicals through the H₂O₂ photolysis. Actually, after 8 h of irradiation, the estrogenic activity of OP remained approximately constant for experiments conducted using the UV solar simulator, whereas it practically disappeared at the beginning of the reaction when 50 mM H₂O₂ was added. They also studied the effect

of some common water constituents, such as bicarbonate, nitrate, Fe(III) ions and dissolved natural organic matter (DNOM) on the photodegradation of OP. The results confirmed that the degradation of OP was also increased in the presence of NO_3^- and DNOM and was decreased in the presence of HCO_3^- . On one hand, NO_3^- is able to form OH^\bullet radicals, therefore the degradation rate of photolysis increases. On the other hand, the light absorption by DNOM led to the formation of reactive species, such as $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, OH^\bullet and peroxy (ROO^\bullet) radicals, which reacted with APs. Phenol, 1,4-dihydroxybenzene and 1,4-benzoquinone were found as the dominant intermediate products.

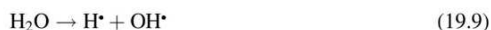
Similar results were obtained by Xu *et al.* [52]. They found that the half-life of OP under simulated solar irradiation conditions ranged from 0.6 to 2.5 days, depending on the initial concentration of the precursors. They also studied the influence of humic acid (HAC), one of the most important fractions of humic substances, which represent the most widespread pool of natural recalcitrant organic carbon occurring in the biosphere, constituting the most stable fraction of organic matter in soils, sediment and waters. HAC produces and competes for OH^\bullet radicals, absorbs light and can inhibit photolysis by binding APs [53].

Bledzka *et al.* [54] also used direct photolysis to degrade OP. The results obtained with this method were compared to those obtained with the advanced oxidation process ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$) and those obtained with photosensitized oxidation using $^1\text{O}_2$. Although efficient degradation was found with photolysis at 254 nm, the rate of the process was very slow. The $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ system was found to be the most efficient method to degrade OP.

The degradation of NP was also evaluated using simulated solar UV-irradiation in the absence and presence of DNOM, HCO_3^- , NO_3^- and Fe(III) ions [51]. The results indicated that the oxidation rate increased in the presence of H_2O_2 , Fe(III) and DNOM. In this case, the estrogenic activity of NP aqueous solution after 193 h of irradiation in the absence of initial H_2O_2 was comparable with that after 7 h of irradiation for experiments in the presence of 50 mM H_2O_2 . Phenol, 1,4-dihydroxybenzene and 1,4-benzoquinone were also found as the dominant TP.

19.2.3 Sonolysis

Recently, there has been interest in the use of ultrasound to decompose organic compounds. The chemical effects of ultrasound derive from acoustic cavitation: the formation, growth and implosive collapse of bubbles in a liquid. During the adiabatic compression stage of oscillating or collapsing bubbles, high temperatures of several thousand K and pressures of several hundred bars are reached in a short period of time. Water molecules under such extreme conditions undergo thermal dissociation to yield H atoms or OH^\bullet radicals:



Organic solutes in the vicinity of a collapsing bubble or partitioned into the gas phase of the bubble undergo thermal decomposition and/or react with the reactive radicals.

The sonolytic degradation of 4-cumylphenol in aqueous solution was investigated by Chiha *et al.* [55]. First, they studied the influence of operating parameters for the sonication process. They found that the degradation rate increased proportionally with increasing ultrasonic power from 20 to 100 W and temperature in the range 20–50 °C. The most favorable conditions for the degradation were observed in acidic media. The dependence of the 4-cumylphenol degradation rate on the presence of various saturating gases showed the following order: argon > air > nitrogen. Actually, the degradation was inhibited in the presence of nitrogen gas due to the free radical scavenging effect in the vapor phase within the cavitation bubbles. The ultrasonic degradation of 4-cumylphenol was clearly promoted in the presence of bromide and bicarbonate ions. Finally, experiments conducted using pure and natural water demonstrated that the sonolytic treatment was more efficient in the natural water compared to pure water.

Sonolysis of butyl-, pentyl-, octyl- and NP in water was studied at a sound frequency of 200 Hz with an acoustic intensity of 6 W cm^{-2} under argon, oxygen and air atmospheres [56]. All the APs were effectively degraded, although their sonolytic degradation rates were dependent on the length of the alkyl chain. Over 90% degradation of APs occurred within 30 min sonication, except for NP (within 100 min sonication). The addition of Fe(II) and Fe(III) as catalysts during sonication resulted in a remarkable enhancement of degradation. On the other hand, sonolysis was also used to accelerate enzymatic hydrolysis of APs in fish bile [57]. Commonly the hydrolysis time was reduced from 16 h in sonolysis to 20 min in enzymatic hydrolysis.

19.3 Occurrence of Alkylphenol Transformation Products in the Environment

Phenolic compounds in the environment can arise from the degradation of natural substances as well as from anthropogenic activities, such as human settlements, industrial and agricultural activities. APs have been detected in water, sediments, soil, biota and air. The partitioning, transport and fate of APs in the environment depend on the physicochemical properties of each compound. Processes such as sorption, volatilization, degradation and metabolization are main factors affecting the fate of APs in the environment. The presence of both APs and their TPs is responsible for the toxicological effects toward aquatic and terrestrial ecosystems. These are directly related to the concentration of each compound in each environmental matrix and to its specific toxicity. Therefore, it is essential to determine the partitioning of APs in the ecosystem, the interactions between the different environmental compartments, and the degradability of each compound. This information, considered as a whole, will permit better evaluation of the most dangerous compounds and, therefore, allow appropriate actions for their containment to be taken.

19.3.1 Water

Water is the main vehicle of transport of APs in the environment. APs have been detected worldwide in all types of waters, including surface, coastal, groundwater, rainwater and lakes. Site specific industrial/urban and agricultural use of AP-containing products contribute to the dispersion of APs. Because APs are high production volume chemicals with high detrimental impact, they are considered as a main group of contaminants for which actions

have to be undertaken to minimize their environmental presence. Among APs, most of the studies have been performed on OP and NP, because of their high use, accumulation [58], estrogenic effects [9] and, since 1998, because they are legislated.

Whereas APs are distributed worldwide, the concentration detected in waters is geographically dependent, and legislation actions, water policy and water treatment facilities play an important role in the residues detected at each site. Furthermore, the monitoring of APs is basically restricted to OP and NP, and very little information is available on the fate of these common APs in the water ecosystem. APs were monitored in rivers and estuaries in England and Wales during 1993 [59]. Dissolved NP (and total extractable NP) ranged from 0.2 (0.5) to 53 (180) $\mu\text{g/L}$, the highest levels being in the river Aire. Concentrations of NP were one order of magnitude lower in estuaries than in rivers, reflecting dispersion and dilution processes. Out of four sampled estuaries, both NP and OP were detected only in the Tees estuary at 5.2 and 13 $\mu\text{g/L}$, respectively [59]. Matthiessen *et al.* [60] reviewed the biological effects of contaminants in British estuaries and coastal waters for the last 100 years. Until 1970, the major pollution impacts on estuarine organisms were probably attributed to poorly treated sewage and oxygen depletion whereas, since the installation of wastewater treatment plants (WWTPs), the release of toxic micropollutants became a serious environmental problem and NP was identified in the Tyne and Tees estuaries as contributing to toxic effects in the copepod *Tisbe battagliai*. In Italy, the nature, origin and trend of phenolic compounds in the river Po, whose water is used for drinking purposes, was evaluated. Among several methyl and methylethyl phenols, NP isomers showed a decrease in concentration from 158 $\mu\text{g/L}$ in 1994 to 7.5 $\mu\text{g/L}$ in 1996, although the frequency of variation was invariable. This decrease in concentration was explained by the substitution of this surface active agent with new products, such as alcohol polyethoxylates. In France, four rivers representing rural, agricultural, urban and industrial watersheds were monitored in 1999–2000 to determine the presence of APs in water and sediment. NP was detected from 0.006 to 0.55 $\mu\text{g/L}$ and OP from 0.001 to 0.0077 $\mu\text{g/L}$, and the highest levels were found in urban and industrial sites. Sediment concentrations varied from 0.0022 to 2.87 $\mu\text{g/g}$ for NP and from 0.001 to 0.491 $\mu\text{g/g}$ for OP, the highest concentration being in urban sites. In some sites, estrogenic activity was induced at those concentrations and, thus, could produce toxic effects toward aquatic organisms [61]. Also in France, NP and OP, together with their mono-, di- and tri-ethoxylated compounds, were analyzed in surface and groundwater in the Rhône-Alpes region in March–April 2007. With solid phase extraction (SPE) and LC-MS/MS, only NP mono and di-ethoxylated and OP di-ethoxylated were detected at 0.07–1.41 $\mu\text{g/L}$, whereas NP and OP were not identified [62]. In Japan, Tsuda *et al.* [63] monitored the presence of 4-NP and 4-*tert*-OP in water and fish from eight rivers flowing into Lake Biwa. NP was detected in waters at 0.11–3.08 $\mu\text{g/L}$ all year round and in all 48 analyzed samples, whereas 4-*tert*-OP was detected at lower levels (nd–0.09 $\mu\text{g/L}$) and at lower frequency (23 out of 48 samples). NP was detected in fish at levels up to 63 ng/g ww and OP at 6 ng/g ww. For NP, bioconcentration factors were lower in field fish than in laboratory experiments, whereas for 4-*tert*-OP, these values were maintained. In another study, stir bar sorptive extraction-thermal desorption-GC-MS (SBSE-TD-GC-MS) with *in situ* and in tube silylation was used to determine the presence of APs in Tama river water, Japan. The method was optimized to determine 4-*tert*-butylphenol, 4-n-pentylphenol, 4-n-hexylphenol, 4-n-heptylphenol, 4-*tert*-OP, 4-n-NP and 4-NP. The most ubiquitous detected compound was NP, identified upstream, midstream and downstream of the river at constant concentrations of 0.055–0.059 $\mu\text{g/L}$ while *tert*-OP was detected from 0.012 $\mu\text{g/L}$ in upstream waters and 0.018 $\mu\text{g/L}$ in downstream waters. The other compounds

were not detected above the calculated LOD of 0.0002–0.005 $\mu\text{g/L}$ [64]. In the river Hsin-Dian Creek, in Taiwan, 4-*tert*-OP was not identified using HPLC-MS/MS in water, while in sediments and fish mean concentrations were 287 and 36.3 ng/g ww. On the other hand, NP was detected in water at 1.026 $\mu\text{g/L}$ and at 817 and 238 ng/g ww in sediments and fish, and was the most ubiquitous detected compound [65]. In China, the behavior of APs was studied in the Jialu river, Henan Province, which annually receives 726 kg of NP and 30.2 kg of OP from the urban discharges from the city of Zhengzhou [30]. The concentration of NP ranged from 0.075 to 1.52 $\mu\text{g/L}$ and that of OP, from 0.021 to 0.063 $\mu\text{g/L}$. Dilution and biodegradation accounted for the main decline in AP concentrations along the river, although adsorption and air–water exchange also contributed to the elimination of APs. The decay half-lives for NP and OP were 1.6 and 2.4 d, respectively, and about 70.2% of total NP and 24.1% of total OP were finally eliminated from the water phase in a downstream direction, indicating that the downstream channel served as a sink for APs in the study area [30]. In Rumania, industrial wastewaters dealing with paper, detergent, electricity and heat, refinery, wood and sewage of different cities, contained 4-*tert*-OP from 0.011 to 0.069 $\mu\text{g/L}$, 4-OP from 0.018 to 0.045 $\mu\text{g/L}$ and 4-NP from 0.064 to 0.698 $\mu\text{g/L}$, and river concentrations were of the same order, 0.076 and 0.156 $\mu\text{g/L}$ for 4-*tert*-OP, from 0.024 to 0.091 $\mu\text{g/L}$ for 4-OP and from 0.343 to 0.4.4 $\mu\text{g/L}$ for 4-NP [66]. In that study, APs were analyzed by HPLC using a mixed-mode stationary phase column (C18/SCX). In the Polish river waters monitored in 2009, NP was always detected from 0.18 to 0.53 $\mu\text{g/L}$ while OP was only detected in 4 out of 11 rivers at limit of quantification (LOQ) 0.04 $\mu\text{g/L}$. In this study, a SPE method using polytetrafluoroethylene/teflon (PTFE) microspheres as sorbent, followed by HPLC-fluorescent detection was developed, obtaining very good recoveries and sensitivity for the low concentration analysis of APs in water [67]. In Japanese rivers, 4-*tert*-butylphenol, 4-*n*-pentylphenol, 4-*n*-hexylphenol, 4-*n*-heptylphenol, 4-OP and 4-NP were analyzed by HPLC with coulometric-array detection, reporting high efficiency and selectivity [68]. NP and OP were detected in drinking water at 0.04 and 0.05 $\mu\text{g/L}$, while in river waters, butylphenol, pentylphenol, heptylphenol, OP and NP were detected at 0.03–0.17 $\mu\text{g/L}$. In Norway, Boitsov *et al.* [69] analyzed produced water from nine oil installation plants. SPE and GC-MS were used to quantify 49 known APs and another set of 35 peaks corresponded to “non-identified” AP peaks. The concentration of $\sum\text{C2}$ APs to $\sum\text{C9}$ APs ranged from 0.001 to 1098 $\mu\text{g/L}$ and the most ubiquitous compounds were C2 APs, such as dimethylphenol and ethylphenol. Lower concentrations were found with increasing alkyl chain length, and NP was the least detected compound. The levels of low-weight APs varied greatly among locations but only moderate differences were observed in the levels of long-chained APs. In addition, unidentified APs were semi-quantified at levels from 0.021 to 6.58 $\mu\text{g/L}$ [69]. The study reports that the release of these compounds, especially long-chain para-substituted, can act as endocrine disruptors for marine biota.

In the NE Spain, wastewater treatment plants (WWTPs) and river outflows were identified as a major source of organic micropollutants to coastal waters, with discharges of 8800 g/d and 17 030 g/d. Among other contaminants, OP, NP and NP monoethoxylated were identified as the major contaminants, with concentrations from 0.013 to 0.061 $\mu\text{g/L}$ for OP and NP in river water and 0.395 and 1.021 $\mu\text{g/L}$ for OP and NP in wastewater effluents, respectively [70]. In that study, water was analyzed unfiltered to capture the total concentration of APs (dissolved + particulate).

In the Thermaikos gulf, Northern Aegean Sea, Greece, NP, 4-*tert*-OP, *n*-OP and other endocrine disrupting chemicals (EDCs) were detected in seawater (1.7–201 ng/L), suspended

particulate matter (61–1578 ng/g dw) and in sediments (6–2695 ng/g), and mussels only accumulated NP at 27.3–79.4 ng/g dw. Rivers, raw wastewater from tanneries and sewage submarine emissaries discharging into the gulf were the main contributors of APs to the Thermaikos gulf. In addition, a high risk for sediment biota was observed for NP [71].

It is not surprising that 4-NP has also been detected in rain and snow in urban, suburban and rural areas in Germany and Belgium. In this study, 16 isomers of NP were quantified by GC-MS. The mean concentration of 4-NP in rain water and roof runoff was 0.253 µg/L, being the levels in suburban areas > rural > urban. In addition, lower levels were detected in summer rain than in winter rain. In snow, 4-NP was detected with a mean value of 0.242 µg/L, with levels in urban areas > suburban, and not detected in rural areas. The presence of NP in rain and snow points to wet deposition as a source of 4-NP in the environment [72].

WWTPs receive high loads of APs through urban and industrial effluents, and runoff. Within the WWTP, APs are eliminated from water during primary and biological treatment, although if treatment is not fully effective they can be released by the effluent. In a typical biological treatment WWTP, the elimination efficiency is 70–90% [73], although a high amount can accumulate in sludge which, in turn, may contain high levels of APs [74]. Sludge is used in many countries as organic fertilizer and can be a source of APs to agricultural soils or groundwater. Monitoring of APs in WWTP can be performed in two ways. One way is to determine the concentration in the effluents, with the aim to determine the potential contribution of APs to received waters. Another way is to determine the mass balance of contaminants by monitoring the influent, the effluent and the sludge, to determine the efficiency of the WWTP and to define the partitioning and behavior of APs within the WWTP. These different approaches have been used depending on the objectives to be achieved. Blackburn *et al.* [59] determined NP at 0.1–5.4 µg/L in 15 English sewage effluents and indicated that these levels were low, presumably as a result of the UK voluntary bans on APs in domestic detergents [59]. In a Geneva (Switzerland) municipal sewage wastewater receiving 130 000 m³/d [75], the total concentration of free 4-APs ranged from 1 to 6.8 µg/L, which was composed of 18 differently branched 4-NPs derivatives identified with both GC and LC-MS, while 4-*tert*-OP, 2-NP, 2,4-dinonylphenols, various branched 4-OP and 4-decylphenols could not be detected in wastewater. In Spain, NP, NP monoethoxylate and NP diethoxylate were studied in a sewage treatment plant receiving 0.268 m³/s [76]. Using simultaneous steam distillation/solvent extraction and GC-MS and isotope dilution quantification, NP was detected at 57.6 µg/L in the influent, at 72.73 µg/L in the pre-treatment effluent, at 58.18 µg/L in the primary effluent, and finally at 0.65 µg/L in the plant effluent, with a very high removal efficiency. In contrast, very low levels of 4-NP, 4-OP, 4-*tert*-OP were detected in urban wastewaters from Granada, Spain, where 4-NP was detected in only one sample at 0.1 µg/L while 4-OP was never detected using solid phase extraction followed by GC-MS with BSTFA/TMCS derivatization [77]. These concentrations are very low compared to wastewaters from more industrialized or urbanized areas. In a WWTP from Australia with a capacity of 5000 habitants-equivalent or 1300 m³/day, 4-*tert*-OP was detected at 0.0026–0.0044 µg/L, NP at 0.070–0.120 µg/L and 4-cumylphenol at 0.0023 µg/L. Anaerobic sludge contained 10.9 ng/g 4-*tert*-OP, 50.8–406 ng/g NP and 0.78 ng/g 4-cumylphenol [78], and these levels were maintained in the aerobic and anoxic zones of the sludge bioreactor, except for 4-cumylphenol that increased slightly. These levels are low, compared to other WWTP with higher urban and industrial pressure. In that study, a SBSE coupled to GC-MS was used for the determination of APs in wastewaters and sludge [78]. Very few studies report the presence of APs other than OP and NP and, to our knowledge, no study reports the

biodegradation of APs within a WWTP. Ko *et al.* [79] reported the comparison of laser-induced fluorescence and GC-MS to determine phenolic endocrine disrupting compounds in treatment effluents and rivers from South Korea during the period 2002–2004. 4-*tert*-butylphenol was detected in 3 sewage samples out of 11 analyzed at 25.7–29.3 $\mu\text{g/L}$; 4-*n*-hexylphenol was detected in one sewage water sample at 101.6 $\mu\text{g/L}$; 4-*n*-heptylphenol was detected in 9 samples at 79.5–399 $\mu\text{g/L}$, 4-*n*-OP was detected at 2 sites and 4-*tert*-OP in one sewage sample at 185.9 $\mu\text{g/L}$. Finally, NP was the compound detected in the highest concentrations and in most river and sewage waters at 44.2–244.8 $\mu\text{g/L}$ and 57.4–299 $\mu\text{g/L}$, respectively [79].

The concentrations and impact of APs is correlated to the anthropogenic activities of a given site, although there is generalized evidence that APs, especially OP and NP, are widespread water contaminants. To control the occurrence of APs, NP and OP have been included in the list of the 33 priority hazardous substances of the European Union Water Framework Directive (directive 2000/60/EC). In addition, Directive 2003/53/EC has also established restrictions on the use, production and marketing of these compounds with the aim to phase out these contaminants. As a result, the levels of APs have been declining in environmental matrices after bans on the use of APs.

19.3.2 Air

The occurrence of APs and their TPs in air is an issue of concern due to potential adverse effects on humans and the ecosystem. Dachs *et al.* [7] reported for the first time the occurrence of NPs in the atmosphere of the lower Hudson river estuary (USA). By sampling atmospheric particulate matter and gas phase samples with a Hi-Vols (flow rate of 0.5 m^3/min for 24 h) using quartz fiber filters and polyurethane foam, respectively, and analysis by GC-EI-MS, NPs were detected in the atmosphere from 0.1 to 51.4 ng/m^3 for the aerosol phase and from 0.2 to 68.6 ng/m^3 for the gas phase [7]. In a following study, *tert*-OP was detected at mean concentration of 0.038 and 0.21 ng/m^3 and in the aerosol and gas-phase, respectively, whereas NP mean concentrations were 5.4 ng/m^3 in the aerosol and 6.9 ng/m^3 in the gas phase. In that study, local sources rather than long-range transport accounted for the main atmospheric input of APs and seasonal trends in the concentration of OP and NP were observed with higher gas-phase concentrations during summer compared to fall [80]. APs were also identified in a mountain site in Fichtelgebirge (NE Bavaria, Germany), 700 m asl, and lower concentrations were observed compared to an urban site [80]. OP was detected at 0.02–0.16 ng/m^3 in the gas phase and at 0.3–4.2 pg/m^3 in the aerosol; NP was detected at 0.15–1 ng/m^3 in the gas phase and at 1.7–117 pg/m^3 in the aerosol. In this study, the method was developed to identify the composition mixture of NP-isomers [81,82] in the atmosphere near industrial areas.

Xie *et al.* [83] reported mean concentrations of *tert*-OP of 0.14 and 0.007 ng/m^3 in the vapor and particle phase, respectively, and for NP mean levels of 0.22 and 0.04 ng/m^3 , in the vapor and particle phase, respectively, in suburban areas of the North sea, and reported the declining trends from suburban areas to the open sea. They conclude that the atmosphere is a significant pathway for the transport of APs in the environment. In a following study, the air–sea exchange fluxes of NP and *tert*-OP in coastal areas of the North Sea were investigated. NP and *tert*-OP were detected in the vapor phase of the air sampled at the NE German coast and levels decreased 3–5 times towards the open sea. Atmospheric particulate matter of 10 μm (PM10), collected with active air samplers, can also be used to determine the

occurrence of APs in air. In Thessaloniki, Greece, APs were determined in PM10 in 2 sites, an urban-traffic (1 000 000 inhabitants) site and an industrial site with oil refining, petrochemical, fertilizer and cement production, metal smelting and scrap metal incineration. 24-h sampling collecting was used and mean concentrations of 20–117 ng/m³ of PM10 in urban-traffic site were detected and 32–237 ng/m³ in the industrial site. In the urban site, *tert*-OP was detected from 0.01 to 0.12 ng/m³ and NP from 1.6 to 16.5 µg/m³. In the industrial site, OP ranged from bdl to 0.02 and NP ranged from 2.5 to 10.9 ng/m³. The levels of APs encountered in the airborne particulates were attributed to wastewater discharges, aeration of sewage tanks, and water-air exchange from polluted surface waters and no differences were observed between urban and industrial sites [84].

Not surprisingly, APs have also been identified as indoor air pollutants. APs, among another 89 contaminants, were the main contaminants detected in indoor air and dust from 120 homes from Cape Cod (USA). 24-h indoor air sampling of <5 µm and vapor phase materials were collected using a quiet indoor flow-controlled model SP280 pump. 4-NP was detected in 100% of the houses at median concentration of 110 ng/m³, followed by 4-*tert*-butylphenol with mean concentration of 16 ng/m³. Other APs, such as 4,4'-methylenediphenol and 4-phenylphenol, were sporadically detected [85]. In dust, median concentrations were generally lower, but 4-cumylphenol was also detected in three homes. Most of these contaminants originated in household products and materials and their concentrations are higher than in outdoor ambient air.

19.3.3 Soil/Sediments

APs can be adsorbed and accumulated on sediments and soils because of their high surface area and surface activity. It is generally believed that accumulation increases with high total organic content (TOC) of soil, and sandy soils or organic depleted soils or sediments will have decreased levels of APs.

Soils can be contaminated through atmospheric wet and dry deposition. On the other hand, many agricultural soils receive the impact of sludge-amending agronomic practices where APs accumulated in sludge are introduced to the soil. The presence of APs in soils can have negative implications as APs can exert estrogenic effects on soil organisms and, when concentrations are high, APs accumulated in soil can leach to groundwater [86]. The analysis of APs in soil requires effective, selective and sensitive analytical methodologies, capable of eliminating co-extracted interferences. Hildebrandt *et al.* [87] used accelerated solvent extraction to determine the presence of APs in agricultural soils and detected 4-NP at levels up to 33.9 µg/kg, attributed to pesticide applications. Padilla-Sánchez *et al.* [88] developed a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) method for the determination of APs, among other compounds, in agricultural soils from the Almeria province (south Spain). The method proved highly efficient and superior to PLE, Soxhlet, ultrasonic assisted extraction and polytron solid-liquid extraction methods. The LODs for 4-*tert*-OP and 4-NP were 0.1 and 1 µg/kg with recoveries close to 100%. 4-*tert*-OP was the only detected AP, and chlorophenols were the most commonly identified compounds [88].

Sediments can be considered as a sink for APs. River sediments receive the impact of WWTP effluents as well as discharges from industrial, agricultural or urban activities [89]. On the other hand, runoff, controlled discharges such as submarine emissaries, uncontrolled spills, or river effluents can be the source of APs to coastal areas [70]. At the same time, sediments can be a source of APs to water through remobilization and transport. Sediments

can also provide historical data for contaminant loads, through careful slicing and dating. Therefore, there is much interest in evaluating the levels of APs in sediments, in an attempt to control the impact of contaminants in a given area and eventually evaluate the time and spatial trends. APs were analyzed in sediments from South Korea using direct extraction from an acid-digested suspension and GC-MS, which permitted efficient recovery of OP and NP and a LOD of 1.8 and 2.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for 4-n-OP and NP [90]. Using this method, sediments from the Han river flowing through an urban area, Lake Shihwa surrounded by an industrial area, and a contaminated coastal area of Masan Bay, in South Korea, contained 6.2–9.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of *tert*-OP and from 134 to 1750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of NP, Lake Shihwa being the most contaminated site [90]. A monitoring survey carried out in the wet and dry seasons during 2008 revealed the presence of 4-*tert*-OP, 4-NP and other EDCs in water and sediments from 15 sites from the upper reach to the lower reach of the Yellow River, China. Sampled sites include industrial, rural, agricultural, mining and urban areas, as well as sites with very dry land. The measured concentrations of most target compounds in water during the dry season were higher than in the wet season. 4-NP was the main detected compound, with water concentrations ranging from 0.165 to 1.187 $\mu\text{g}/\text{L}$ and sediment concentrations from 25.5 to 46.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in May (wet season) and from 0.442 to 1.172 $\mu\text{g}/\text{L}$ in water and 16.6–203.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in sediment in November (dry season). 4-*tert*-OP was found at 0.0024–0.0145 $\mu\text{g}/\text{L}$ in water and from nd to 2.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in sediments [91]. The presence of these compounds was attributed to sewage effluents containing estrogenic compounds passing into the river system. Similar concentrations were found in surface sediments collected in 2010 from the Anzali wetland, in Iran, which contained 4-NP at 0.23–6.52 $\mu\text{g}/\text{g}$ dw and OP at 0.3–1.87 $\mu\text{g}/\text{g}$ dw, attributed to urban runoff and sewage outfalls [92]. OP and NP were detected in Pearl River Delta sediments at <1–463 ng/g dw and 31–21 885 ng/g dw, respectively, some of the highest levels in the world. The high urbanization of this area accounts for the main inputs of APs to the Pearl River Delta [93]. Good correlation was observed between AP levels and total organic carbon (TOC), indicating that these compounds are mainly associated with organic-rich sediment and hardly degraded once accumulated [93]. This has been experimentally demonstrated by modeling the adsorption of NP and OP in river sediment from the Ebro (NE Spain), according to adsorption kinetics [94].

19.3.4 Biota

APs comprise a set of compounds with octanol/water partition coefficients (K_{ow}) from 2.72 to 7.10. The highest lipophilic compounds can be accumulated in biota through adsorption. However, once introduced into the body, APs can be metabolized and they are eliminated from the body by conjugation and excretion. It is still controversial whether APs are bioaccumulated and biomagnified, and basically it depends on whether the inputs are higher than the elimination capacity of a given organism. In addition to that, the toxic effects are related to the concentration levels and to the K_{ow} values. McLeese *et al.* [58] studied the lethality and accumulation of *o*-*sec*-butylphenol, butylphenols, 4-*tert*-OP and 4-dodecylphenol in aquatic fauna. It was found that the lethal thresholds decreased with increasing K_{ow} while bioconcentration factors increased with K_{ow} , ranging from 37 for butylphenol to 6000 for dodecylphenol.

As for the other environmental matrices, OP and NP are the APs generally studied in organisms [95,96] two different fish species, the four-spotted megrim (*Lepidorhombus boscii*) and the pouting (*Trisopterus luscus*) collected along the Northern Iberian coast.

When determining the uptake and tissue distribution of C4–C7 APs in Atlantic cod (*Gadus morhua*) it was found that labeled 4-*tert*-butylphenol, 4-*n*-pentylphenol, 4-*n*-hexylphenol and 4-*n*-heptylphenol administered via spiked seawater were readily uptaken, whereas uptake via feed was less efficient [97]. It was also observed that AP residues were mainly located in the bile fluids, as well as in the intestine and stomach content, while the liver concentration, muscle, spleen, heart, kidney, brain and gonads was very low, indicating a rapid excretion and the liver-bile axis was identified as the major route of elimination. The half-life of the four APs was in the range 10–20 h. That study proposed the analysis of APs in bile fluid to determine the exposure and accumulation of APs to feral fish in proximity to oil production facilities [95–97].

19.4 Risks and Effects of Alkylphenols and their Transformation Products in the Environment

19.4.1 Toxicological Effects

Toxicological information on AP TPs is extensive but mainly focused on estrogenic and/or mammalian effects. The most abundant and studied compound is 4-NP. For the sake of clarity we will first focus on the NP family that share many toxicological characteristics with other products such as OPs. Many studies have addressed the toxicity of NP and there is a general consensus among regulators that NP is estrogenic and hence should be banned. Nevertheless, according to the popular phrase “dilution is the solution” it is a key issue to establish the environmental concentration that may cause detrimental effects. NP is metabolized in the liver, with the majority of the metabolites excreted in bile, mainly as glucuronide conjugates. However, extraction of fecal samples revealed that the feces mainly contained NP itself [98,99].

NP is considered a weak xeno-estrogen that is 10^3 – 10^6 less potent than 17- β -estradiol [100]. This means that it has the potential to be estrogenic but at high concentrations. Thus, it is not surprising to find that in rats NP impaired first and second generation reproductive traits in males at doses of 150 mg/kg/d, which are quite high compared to those of 17- β -estradiol (0.1 mg/kg/d) [101–103]. In the above-mentioned studies systemic toxicity, however, occurred at lower doses (15 mg/kg/d), which also indicates that probably the dominant mode of action of NP to mammals, and ultimately to humans, is systemic and not estrogenic.

Environmental health effects of NP in non-mammalian species have also been extensively studied in the aquatic environment. Like most APs, NPs are relatively soluble in water and are present in surface waters at quite high concentrations when compared with other pollutants. Concentrations of NP of 4.35 μ g/L have been measured in some coastal areas and Mediterranean rivers [104,105]. Fish should also be susceptible to estrogenic effects of NP. There is experimental evidence that NP may cause estrogenic related effects (increase plasma/live vitellogenin levels in males, impair male reproduction, alter sex characteristics and mating behavior) on fish between 10 and 100 μ g/L in long term exposures, but there is also evidence that NP impair non-estrogenic endpoints, such as growth and reproduction of fish in the same range (Table 19.3). Thus again, it is not clear in the above reported studies if NP effects are systemic or truly estrogenic. Indeed, new evidence indicates that NP may interact with the lipidogenic pathways and act as an obesogen [106].

Transformation Products of Alkylphenols 599

Table 19.3 Long-term toxicity data for fish.

Species	Compound	Test conditions	Exposure Period (d)	Endpoint	NOEC (µg/L)	LOEC (µg/L)	Reference
<i>Gobiocypris rarus</i> , paired sexually mature adult	4-NP	Flow-through, equivalent or similar to OECD 229	21	Adult mortality Fertility Reproduction	>20 >20 >20		107
<i>Lepomis macrochirus</i> , 10–12 w old	4-NP	Flow-through, ASTM 190	28	Mortality	59.5	126	108
<i>Oncorhynchus mykiss</i> , 30 d old	4-NP	Flow-through, ASTM	91	Growth	6	10.3	108
<i>Oncorhynchus mykiss</i> , embryos, adults	Technical NP	Flow-through		Hatching rate, Vit males, sex ratios	1	10	109
<i>Oryzias latipes</i> , 5–8 d old	4-NP	Flow-through, equivalent or similar to EPA	28	Mortality Growth	>1.9 >1.9		110
<i>Oryzias latipes</i> , paired sexually mature adult	4-NP	Flow-through, equivalent or similar to OECD 229	21	Fertility (and fecundity)	50.9	101	79
<i>Oryzias latipes</i> , started with fertilized eggs/embryos	4-NP	Semi-static, renewal of test water every 48 h	100	Mixed secondary sex characteristics Induction of testis-ova Sex ratio/phenotype	2.9 8.7 >29	8.7 29	111
<i>Pimephales promelas</i> , 30 d old	4-NP	Flow-through, ASTM 1993	28	Growth Mortality	38 77.5	77.5 193	112
<i>Pimephales promelas</i> , embryos <24 hrs old	4-NP, branched	Flow-through,	33	Survival	7.4	14	113

In river locations downstream discharges of effluents from WWTPs located near Barcelona city, *in vitro* estrogenic tests have identified NP as the most estrogenic compound present in surface waters [114,115]. This result contradicts those reported earlier in wastewater effluents from England [116] that found that estrogenic effects on reaches downstream of WWTP effluents were caused by steroid hormones like estradiol. The above-mentioned discrepancies, however, could be explained by the fact that in most cases Spanish treatment plants have tertiary treatments that remove hormones whereas those in the UK do not. These results have also been extrapolated in the field in the Llobregat river (NE, Spain) where the authors reported high levels of vitellogenin in males collected after waste water plant effluent discharges [117]. Nevertheless, again, it is difficult to establish a close link between an *in vitro* test and *in vivo* responses due to the co-existence in the field of many chemicals that also can be estrogenic. A piece of evidence that may support the weakness of the estrogenic arguments in fish is the fact that today despite NP being still present in high amounts in certain parts of rivers within Spain there are no clear reported effects in fish [118].

In aquatic invertebrates, NP appears to be quite toxic to small crustaceans at around 10 µg/L (Table 19.4). The mechanism of action of NP to aquatic invertebrates is unclear. According to Barata *et al.* [119], most studies that have reported endocrine disruption effects of NP to aquatic invertebrates misinterpreted the results, since observed inhibitory effects on growth and reproduction could be associated with feeding impairment, which is a general toxicity mechanism quite common across pollutants. Nevertheless, there is experimental data that indicate that NP at high exposure levels (>100 µg/L) may affect the metabolism of ecdysteroids, impairing embryo survival [120]. Recently, Campos *et al.* [121] showed that NP also increases reproduction in *Daphnia magna* at lower concentrations 10–40 µg/L, an effect that can also be related to endocrine disruption of ecdysteroids.

19.4.2 Risk Assessment

Risk is broadly defined as the combination (i.e., product) of a probability of occurrence of some event by its associated hazard effects:

$$\text{Risk} = \text{Occurrence} \times \text{Hazard effects}$$

Correspondingly, the risk assessment (RA) process may be defined as a set of procedures aiming to identify hazards and to quantify the associated risk (in our case, related to chemicals) concerning human health and/or ecosystems impairment.

In the case of the environmental risk posed by chemicals, “hazard effects” are related to the intrinsic properties of each compound, whereas “occurrence” is associated with its environmental exposure, usually expressed in terms of environmental concentration.

Different RA approaches have been developed in order to identify and rank compounds of environmental concern for both regulatory and monitoring purposes [127,128]. Whereas most of the existing schemes share the basic underlying RA paradigm, they basically differ in how both factors, that is, occurrence and effects, are defined and hence quantified.

Environmental risks caused by certain contaminants to aquatic organisms can be estimated using hazard quotient indexes (*HQ*, Equation 19.14) associated to the most representative pollutants found in a particular water mass. For substances with limited toxicological information, predicted no effect concentrations (PNEC) can be estimated using just a few chronic no effect concentrations (NOEC) or acute lethal doses (LC50), considering application

Transformation Products of Alkylphenols 601

Table 19.4 Long-term toxicity data for aquatic invertebrates.

Species	Compound	Test conditions	Nominal/ Measured	Exposure period (d)	Endpoint	NOEC (µg/L)	LOEC (µg/L)	Reference
<i>Caenorhabditis elegans</i> , juveniles	NP	Static, ISO10872:2010	Ma	3	Mortality	>235		122
					Growth	>235		
					Reproduction	>235		
<i>Chironomus tentans</i> , first instar	NPI	Flow-through, equivalent or similar to OECD 219	Ma	20	Mortality	42	91	123
<i>Daphnia magna</i> , <24 h	4-NP	Semi-static, ASTM 1991	Ma	21	Mortality	116	215	112
					Reproduction	116	215	
<i>Daphnia magna</i> , <24 h	NP	Semi-static, OECD 202	Ma	21	Reproduction	24		124
					Growth	39		
					Mortality	130		
<i>Americamysis bahia</i> , 24 h	4-NP	Flow-through, ASTM 1990	Ma	28	Reproduction	9.5		125
					Mortality	27.6		
<i>Mysidopsis bahia</i> , <24 h	NP	Static	M	28	Length	3.9	6.7	113
<i>Tisbe batagliai</i> , <24 h	4-NP	Semi-static	Ma	53	Mortality	20		126

Ma = arithmetical mean.

factors (FA) ranging from 10 to 1000. For known substances most accurate PNEC estimation can be obtained from large data sets using species sensitivity distributions (SSD) of NOEC [129]. In this chapter, PNECs were estimated considering SSD using no FA, according to Equation 19.15. Toxicological information on lethal and reproduction effects was obtained from the ECOTOX (EPA) database. Although the selection of a single endpoint (i.e., NOEC for reproduction) is preferred, there were no reproduction data for many tested species and $\text{NOEC}_{\text{reproduction}}$ endpoints were not necessarily lower than lethality ones (i.e., LC50), thus both endpoint types were used.

$$\text{HQ} = \frac{C_i}{\text{PNEC}_i} \quad (19.14)$$

$$\text{PNEC}_i = \frac{\text{ENDPOINT}_i}{\text{FA}} \quad (19.15)$$

Were C_i and PNEC are the measured concentration and PNEC of contaminant i .

The scarcity of toxicological information on other degradation products of APs makes it difficult to provide a reliable toxicological analysis of products other than NP. An example of such a data gap is shown in Figure 19.3, where reported effect concentrations for NPs and OPs were collected for aquatic species using the EPA ECOTOX data base. For NPs we obtained up to 660 values from aquatic invertebrates, fish and amphibians. For OPs we only got 169 data that only included amphibians and fish. There was no toxicological information for other degradation products of APs. The analysis of NP data, depicted in Figure 19.3, showed a similar range of toxicities among fish and aquatic invertebrates, although the median of the curve for invertebrates was 0.1 mg/L and that for fish and amphibians 1 mg/L. According to Figure 19.3, the concentration effect protecting 5% of the invertebrate

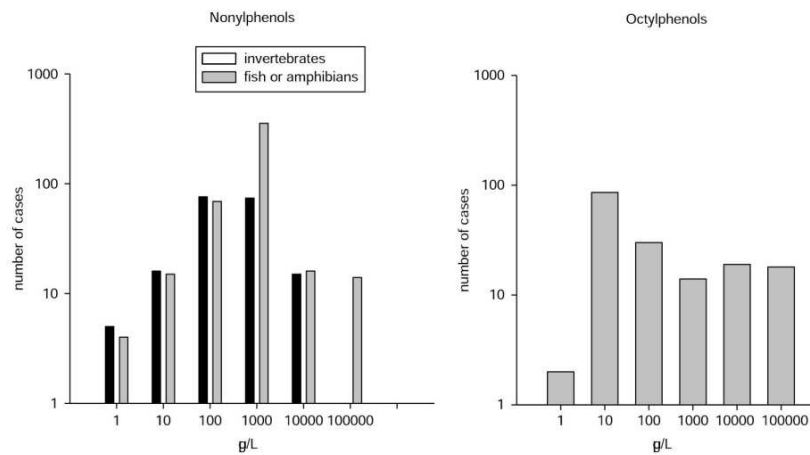


Figure 19.3 Species sensitivity distribution of lethality and reproduction effect concentration endpoints across aquatic invertebrate and vertebrate species for NP and OP.

population-species was $6\ \mu\text{g/L}$ and that of fish $10.3\ \mu\text{g/L}$. This means that despite the observed 10-fold differences in mean sensitivity, PNEC estimated using the SSD concept was equivalent for both aquatic invertebrates and fish. Such PNECs were quite close to the environmental levels found in contaminated areas ($4\text{--}10\ \mu\text{g/L}$) according to [104,105]. Therefore, only NP is probably affecting aquatic ecosystems worldwide. Nevertheless, AP degradation products are usually found in mixtures of two or more analytes in surface waters. According to mixture toxicity concepts, APs if acting by similar modes of action [107], which is a plausible assumption, could add their effect concentrations in a mixture.

Considering the data of OP in Figure 19.3, we can estimate a PNEC of $3.2\ \mu\text{g/L}$ for fish, which means that in a binary mixture $\text{PNEC}_{\text{mixture}}$ would be $1.6\ \mu\text{g/L}$ of OP and $5\ \mu\text{g/L}$ of NP. Toxicological results obtained for several AP products across invertebrates, fish and bacteria (*Vibrio fischerii*) [109,112] indicate that indeed their toxicity is inversely proportional to their $\log K_{\text{ow}}$ and their combined toxicity is additive and predicted by the concentration addition concept. This means that the higher the number of APs measured in an environmental sample, the lower the PNEC for individual mixture constituents. Thus, it is conservative to use a FA of 10 to derive a PNEC for individual AP products, taking into account that other non-measured products can be present. As an example, the initial PNEC of $6\text{--}10\ \mu\text{g/L}$ would be $0.6\text{--}1\ \mu\text{g/L}$ for NP, that is, above environmental levels measured in many locations. In summary, we can state that AP products are likely to affect aquatic organisms rather than mammalian species, including man, and hence their use should be restricted.

19.5 Conclusions

APs comprise a series of phenolic compounds which have been widely used over the last 40 years in the chemical industry and have been classified as “High Production Chemicals”. Because of this ample usage, APs have become widespread environmental contaminants, being detected globally in water, sediments, soils, air and biota. Once in the environment, APs can undergo a series of transformations, such as biodegradation or photodegradation, which renders a series of TPs which are ultimately eliminated or mineralized. These processes have been mainly studied under controlled laboratory conditions, which permit establishment of the degradation kinetics, half-lives, and, if MS techniques are used, identification of the intermediate compounds produced during degradation. This information is of the utmost importance to understand the environmental behavior of APs in the environment and define those processes that affect their fate. Unfortunately, most of the monitoring studies are aimed at determining APs as a TP of ethoxylated APs and survey OP and NP as the final TPs. Thus, it is not surprising then that no TPs of APs have been reported in environmental matrices. This chapter has attempted to give an overview of the TPs of APs, especially of compounds which can be of environmental relevance according to their persistence and toxicity. It provides a list of the processes responsible for the generation of TPs of APs. This information can be useful when monitoring studies on APs are undertaken, since it will allow one to follow the transformation pathways and understand their real impact. In this same direction, there is very little information on the toxicity of the TPs of APs and, therefore, more studies to define toxicological endpoints should be carried out. Finally, it is worth remembering that APs exert endocrine disrupting effects at the μg level and actions are being undertaken to survey their risk in the environment, both from a toxicological and legislative point of view.

Acknowledgments

This work was supported by the Spanish Ministry of Education, Science and Innovation (INNFACTO, IPT-2011-0709-060000).

References

1. Shang, D.Y., Macdonald, R.W., and Ikonomou, M.G. (1999) Persistence of nonylphenol ethoxylate surfactants and their primary degradation products in sediments from near a municipal outfall in the strait of Georgia, British Columbia, Canada. *Environmental Science & Technology*, **33**, 1366–1372.
2. Talmage, S.S. (1994) *Environmental and Human Safety of Major Surfactants: Alcohol Ethoxylates and Alkylphenol Ethoxylates*, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
3. Wheeler, T.F., Heim, J.R., LaTorre, M.R., and Janes, A.B. (1997) Mass spectral characterization of p-nonylphenol isomers using high-resolution capillary GC—MS. *Journal of Chromatographic Science*, **35**, 19–30.
4. Ahel, M., Giger, W., and Koch, M. (1994) Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment - I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Research*, **28**, 1131–1142.
5. Bennie, D.T., Sullivan, C.A., Lee, H.B., and Maguire, R.J. (1998) Alkylphenol polyethoxylate metabolites in Canadian sewage treatment plant waste streams. *Water Quality Research Journal of Canada*, **33**, 231–252.
6. Renner, R. (1997) European bans on surfactant trigger transatlantic debate. *Environmental Science & Technology*, **31**, 316A–320.
7. Dachs, J., Van Ry, D.A., and Eisenreich, S.J. (1999) Occurrence of estrogenic nonylphenols in the urban and coastal atmosphere of the lower Hudson River estuary. *Environmental Science & Technology*, **33**, 2676–2679.
8. Johnson, A.C. and Sumpter, J.P. (2001) Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. *Environmental Science & Technology*, **35**, 4697–4703.
9. Jobling, S., Sumpter, J.P., Sheahan, D. *et al.* (1996) Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry/SETAC*, **15**, 194–202.
10. Harris, C.A., Santos, E.M., Janbakhsh, A. *et al.* (2001) Nonylphenol affects gonadotropin levels in the pituitary gland and plasma of female rainbow trout. *Environmental Science & Technology*, **35**, 2909–2916.
11. OSPAR-Commission (2011) *OSPAR list of chemicals for priority action*.
12. Toyama, T., Maeda, N., Murashita, M. *et al.* (2010) Isolation and characterization of a novel 2-sec-butylphenol-degrading bacterium *Pseudomonas sp.* strain MS-1. *Biodegradation*, **21**, 157–165.
13. Toyama, T., Momotani, N., Ogata, Y. *et al.* (2010) Isolation and characterization of 4-tert-butylphenol-utilizing *spingobium fuliginis* strains from phragmites australis rhizosphere sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**, 6733–6740.
14. USEPA (2009) *Screening-level hazard characterization. Alkylphenols category*.
15. Tanghe, T., Dhooze, W., and Verstraete, W. (2000) Formation of the metabolic intermediate 2,4,4-trimethyl-2-pentanol during incubation of a *Sphingomonas sp.* strain with the xeno-estrogenic octylphenol. *Biodegradation*, **11**, 11–19.
16. Corvini, P.F.X., Vinken, R., Hommes, G. *et al.* (2004) Microbial degradation of a single branched isomer of nonylphenol by *Sphingomonas* TTNP3. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, **50**, 189–194.

Transformation Products of Alkylphenols 605

17. Gabriel, F.L.P., Cyris, M., Jonkers, N. *et al.* (2007) Elucidation of the ipso-substitution mechanism for side-chain cleavage of α -quaternary 4-nonylphenols and 4-*t*-butoxyphenol in *Sphingobium xenophagum* Bayram. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 3320–3326.
18. Gabriel, F.L.P., Giger, W., Guenther, K., and Kohler, H.-P.E. (2005) Differential degradation of nonylphenol isomers by *Sphingomonas xenophaga* Bayram. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 1123–1129.
19. Gabriel, F.L.P., Heidlberger, A., Rentsch, D. *et al.* (2005) A novel metabolic pathway for degradation of 4-nonylphenol environmental contaminants by *Sphingomonas xenophaga* Bayram: ipso-hydroxylation and intramolecular rearrangement. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, 15526–15533.
20. Yuan, S.Y., Yu, C.H., and Chang, B.V. (2004) Biodegradation of nonylphenol in river sediment. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, **127**, 425–430.
21. van der Maarel, M.J.E.C. and Kohler, H.P.E. (1993) Degradation of 2-*sec*-butylphenol: 3-*sec*-butylcatechol, 2-hydroxy-6-oxo-7-methylnona-2,4-dienoic acid, and 2-methylbutyric acid as intermediates. *Biodegradation*, **4**, 81–89.
22. Shibata, A. and Katayama, A. (2007) Anaerobic co-metabolic oxidation of 4-alkylphenols with medium-length or long alkyl chains by *Thauera sp.*, strain R5. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **75**, 1151–1161.
23. Fujii, K., Urano, N., Ushio, H. *et al.* (2000) Profile of a nonylphenol-degrading microflora and its potential for bioremediation applications. *Journal of Biochemistry*, **128**, 909–916.
24. Chang, B.V., Chiang, F., and Yuan, S.Y. (2005) Biodegradation of nonylphenol in sewage sludge. *Chemosphere*, **60**, 1652–1659.
25. Porter, A.W. and Hay, A.G. (2007) Identification of *opdA*, a gene involved in biodegradation of the endocrine disrupter octylphenol. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 7373–7379.
26. Takeo, M., Prabu, S.K., Kitamura, C. *et al.* (2006) Characterization of alkylphenol degradation gene cluster in *Pseudomonas putida* MT4 and evidence of oxidation of alkylphenols and alkylcatechols with medium-length alkyl chain. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **102**, 352–361.
27. Ajithkumar, B., Ajithkumar, V.P., and Iriye, R. (2003) Degradation of 4-*amyl*phenol and 4-*hexyl*phenol by a new activated sludge isolate of *Pseudomonas veronii* and proposal for a new subspecies status. *Research in Microbiology*, **154**, 17–23.
28. Ogata, Y., Toyama, T., Yu, N. *et al.* (2013) Occurrence of 4-*tert*-butylphenol (4-*t*-BP) biodegradation in an aquatic sample caused by the presence of *Spirodela polyrrhiza* and isolation of a 4-*t*-BP-utilizing bacterium. *Biodegradation*, **24**, 192–203.
29. Zhang, Y.L., Zhang, Z.G., Xu, D.G. *et al.* (2006) Biodegradation of 2,6-ditert-butylphenol by immobilized microorganism strains. *Journal of Environmental Sciences*, **18**, 369–372.
30. Zhang, Y.Z., Tang, C.Y., Song, X.F., and Li, F.D. (2009) Behavior and fate of alkylphenols in surface water of the Jialu River, Henan Province, China. *Chemosphere*, **77**, 559–565.
31. Sun, Q., Li, Y., Chou, P.H. *et al.* (2012) Transformation of bisphenol A and alkylphenols by ammonia-oxidizing bacteria through nitration. *Environmental Science & Technology*, **46**, 4442–4448.
32. Shibata, A., Inoue, Y., and Katayama, A. (2006) Aerobic and anaerobic biodegradation of phenol derivatives in various paddy soils. *The Science of the Total Environment*, **367**, 979–987.
33. Shibata, A., Toyota, K., Miyake, K., and Katayama, A. (2007) Anaerobic biodegradation of 4-alkylphenols in a paddy soil microcosm supplemented with nitrate. *Chemosphere*, **68**, 2096–2103.
34. Hesselsoe, M., Jensen, D., Skals, K. *et al.* (2001) Degradation of 4-nonylphenol in homogeneous and nonhomogeneous mixtures of soil and sewage sludge. *Environmental Science & Technology*, **35**, 3695–3700.

35. Mortensen, G.K. and Kure, L.K. (2003) Degradation of nonylphenol in spiked soils and in soils treated with organic waste products. *Environmental Toxicology and Chemistry/SETAC*, **22**, 718–721.
36. Bokern, M., Nimitz, M., and Harms, H.H. (1996) Metabolites of 4-n-nonylphenol in wheat cell suspension cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 1123–1127.
37. Pedersen, R.T. and Hill, E.M. (2000) Identification of novel metabolites of the xenoestrogen 4-*tert*-octylphenol in primary rat hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*, **128**, 189–209.
38. Hoffmann, M.R., Martin, S.T., Choi, W., and Bahnemann, D.W. (1995) Environmental applications of semiconductor photocatalysis. *Chemical Reviews*, **95**, 69–96.
39. Tanizaki, T., Kadokami, K., and Shinohara, R. (2002) Catalytic photodegradation of endocrine disrupting chemicals using titanium dioxide photoconductor thin films. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **68**, 732–739.
40. Kusvuran, E., Samil, A., Atanur, O.M., and Erbatur, O. (2005) Photocatalytic degradation kinetics of di- and tri-substituted phenolic compounds in aqueous solution by TiO₂/UV. *Applied Catalysis*, **58**, 211–216.
41. Davezza, M., Fabbri, D., Prevot, A.B., and Pramauro, E. (2011) Removal of alkylphenols from polluted sites using surfactant-assisted soil washing and photocatalysis. *Environmental Science and Pollution Research*, **18**, 783–789.
42. Justicia, I., Garcia, G., Vázquez, L. *et al.* (2005) Self-doped titanium oxide thin films for efficient visible light photocatalysis: An example: Nonylphenol photodegradation. *Sensors and Actuators B-Chemical*, **109**, 52–56.
43. Ardizzone, S., Cappelletti, G., Meroni, D., and Spadavecchia, F. (2011) Tailored TiO₂ layers for the photocatalytic ozonation of cumylphenol, a refractory pollutant exerting hormonal activity. *Chemical Communications*, **47**, 2640–2642.
44. Wu, Y., Yuan, H., Jiang, X. *et al.* (2012) Photocatalytic degradation of 4-*tert*-octylphenol in a spiral photoreactor system. *Journal of Environmental Sciences*, **24**, 1679–1685.
45. Kohtani, S., Makino, S., Kudo, A. *et al.* (2002) Photocatalytic degradation of 4-n-nonylphenol under irradiation from solar simulator: Comparison between BiVO₄ and TiO₂ photocatalysts. *Chemistry Letters*, 660–661.
46. Kohtani, S., Koshiko, M., Kudo, A. *et al.* (2003) Photodegradation of 4-alkylphenols using BiVO₄ photocatalyst under irradiation with visible light from a solar simulator. *Applied Catalysis*, **46**, 573–586.
47. Kohtani, S., Hiro, J., Yamamoto, N. *et al.* (2005) Adsorptive and photocatalytic properties of Ag-loaded BiVO₄ on the degradation of 4-n-alkylphenols under visible light irradiation. *Catalysis Communications*, **6**, 185–189.
48. Babaei, A.A., Mesdaghinia, A.R., Haghghi, N.J. *et al.* (2011) Modeling of nonylphenol degradation by photo-nanocatalytic process via multivariate approach. *Journal of Hazardous Materials*, **185**, 1273–1279.
49. Faust, B.C. and Hoigné, J. (1990) Photolysis of Fe (III)-hydroxy complexes as sources of OH radicals in clouds, fog and rain. *Atmospheric Environment*, **24**, 79–89.
50. Brand, N., Maillhot, G., Sarakha, M., and Bolte, M. (2000) Primary mechanism in the degradation of 4-octylphenol photoinduced by Fe(III) in water-acetonitrile solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology A*, **135**, 221–228.
51. Neamțu, M. and Frimmel, F.H. (2006) Photodegradation of endocrine disrupting chemical nonylphenol by simulated solar UV-irradiation. *The Science of the Total Environment*, **369**, 295–306.
52. Xu, Y., Nguyen, T.V., Reinhard, M., and Gin, K.Y.H. (2011) Photodegradation kinetics of p-*tert*-octylphenol, 4-*tert*-octylphenoxy-acetic acid and ibuprofen under simulated solar conditions in surface water. *Chemosphere*, **85**, 790–796.
53. Chen, L., Zhou, H.-y., and Deng, Q.-y. (2007) Photolysis of nonylphenol ethoxylates: The determination of the degradation kinetics and the intermediate products. *Chemosphere*, **68**, 354–359.

Transformation Products of Alkylphenols 607

54. Bledzka, D., Gmurek, M., Gryglik, M. *et al.* (2010) Photodegradation and advanced oxidation of endocrine disruptors in aqueous solutions. *Catalysis Today*, **151**, 125–130.
55. Chiha, M., Hamdaoui, O., Baup, S., and Gondrexon, N. (2011) Sonolytic degradation of endocrine disrupting chemical 4-cumylphenol in water. *Ultrason Sonochem*, **18**, 943–950.
56. Yim, B., Yoo, Y., and Maeda, Y. (2003) Sonolysis of alkylphenols in aqueous solution with Fe(II) and Fe(III). *Chemosphere*, **50**, 1015–1023.
57. Vallejo, A., Usobiaga, A., Ortiz-Zarragoitia, M. *et al.* (2010) Focused ultrasound-assisted acceleration of enzymatic hydrolysis of alkylphenols and 17 β -oestradiol glucuronide in fish bile. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **398**, 2307–2314.
58. McLeese, D.W., Zitko, V., and Sergeant, D.B. (1981) Lethality and accumulation of alkylphenols in aquatic fauna. *Chemosphere*, **10**, 723–730.
59. Blackburn, M.A. and Waldock, M.J. (1995) Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales. *Water Research*, **29**, 1623–1629.
60. Matthiessen, P. and Law, R.J. (2002) Contaminants and their effects on estuarine and coastal organisms in the United Kingdom in the late twentieth century. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, **120**, 739–757.
61. Fenet, H., Gomez, E., Pillon, A. *et al.* (2003) Estrogenic activity in water and sediments of a French river: Contribution of alkylphenols. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **44**, 1–6.
62. Baugros, J.B., Giroud, B., Dessalces, G. *et al.* (2008) Multiresidue analytical methods for the ultra-trace quantification of 33 priority substances present in the list of REACH in real water samples. *Analytica Chimica Acta*, **607**, 191–203.
63. Tsuda, T., Takino, A., Kojima, M. *et al.* (2000) 4-nonylphenols and 4-*tert*-octylphenol in water and fish from rivers flowing into Lake Biwa. *Chemosphere*, **41**, 757–762.
64. Kawaguchi, M., Sakui, N., Okanouchi, N. *et al.* (2005) Stir bar sorptive extraction and trace analysis of alkylphenols in water samples by thermal desorption with in tube silylation and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1062**, 23–29.
65. Chen, W.L., Wang, G.S., Gwo, J.C., and Chen, C.Y. (2012) Ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of feminizing chemicals in river water, sediment and tissue pretreated using disk-type solid-phase extraction and matrix solid-phase dispersion. *Talanta*, **89**, 237–245.
66. Cruceru, I., Florescu, A., Badea, I.A., and Vladescu, L. (2012) Determination of three alkylphenol isomers in various water samples using a new HPLC method based on a duet stationary phase. *Environmental Monitoring and Assessment*, **184**, 6061–6070.
67. Zgola-Grzeškowiak, A. and Grzeškowiak, T. (2011) Determination of alkylphenols and their short-chained ethoxylates in polish river waters. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **91**, 576–584.
68. Inoue, K., Yoshie, Y., Kondo, S. *et al.* (2002) Determination of phenolic xenoestrogens in water by liquid chromatography with coulometric-array detection. *Journal of Chromatography A*, **946**, 291–294.
69. Boitsov, S., Mjøs, S.A., and Meier, S. (2007) Identification of estrogen-like alkylphenols in produced water from offshore oil installations. *Marine Environmental Research*, **64**, 651–665.
70. Sánchez-Avila, J., Tauler, R., and Lacorte, S. (2012) Organic micropollutants in coastal waters from NW Mediterranean Sea: Sources distribution and potential risk. *Environment International*, **46**, 50–62.
71. Arditoglou, A. and Voutsas, D. (2012) Occurrence and partitioning of endocrine-disrupting compounds in the marine environment of Thermaikos Gulf, Northern Aegean Sea, Greece. *Marine Pollution Bulletin*, **64**, 2443–2452.
72. Fries, E. and Pittmann, W. (2004) Occurrence of 4-Nonylphenol in rain and snow. *Atmospheric Environment*, **38**, 2013–2016.

608 Transformation Products of Emerging Contaminants in the Environment

73. Céspedes, R., Lacorte, S., Ginebreda, A., and Barceló, D. (2006) Chemical monitoring and occurrence of alkylphenols, alkylphenol ethoxylates, alcohol ethoxylates, phthalates and benzothiazoles in sewage treatment plants and receiving waters along the ter River basin (Catalonia, N. E. Spain). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **385**, 992–1000.
74. Fernández-Sanjuan, M., Rigol, A., Sahuquillo, A. *et al.* (2009) Determination of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in sewage sludge: Effect of sample pre-treatment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **394**, 1525–1533.
75. Espejo, R., Valter, K., Simona, M. *et al.* (2002) Determination of nineteen 4-alkylphenol endocrine disrupters in Geneva municipal sewage wastewater. *Journal of Chromatography A*, **976**, 335–343.
76. Planas, C., Guadayol, J.M., Droguet, M. *et al.* (2002) Degradation of polyethoxylated nonylphenols in a sewage treatment plant. Quantitative analysis by isotopic dilution-HRGC/MS. *Water Research*, **36**, 982–988.
77. Ballesteros, O., Zafra, A., Navalón, A., and Vilchez, J.L. (2006) Sensitive gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of phthalate esters, alkylphenols, bisphenol A and their chlorinated derivatives in wastewater samples. *Journal of Chromatography A*, **1121**, 154–162.
78. Tan, B.L.L., Hawker, D.W., Müller, J.F. *et al.* (2008) Stir bar sorptive extraction and trace analysis of selected endocrine disruptors in water, biosolids and sludge samples by thermal desorption with gas chromatography-mass spectrometry. *Water Research*, **42**, 404–412.
79. Ko, E.J., Kim, K.W., Kang, S.Y. *et al.* (2007) Monitoring of environmental phenolic endocrine disrupting compounds in treatment effluents and river waters, Korea. *Talanta*, **73**, 674–683.
80. Van Ry, D.A., Dachs, J., Gigliotti, C.L. *et al.* (2000) Atmospheric seasonal trends and environmental fate of alkylphenols in the lower Hudson River Estuary. *Environmental Science & Technology*, **34**, 2410–2417.
81. Berkner, S., Streck, G., and Herrmann, R. (2004) Development and validation of a method for determination of trace levels of alkylphenols and bisphenol A in atmospheric samples. *Chemosphere*, **54**, 575–584.
82. Cincinelli, A., Mandorlo, S., Dickhut, R.M., and Lepri, L. (2003) Particulate organic compounds in the atmosphere surrounding an industrialised area of Prato (Italy). *Atmospheric Environment*, **37**, 3125–3133.
83. Xie, Z., Selzer, J., Ebinghaus, R. *et al.* (2006) Development and validation of a method for the determination of trace alkylphenols and phthalates in the atmosphere. *Analytica Chimica Acta*, **565**, 198–207.
84. Salapatsidou, M., Samara, C., and Voutsas, D. (2011) Endocrine disrupting compounds in the atmosphere of the urban area of Thessaloniki, Greece. *Atmospheric Environment*, **45**, 3720–3729.
85. Rudel, R.A., Camann, D.E., Spengler, J.D. *et al.* (2003) Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust. *Environmental Science & Technology*, **37**, 4543–4553.
86. Bono-Blay, F., Guart, A., de la Fuente, B. *et al.* (2012) Survey of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and herbicides in Spanish source waters intended for bottling. *Environmental Science and Pollution Research*, **19**, 3339–3349.
87. Hildebrandt, A., Lacorte, S., and Barceló, D. (2009) Occurrence and Fate of Organochlorinated Pesticides and PAH in Agricultural Soils from the Ebro River Basin. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **57**, 247–255.
88. Padilla-Sánchez, J.A., Plaza-Bolaños, P., Romero-González, R. *et al.* (2010) Application of a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe-based method for the simultaneous extraction of chlorophenols, alkylphenols, nitrophenols and cresols in agricultural soils, analyzed by using gas chromatography-triple quadrupole-mass spectrometry/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1217**, 5724–5731.

89. Navarro-Ortega, A., Tauler, R., Lacorte, S., and Barceló, D. (2010) Occurrence and transport of PAHs, pesticides and alkylphenols in sediment samples along the Ebro River Basin. *Journal of Hydrology*, **383**, 5–17.
90. Li, D., Oh, J.R., and Park, J. (2003) Direct extraction of alkylphenols, chlorophenols and bisphenol A from acid-digested sediment suspension for simultaneous gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *Journal of Chromatography, A*, **1012**, 207–214.
91. Wang, L., Ying, G.G., Chen, F. *et al.* (2012) Monitoring of selected estrogenic compounds and estrogenic activity in surface water and sediment of the Yellow River in China using combined chemical and biological tools. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, **165**, 241–249.
92. Mortazavi, S., Riyahi Bakhtiari, A., Sari, A.E. *et al.* (2012) Phenolic endocrine disrupting chemicals (EDCs) in Anzali Wetland, Iran: Elevated concentrations of 4-nonylphenol, octylphenol and bisphenol A. *Marine Pollution Bulletin*, **64**, 1067–1073.
93. Gong, J., Xu, L., Yang, Y. *et al.* (2011) Sequential ASE extraction of alkylphenols from sediments: Occurrence and environmental implications. *Journal of Hazardous Materials*, **192**, 643–650.
94. Navarro, A., Endo, S., Gocht, T. *et al.* (2009) Sorption of alkylphenols on Ebro River sediments: Comparing isotherms with field observations in river water and sediments. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, **157**, 698–703.
95. Fernandes, D., Andreu-Sánchez, O., Bebianno, M.J., and Porte, C. (2008) Assessment of pollution along the Northern Iberian shelf by the combined use of chemical and biochemical markers in two representative fish species. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, **155**, 327–335.
96. Fernandes, D., Zanuy, S., Bebianno, M.J., and Porte, C. (2008) Chemical and biochemical tools to assess pollution exposure in cultured fish. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, **152**, 138–146.
97. Sundt, R.C., Baussant, T., and Beyer, J. (2009) Uptake and tissue distribution of C4-C7 alkylphenols in Atlantic cod (*Gadus morhua*): Relevance for biomonitoring of produced water discharges from oil production. *Marine Pollution Bulletin*, **58**, 72–79.
98. Green, T., Swain, C., Van Miller, J.P., and Joiner, R.L. (2003) Absorption, bioavailability, and metabolism of para-nonylphenol in the rat. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **38**, 43–51.
99. Zalko, D., Costagliola, R., Dorio, C. *et al.* (2003) In vivo metabolic fate of the xeno-estrogen 4-nonylphenol in Wistar rats. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, **31**, 168–178.
100. Routledge, E.J. and Sumpter, J.P. (1997) Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 3280–3288.
101. Chapin, R.E., Delaney, J., Wang, Y. *et al.* (1999) The effects of 4-nonylphenol in rats: A multi-generation reproduction study. *Toxicological Sciences*, **52**, 80–91.
102. Nagao, T., Wada, K., Marumo, H. *et al.* (2001) Reproductive effects of nonylphenol in rats after gavage administration: A two-generation study. *Reproductive Toxicology (Elmsford, NY)*, **15**, 293–315.
103. Tyl, R.W., Myers, C.B., Marr, M.C. *et al.* (2006) Three-generation evaluation of dietary para-nonylphenol in CD (*Sprague-Dawley*) rats. *Toxicological Sciences*, **92**, 295–310.
104. Petrovic, M., Fernández-Alba, A.R., Borrull, F. *et al.* (2002) Occurrence and distribution of non-ionic surfactants, their degradation products, and linear alkylbenzene sulfonates in coastal waters and sediments in Spain. *Environmental Toxicology and Chemistry/SETAC*, **21**, 37–46.
105. Petrovic, M., Solé, M., López de Alda, M.J., and Barceló, D. (2002) Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: Integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. *Environmental Toxicology and Chemistry/SETAC*, **21**, 2146–2156.

610 Transformation Products of Emerging Contaminants in the Environment

106. Hao, C.J., Cheng, X.J., Xia, H.F., and Ma, X. (2012) The endocrine disruptor 4-nonylphenol promotes adipocyte differentiation and induces obesity in mice. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, **30**, 382–394.
107. Barata, C., Fernández-San Juan, M., Feo, M.L. *et al.* (2012) Population growth rate responses of *Ceriodaphnia dubia* to ternary mixtures of specific acting chemicals: Pharmacological versus ecotoxicological modes of action. *Environmental Science & Technology*, **46**, 9663–9672.
108. Baer, K.N., Boeri, R.L., Ward, T.J., and Dixon, D.W. (2002) Aquatic toxicity evaluation of para-methylstyrene. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **53**, 432–438.
109. Gerritsen, A., Van Der Hoeven, N., and Pielaat, A. (1998) The acute toxicity of selected alkylphenols to young and adult *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **39**, 227–232.
110. Zhang, X., Zha, J., and Wang, Z. (2008) Influences of 4-nonylphenol on doublesex- and mab-3-related transcription factor 1 gene expression and vitellogenin mRNA induction of adult rare minnow (*Gobiocypris rarus*). *Environmental Toxicology and Chemistry/SETAC*, **27**, 196–205.
111. Schwaiger, J., Mallow, U., Ferling, H. *et al.* (2002) How estrogenic is nonylphenol? A transgenerational study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a test organism. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, **59**, 177–189.
112. Choi, K., Sweet, L.I., Meier, P.G., and Kim, P.G. (2004) Aquatic toxicity of four alkylphenols (3-tert-butylphenol, 2-isopropylphenol, 3-isopropylphenol, and 4-isopropylphenol) and their binary mixtures to microbes, invertebrates, and fish. *Environmental Toxicology*, **19**, 45–50.
113. Brooke, L.T. (1993) Acute and chronic toxicity of nonylphenol to ten species of aquatic organisms. Environmental Health Laboratory, Lake Superior Research Institute, University of Wisconsin-Superior. Report no.: 68-C1-0034.
114. Céspedes, R., Petrovic, M., Raldúa, D. *et al.* (2004) Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **378**, 697–708.
115. Quirós, L., Céspedes, R., Lacorte, S. *et al.* (2005) Detection and evaluation of endocrine-disrupting activity in water samples from Portuguese rivers. *Environmental Toxicology and Chemistry/SETAC*, **24**, 389–395.
116. Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C. *et al.* (1998) Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environmental Science & Technology*, **32**, 1549–1558.
117. Solé, M., De Aida, M.J.L., Castillo, M. *et al.* (2000) Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from the catalonian area (NE Spain). *Environmental Science & Technology*, **34**, 5076–5083.
118. González, S., López-Roldán, R., and Cortina, J.L. (2012) Presence and biological effects of emerging contaminants in Llobregat River basin: A review. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, **161**, 83–92.
119. Barata, C., Porte, C., and Baird, D.J. (2004) Experimental designs to assess endocrine disrupting effects in invertebrates: A review. *Ecotoxicology (London, England)*, **13**, 511–517.
120. LeBlanc, G.A., Mu, X., and Rider, C.V. (2000) Embryotoxicity of the alkylphenol degradation product 4-nonylphenol to the crustacean *daphnia magna*. *Environmental Health Perspectives*, **108**, 1133–1138.
121. Campos, B., Piña, B., Fernández-Sanjuán, M. *et al.* (2012) Enhanced offspring production in *Daphnia magna* clones exposed to serotonin reuptake inhibitors and 4-nonylphenol. Stage- and food-dependent effects. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, **109**, 100–110.
122. Kwak, H.I., Bae, M.O., Lee, M.H. *et al.* (2001) Effects of nonylphenol, bisphenol A, and their mixture on the viviparous swordtail fish (*Xiphophorus helleri*). *Environmental Toxicology and Chemistry/SETAC*, **20**, 787–795.

Transformation Products of Alkylphenols 611

123. Balch, G. and Metcalfe, C. (2006) Developmental effects in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to nonylphenol ethoxylates and their degradation products. *Chemosphere*, **62**, 1214–1223.
124. Höss, S., Jüttner, I., Traunspurger, W. *et al.* (2002) Enhanced growth and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) in the presence of 4-Nonylphenol. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, **120**, 169–172.
125. Kahl, M.D., Makynen, E.A., Kosian, P.A., and Ankley, G.T. (1997) Toxicity of 4-nonylphenol in a life-cycle test with the midge *Chironomus tentans*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **38**, 155–160.
126. Comber, M.H.I., Williams, T.D., and Stewart, K.M. (1993) The effects of nonylphenol on *Daphnia magna*. *Water Research*, **27**, 273–276.
127. Barata, C., Baird, D.J., and Soares, A.M.V.M. (2002) Determining genetic variability in the distribution of sensitivities to toxic stress among and within field populations of *Daphnia magna*. *Environmental Science & Technology*, **36**, 3045–3049.
128. Ginebreda, S., Barata, C., and Barceló, D. (2012) Risk assessment of pollutants in the Llobregat river basin, in *The Llobregat: The Story of a Polluted Mediterranean River. The Handbook of Environmental Chemistry* (eds S. Sabater, A. Ginebredaand, and D. Barceló), Springer-Verlag, Berlin, p. 265–292.
129. ECHA (2008) *Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R.10: Characterisation of dose [concentration]-response for environment*, European Chemicals Agency.
130. Brooke, L.T. (1993) Accumulation and Lethality for Two Freshwater Fishes (Fathead Minnow and Bluegill) to Nonylphenol. Environmental Health Laboratory, Lake Superior Research Institute, University of Wisconsin-Superior. Report no.: 68-C1-0034.
131. Nimrod, A.C. and Benson, W.H. (1998) Reproduction and development of Japanese medaka following an early life stage exposure to xenoestrogens. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, **44**, 141–156.
132. Kuhn, A., Munns, W.R.Jr., Champlin, D. *et al.* (2001) Evaluation of the efficacy of extrapolation population modeling to predict the dynamics of *Americamysis bahia* populations in the laboratory. *Environmental Toxicology and Chemistry/SETAC*, **20**, 213–221.
133. Ward, T.J., Boeri, R.L., Hogstrand, C. *et al.* (2006) Influence of salinity and organic carbon on the chronic toxicity of silver to mysids (*Americamysis bahia*) and silversides (*Menidia beryllina*). *Environmental Toxicology and Chemistry/SETAC*, **25**, 1809–1816.
134. Bechmann, R.K. (1999) Effect of the endocrine disrupter nonylphenol on the marine copepod *Tisbe battagliai*. *The Science of the Total Environment*, **233**, 33–46.

9. Bibliografia

- Adams, W. J., 1995. *Environ Toxicol Chem.* 14, 1569-74.
- Adeniyi, A. A., Okedeyi, O. O., Yusuf, K. A., 2011. Flame ionization gas chromatographic determination of phthalate esters in water, surface sediments and fish species in the Ogun river catchments, Ketu, Lagos, Nigeria. *Environmental Monitoring and Assessment.* 172, 561-569.
- Alexander, H. C., Dill, D. C., Smith, L. W., Guiney, P. D., Dorn, P., 1988. Bisphenol A: Acute aquatic toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 7, 19-26.
- Andreozzi, R., Raffaele, M., Nicklas, P., 2003. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere.* 50, 1319-1330.
- Babich, M. A., Chen, S.-B., Greene, M. A., Kiss, C. T., Porter, W. K., Smith, T. P., Wind, M. L., Zamula, W. W., 2004. Risk assessment of oral exposure to diisononyl phthalate from children's products. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 40, 151-167.
- Ballesteros-Gómez, A., Rubio, S., Pérez-Bendito, D., 2009. Potential of supramolecular solvents for the extraction of contaminants in liquid foods. *Journal of Chromatography A.* 1216, 530-539.
- Barber, L. B., Loyo-Rosales, J. E., Rice, C. P., Minarik, T. A., Oskouie, A. K., 2015. Endocrine disrupting alkylphenolic chemicals and other contaminants in wastewater treatment plant effluents, urban streams, and fish in the Great Lakes and Upper Mississippi River Regions. *Science of the Total Environment.* 517, 195-206.
- Barbieri, Y., Massad, W. A., Díaz, D. J., Sanz, J., Amat-Guerri, F., García, N. A., 2008. Photodegradation of bisphenol A and related compounds under natural-like conditions in the presence of riboflavin: Kinetics, mechanism and photoproducts. *Chemosphere.* 73, 564-571.
- Bentayeb, K., Batlle, R., Romero, J., Nerín, C., 2007. UPLC-MS as a powerful technique for screening the nonvolatile contaminants in recycled PET. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 388, 1031-1038.
- Bester, K., Theobald, N., Schröder, H. F., 2001. Nonylphenols, nonylphenol-ethoxylates, linear alkylbenzenesulfonates (LAS) and bis (4-chlorophenyl)-sulfone in the German Bight of the North Sea. *Chemosphere.* 45, 817-826.
- Blair, J. D., Ikononou, M. G., Kelly, B. C., Surridge, B., Gobas, F. A. P. C., 2009. Ultra-Trace Determination of Phthalate Ester Metabolites in Seawater, Sediments, and Biota from an Urbanized Marine Inlet by LC/ESI-MS/MS. *Environmental Science & Technology.* 43, 6262-6268.

Bibliografia

- Bocxlaer, J. F. V., Castele, S. R. V., Poucke, C. J. V., Peteghem, C. H. V., 2005. Confirmation of the identity of residues using quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 529, 65-73.
- Bodmeier, R., Paeratakul, O., 1991. Determination of Plasticizers Commonly Used In Pharmaceutical Dosage Forms by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*. 14, 365-375.
- Boleda, M. R., Galceran, M. T., Ventura, F., 2013. Validation and uncertainty estimation of a multiresidue method for pharmaceuticals in surface and treated waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1286, 146-158.
- Bolgar, M., Hubball, J., Groeger, J., Meronek, S., 2008. Handbook for the chemical analysis of plastic and polymer additives. CRC Press Taylor & Francis Group, LLC.
- Bono-Blay, F., Guart, A., de la Fuente, B., Pedemonte, M., Pastor, M. C., Borrell, A., Lacorte, S., 2012. Survey of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and herbicides in Spanish source waters intended for bottling. *Environmental Science and Pollution Research*. 19, 3339-3349.
- Bornehag, C.-G., Sundell, J., Weschler, C. J., Sigsgaard, T., Lundgren, B., Hasselgren, M., Hägerhed-Engman, L., 2004. The Association between Asthma and Allergic Symptoms in Children and Phthalates in House Dust: A Nested Case–Control Study. *Environmental Health Perspectives*. 112, 1393-1397.
- Braunrath, R., Podlipna, D., Padlesak, S., Cichna-Markl, M., 2005. Determination of bisphenol A in canned foods by immunoaffinity chromatography, HPLC, and fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 8911-8917.
- Bringmann, G., Kuehn, R., 1982. *Z Wasser Abwasser Forsch*. 15, 1.
- Brocca, D., Arvin, E., Mosbæk, H., 2002. Identification of organic compounds migrating from polyethylene pipelines into drinking water. *Water Research*. 36, 3675-3680.
- Brossa, L., Marcé, R. M., Borrull, F., Pocurull, E., 2005. Determination of endocrine disruptors in environmental water samples by Stir bar sorptive extraction-liquid desorption - Large volume injection-gas chromatography. *Chromatographia*. 61, 61-65.
- Browne, M. A., Dissanayake, A., Galloway, T. S., Lowe, D. M., Thompson, R. C., 2008. Ingested Microscopic Plastic Translocates to the Circulatory System of the

- Mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environmental Science & Technology*. 42, 5026-5031.
- Cacho, J. I., Campillo, N., Viñas, P., Hernández-Córdoba, M., 2012. Stir bar sorptive extraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry for the determination of bisphenols in canned beverages and filling liquids of canned vegetables. *Journal of Chromatography A*. 1247, 146-153.
- Camilleri, J., Baudot, R., Wiest, L., Vulliet, E., Cren-Olivé, C., Daniele, G., 2015. Multiresidue fully automated online SPE-HPLC-MS/MS method for the quantification of endocrine-disrupting and pharmaceutical compounds at trace level in surface water. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 95, 67-81.
- Campos, B., Piña, B., Fernández-Sanjuán, M., Lacorte, S., Barata, C., 2012. Enhanced offspring production in *Daphnia magna* clones exposed to serotonin reuptake inhibitors and 4-nonylphenol. Stage- and food-dependent effects. *Aquatic Toxicology*. 109, 100-110.
- Cao, X., Kong, Q., Cai, R., Zhu, K., Ye, X., Chen, J., Mo, W., Wang, J., 2014. Solid-phase extraction based on chloromethylated polystyrene magnetic nanospheres followed by gas chromatography with mass spectrometry to determine phthalate esters in beverages. *Journal of Separation Science*. 37, 3677-3683.
- Cao, X. L., 2012. A review recent development on analytical methods for determination of bisphenol a in food and biological samples. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 35, 2795-2829.
- Cao, X. L., Corriveau, J., Popovic, S., 2009. Levels of bisphenol a in canned soft drink products in Canadian markets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57, 1307-1311.
- Capdeville, M. J., Budzinski, H., 2011. Trace-level analysis of organic contaminants in drinking waters and groundwaters. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 30, 586-606.
- Céspedes, R., Lacorte, S., Ginebreda, A., Barceló, D., 2006. Chemical monitoring and occurrence of alkylphenols, alkylphenol ethoxylates, alcohol ethoxylates, phthalates and benzothiazoles in sewage treatment plants and receiving waters along the ter River basin (Catalonia, N. E. Spain). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 385, 992-1000.
- Céspedes, R., Lacorte, S., Raldúa, D., Ginebreda, A., Barceló, D., Piña, B., 2005. Distribution of endocrine disruptors in the Llobregat River basin (Catalonia, NE Spain). *Chemosphere*. 61, 1710-1719.

- Céspedes, R., Petrovic, M., Raldúa, D., Saura, Ú., Piña, B., Lacorte, S., Viana, P., Barceló, D., 2004. Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 378, 697-708.
- Chin, Y.-P., Miller, P. L., Zeng, L., Cawley, K., Weavers, L. K., 2004. Photosensitized Degradation of Bisphenol A by Dissolved Organic Matter†. *Environmental Science & Technology*. 38, 5888-5894.
- Colin, A., Bach, C., Rosin, C., Munoz, J. F., Dauchy, X., 2014. Is drinking water a major route of human exposure to alkylphenol and bisphenol contaminants in France? *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 66, 86-99.
- Cortina-Puig, M., Bolívar-Subirats, G., Barata, C., Lacorte, S., Transformation Products of Alkylphenols. *Transformation Products of Emerging Contaminants in the Environment*. John Wiley and Sons Ltd, 2014, pp. 577-612.
- Crain, D. A., Eriksen, M., Iguchi, T., Jobling, S., Laufer, H., LeBlanc, G. A., Guillette Jr, L. J., 2007. An ecological assessment of bisphenol-A: Evidence from comparative biology. *Reproductive Toxicology*. 24, 225-239.
- Crisp, T. M., Clegg, E. D., Cooper, R. L., Wood, W. P., Anderson, D. G., Baetcke, K. P., Hoffmann, J. L., Morrow, M. S., Rodier, D. J., Schaeffer, J. E., Touart, L. W., Zeeman, M. G., Patel, Y. M., 1998. Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. *Environmental Health Perspectives*. 106, 11-56.
- Cristale, J., García Vázquez, A., Barata, C., Lacorte, S., 2013. Priority and emerging flame retardants in rivers: Occurrence in water and sediment, *Daphnia magna* toxicity and risk assessment. *Environment International*. 59, 232-243.
- Cruceru, I., Iancu, V., Petre, J., Badea, I. A., Vladescu, L., 2012. HPLC-FLD determination of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in surface water samples. *Environmental Monitoring and Assessment*. 184, 2783-2795.
- Cunha, S. C., Almeida, C., Mendes, E., Fernandes, J. O., 2011. Simultaneous determination of bisphenol A and bisphenol B in beverages and powdered infant formula by dispersive liquid-liquid micro-extraction and heart-cutting multidimensional gas chromatography-mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*. 28, 513-526.
- da Silva, J. C. C., Reis Teodoro, J. A., Afonso, R. J. d. C. F., Aquino, S. F., Augusti, R., 2014. Photodegradation of bisphenol A in aqueous medium: Monitoring and identification of by-products by liquid chromatography coupled to high-

- resolution mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 28, 987-994.
- Defoe, D. L., Holcombe, G. W., Hammermeister, D. E., Biesinger, K. E., 1990. Solubility and toxicity of eight phthalate esters to four aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 9, 623-636.
- Deng, P., Xu, Z., Kuang, Y., 2014. Electrochemical determination of bisphenol A in plastic bottled drinking water and canned beverages using a molecularly imprinted chitosan-graphene composite film modified electrode. *Food Chemistry*. 157, 490-497.
- Dévier, M.-H., Le Menach, K., Viglino, L., Di Gioia, L., Lachassagne, P., Budzinski, H., 2013. Ultra-trace analysis of hormones, pharmaceutical substances, alkylphenols and phthalates in two French natural mineral waters. *Science of the Total Environment*. 443, 621-632.
- Domínguez-Morueco, N., González-Alonso, S., Valcárcel, Y., 2014. Phthalate occurrence in rivers and tap water from central Spain. *Science of the Total Environment*. 500, 139-146.
- Dupuis, A., Migeot, V., Cariot, A., Albouy-Llaty, M., Legube, B., Rabouan, S., 2012. Quantification of bisphenol A, 353-nonylphenol and their chlorinated derivatives in drinking water treatment plants. *Environmental Science and Pollution Research*. 19, 4193-4205.
- ECB, 2000. European Chemicals Bureau. IUCLID Dataset. 131-11-3, 51.
- EEA, 2011. European Environment Agency. Hazardous substances in Europe's fresh and marine waters. An overview. EEA Technical report No. 8/2011. Copenhagen.
- Ema, M., Harazono, A., Miyawaki, E., Ogawa, Y., 1996. Characterization of developmental toxicity of mono-n-benzyl phthalate in rats. *Reproductive Toxicology*. 10, 365-372.
- EPA, 2003. Office of Pollution Prevention and Toxics; High Production Volume (HPV) Challenge Program's Robust Summaries and Test Plans.
- Fabig, W., 1988. Determination of the Acute Bacterial Toxicity of Bisphenol A. Dow Europe SA study report.
- Faludi, T., Vasanits-Zsigrai, A., Zárny, G., Molnár-Perl, I., 2015. Identification, quantification and distribution of substituted phenols in the dissolved and suspended phases of water samples by gas chromatography tandem mass

- spectrometry: Derivatization, mass fragmentation and acquisition studies. *Microchemical Journal*. 118, 45-54.
- Fan, Z., Hu, J., An, W., Yang, M., 2013. Detection and occurrence of chlorinated byproducts of bisphenol a, nonylphenol, and estrogens in drinking water of China: Comparison to the parent compounds. *Environmental Science and Technology*. 47, 10841-10850.
- Fawell, J. K., Chipman, J. K., 2001. Potential Endocrine Disrupting Substances from Materials in Contact with Drinking Water. *Water and Environment Journal*. 15, 92-96.
- Fernández-Sanjuan, M., Rigol, A., Sahuquillo, A., Rodríguez-Cruz, S., Lacorte, S., 2009. Determination of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in sewage sludge: effect of sample pre-treatment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 394, 1525-1533.
- Feshin, D. B., Fimushkin, P. V., Brodskii, E. S., Shelepchikov, A. A., Mir-Kadyrova, E. Y., Kalinkevich, G. A., 2012. Determination of bisphenol A in foods as 2,2-bis-(4-(isopropoxycarbonyloxy) phenyl)propane by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*. 67, 460-466.
- Field, E. A., Price, C. J., Sleet, R. B., George, J. D., Marr, M. C., Myers, C. B., Schwetz, B. A., Morrissey, R. E., 1993. Developmental toxicity evaluation of diethyl and dimethyl phthalate in rats. *Teratology*. 48, 33-44.
- Fromme, H., Küchler, T., Otto, T., Pilz, K., Müller, J., Wenzel, A., 2002. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Research*. 36, 1429-1438.
- Furuichi, T., Kannan, K., Giesy, J. P., Masunaga, S., 2004. Contribution of known endocrine disrupting substances to the estrogenic activity in Tama River water samples from Japan using instrumental analysis and in vitro reporter gene assay. *Water Research*. 38, 4491-4501.
- Gallard, H., Leclercq, A., Croué, J.-P., 2004. Chlorination of bisphenol A: kinetics and by-products formation. *Chemosphere*. 56, 465-473.
- Gallart-Ayala, H., Moyano, E., Galceran, M. T., 2011a. Analysis of bisphenols in soft drinks by on-line solid phase extraction fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 683, 227-233.
- Gallart-Ayala, H., Núñez, O., Moyano, E., Galceran, M. T., 2011b. Analysis of UV ink photoinitiators in packaged food by fast liquid chromatography at sub-ambient temperature coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1218, 459-466.

- Gasperi, J., Garnaud, S., Rocher, V., Moilleron, R., 2009. Priority pollutants in surface waters and settleable particles within a densely urbanised area: Case study of Paris (France). *Science of the Total Environment*. 407, 2900-2908.
- Geens, T., Apelbaum, T. Z., Goeyens, L., Neels, H., Covaci, A., 2010. Intake of bisphenol A from canned beverages and foods on the Belgian market. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*. 27, 1627-1637.
- Giger, W., Brunner, P., Schaffner, C., 1984. 4-Nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science*. 225, 623-625.
- González, O., Sans, C., Esplugas, S., 2007. Sulfamethoxazole abatement by photo-Fenton: Toxicity, inhibition and biodegradability assessment of intermediates. *Journal of Hazardous Materials*. 146, 459-464.
- Gorga, M., Petrovic, M., Barceló, D., 2013. Multi-residue analytical method for the determination of endocrine disruptors and related compounds in river and waste water using dual column liquid chromatography switching system coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1295, 57-66.
- Gorrochategui, E., Pérez-Albaladejo, E., Casas, J., Lacorte, S., Porte, C., 2014. Perfluorinated chemicals: Differential toxicity, inhibition of aromatase activity and alteration of cellular lipids in human placental cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 277, 124-130.
- Guart, A., Bono-Blay, F., Borrell, A., Lacorte, S., 2011. Migration of plasticizersphthalates, bisphenol A and alkylphenols from plastic containers and evaluation of risk. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 28, 676-685.
- Guart, A., Bono-Blay, F., Borrell, A., Lacorte, S., 2014a. Effect of bottling and storage on the migration of plastic constituents in Spanish bottled waters. *Food Chemistry*. 156, 73-80.
- Guart, A., Calabuig, I., Lacorte, S., Borrell, A., 2014b. Continental bottled water assessment by stir bar sorptive extraction followed by gas chromatography-tandem mass spectrometry (SBSE-GC-MS/MS). *Environmental Science and Pollution Research*. 21, 2846-2855.
- Guenther, K., Heinke, V., Thiele, B., Kleist, E., Prast, H., Raecker, T., 2002. Endocrine Disrupting Nonylphenols Are Ubiquitous in Food. *Environmental Science & Technology*. 36, 1676-1680.

- Hadjmohammadi, M. R., Fatemi, M. H., Taneh, T., 2011. Coacervative extraction of phthalates from water and their determination by high performance liquid chromatography. *Journal of the Iranian Chemical Society*. 8, 100-106.
- Hata, N., Yuwatini, E., Ando, K., Yamada, M., Kasahara, I., Taguchi, S., 2004. Micro-organic Ion-associate Phase Extraction via in situ Fresh Phase Formation for the Preconcentration and Determination of Di(2-ethylhexyl)phthalate in River Water by HPLC. *Analytical Sciences*. 20, 149-152.
- Hendrics, A. J., Maas-Diepeveen, J. L., Noordsij, A., van der Gaag, M. A., 1994. Monitoring Response of XAD-Concentrated Water in the Rhine Delta: A Major Part of the Toxic Compounds Remains Unidentified. *Water Research*. 28, 581-598.
- Herrero-Hernández, E., Rodríguez-Gonzalo, E., Andrades, M. S., Sánchez-González, S., Carabias-Martínez, R., 2013. Occurrence of phenols and phenoxyacid herbicides in environmental waters using an imprinted polymer as a selective sorbent. *Science of the Total Environment*. 454-455, 299-306.
- Hirai, H., Takada, H., Ogata, Y., Yamashita, R., Mizukawa, K., Saha, M., Kwan, C., Moore, C., Gray, H., Laursen, D., Zettler, E. R., Farrington, J. W., Reddy, C. M., Peacock, E. E., Ward, M. W., 2011. Organic micropollutants in marine plastics debris from the open ocean and remote and urban beaches. *Marine Pollution Bulletin*. 62, 1683-1692.
- Huertas, E., Folch, M., Salgot, M., Gonzalvo, I., Passarell, C., 2006. Constructed wetlands effluent for streamflow augmentation in the Besòs River (Spain). *Desalination*. 188, 141-147.
- Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M. G., Sumpter, J. P., 1995. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environmental Health Perspectives*. 103, 582-587.
- Kawaguchi, M., Inoue, K., Yoshimura, M., Ito, R., Sakui, N., Okanouchi, N., Nakazawa, H., 2004. Determination of bisphenol A in river water and body fluid samples by stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 805, 41-48.
- Kawaguchi, M., Ito, R., Endo, N., Okanouchi, N., Sakui, N., Saito, K., Nakazawa, H., 2006. Liquid phase microextraction with in situ derivatization for measurement of bisphenol A in river water sample by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1110, 1-5.

- Kelley, K. M., Stenson, A. C., Dey, R., Whelton, A. J., 2014. Release of drinking water contaminants and odor impacts caused by green building cross-linked polyethylene (PEX) plumbing systems. *Water Research*. 67, 19-32.
- Khedr, A., 2013. Optimized extraction method for LC-MS determination of bisphenol A, melamine and di(2-ethylhexyl) phthalate in selected soft drinks, syringes, and milk powder. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 930, 98-103.
- Koch, H. M., Preuss, R., Angerer, J., 2006. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure – an update and latest results¹. *International Journal of Andrology*. 29, 155-165.
- Kotnik, K., Kosjek, T., Krajnc, U., Heath, E., 2014. Trace analysis of benzophenone-derived compounds in surface waters and sediments using solid-phase extraction and microwave-Assisted extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 406, 3179-3190.
- Kuch, H. M., Ballschmiter, K., 2001. Determination of Endocrine-Disrupting Phenolic Compounds and Estrogens in Surface and Drinking Water by HRGC-(NCI)-MS in the Picogram per Liter Range. *Environmental Science & Technology*. 35, 3201-3206.
- Kuehn, R., 1989. *Water Research*. 23, 501-10.
- LeBlanc, G. A., 1980. *Bull Environ Contam Toxicol*. 684-691.
- Lee, W., Park, S.-H., Kim, J., Jung, J.-Y., 2014. Occurrence and removal of hazardous chemicals and toxic metals in 27 industrial wastewater treatment plants in Korea. *Desalination and Water Treatment*. 54, 1141-1149.
- Lehmann, K. P., Phillips, S., Sar, M., Foster, P. M. D., Gaido, K. W., 2004. Dose-Dependent Alterations in Gene Expression and Testosterone Synthesis in the Fetal Testes of Male Rats Exposed to Di (n-butyl) phthalate. *Toxicological Sciences*. 81, 60-68.
- Li, J., Zhou, H., Liu, Y. X., Yan, X. Y., Xu, Y. P., Liu, S. M., 2014a. Solid-phase extraction for selective determination of bisphenol A in drinks and fruits by dummy surface molecularly imprinted polymer with direct synthetic method. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*. 31, 1139-1146.
- Li, Y., Yang, C., Ning, J., Yang, Y., 2014b. Cloud point extraction for the determination of bisphenol A, bisphenol AF and tetrabromobisphenol A in river water

- samples by high-performance liquid chromatography. *Analytical Methods*. 6, 3285-3290.
- Li, Y., Zhang, S., Song, C., You, J., 2013. Determination of Bisphenol A and Alkylphenols in Soft Drinks by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Food Analytical Methods*. 6, 1284-1290.
- Liao, C., Kannan, K., 2014. A survey of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from nine cities in China. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*. 31, 319-329.
- Liou, S. H., Yang, G. C. C., Wang, C. L., Chiu, Y. H., 2014. Monitoring of PAEMs and beta-agonists in urine for a small group of experimental subjects and PAEs and beta-agonists in drinking water consumed by the same subjects. *Journal of Hazardous Materials*. 277, 169-179.
- Liu, J. F., Liang, X., Jiang, G. B., Cai, Y. Q., Zhou, Q. X., Liu, G. G., 2003a. Evaluation of an on-line coupled continuous flow liquid membrane extraction and precolumn system as trace enrichment technique by liquid chromatographic determination of bisphenol A. *Talanta*. 60, 1155-1161.
- Liu, J. F., Liang, X., Jiang, G. B., Cai, Y. Q., Zhou, Q. X., Liu, G. G., 2003b. High performance liquid chromatography determination of 4-nonylphenol, 4-tert-octylphenol, and their short ethoxyl chain polyethoxylates in water samples using a microporous membrane liquid-liquid extraction sample pretreatment technique. *Journal of Separation Science*. 26, 823-828.
- Loraine, G. A., Pettigrove, M. E., 2006. Seasonal variations in concentrations of pharmaceuticals and personal care products in drinking water and reclaimed wastewater in Southern California. *Environmental Science and Technology*. 40, 687-695.
- Loyo-Rosales, J. E., Schmitz-Afonso, I., Rice, C. P., Torrents, A., 2003. Analysis of octyl- and nonylphenol and their ethoxylates in water and sediments by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 75, 4811-4817.
- Luo, X., Zhang, F., Ji, S., Yang, B., Liang, X., 2014. Graphene nanoplatelets as a highly efficient solid-phase extraction sorbent for determination of phthalate esters in aqueous solution. *Talanta*. 120, 71-75.
- Lysak, A., Marcinek, J., 1972. Multiple toxic effect of simultaneous action of some chemical substances on fish. *ROCZN.NAUK ROLN.SER.H*. 94, 53-63.

- Maeda, Y., Paul, D. R., 1987. Effect of antiplasticization on gas sorption and transport. I. Polysulfone. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. 25, 957-980.
- Maggioni, S., Balaguer, P., Chiozzotto, C., Benfenati, E., 2013. Screening of endocrine-disrupting phenols, herbicides, steroid estrogens, and estrogenicity in drinking water from the waterworks of 35 Italian cities and from PET-bottled mineral water. *Environmental Science and Pollution Research*. 20, 1649-1660.
- Martín-Vide, J. P., 1999. Restoration of an urban river in Barcelona, Spain. *Environmental Engineering and Policy*. 2, 113-119.
- Martín, V. J., 2014. Consumo de bebidas refrescantes en España. Ministerio Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. 22-35.
- Martine, B., Marie-Jeanne, T., Cendrine, D., Fabrice, A., Marc, C., 2013. Assessment of Adult Human Exposure to Phthalate Esters in the Urban Centre of Paris (France). *Bull Environ Contam Toxicol*. 90, 91-96.
- Matamoros, V., Jover, E., Bayona, J. M., 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.
- Meeker, J. D., Sathyanarayana, S., Swan, S. H., 2009. Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes.
- Micić, V., Hofmann, T., 2009. Occurrence and behaviour of selected hydrophobic alkylphenolic compounds in the Danube River. *Environmental Pollution*. 157, 2759-2768.
- Milinovic, J., Lacorte, S., Rigol, A., Vidal, M., Sorption behaviour of nonylphenol and nonylphenol monoethoxylate in soils. *Chemosphere*.
- Möder, M., Braun, P., Lange, F., Schrader, S., Lorenz, W., 2007. Determination of endocrine disrupting compounds and acidic drugs in water by coupling of derivatization, gas chromatography and negative-chemical ionization mass spectrometry. *Clean - Soil, Air, Water*. 35, 444-451.
- Mohapatra, D. P., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., 2010. Physico-chemical pre-treatment and biotransformation of wastewater and wastewater Sludge – Fate of bisphenol A. *Chemosphere*. 78, 923-941.
- Montsanto, 1980. Ind Chem Co. Ambient Water Quality Criteria Doc.

- Moreira, M., Aquino, S., Coutrim, M., Silva, J., Afonso, R., 2011. Determination of endocrine-disrupting compounds in waters from Rio das Velhas, Brazil, by liquid chromatography/high resolution mass spectrometry (ESI-LC-IT-TOF/MS). *Environmental Technology*. 32, 1409-1417.
- Nakamura, S., Daishima, S., 2004. Simultaneous determination of alkylphenols and bisphenol a in river water by stir bar sorptive extraction with in situ acetylation and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1038, 291-294.
- Navarro, A. E., Hernández, M. E., Bayona, J. M., Morales, L., Ruiz, P., 2011. Removal of selected organic pollutants and coliforms in pilot constructed wetlands in southeastern Mexico. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 91, 680-692.
- Nerín, C., Asensio, E., 2007. Migration of organic compounds from a multilayer plastic–paper material intended for food packaging. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 389, 589-596.
- Nerín, C., Cacho, J., Gancedo, P., 1993. Plasticizers from printing inks in a selection of food packagings and their migration to food. *Food Additives & Contaminants*. 10, 453-460.
- Nerín, C., Philo, M. R., Salafranca, J., Castle, L., 2002. Determination of bisphenol-type contaminants from food packaging materials in aqueous foods by solid-phase microextraction–high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 963, 375-380.
- Niu, Y., Zhang, J., Duan, H., Wu, Y., Shao, B., 2015. Bisphenol A and nonylphenol in foodstuffs: Chinese dietary exposure from the 2007 total diet study and infant health risk from formulas. *Food Chemistry*. 167, 320-325.
- Núñez, O., Moyano, E., Galceran, M. T., 2005. LC–MS/MS analysis of organic toxics in food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 24, 683-703.
- Oh, S. M., Kim, H. R., Park, H. K., Choi, K., Ryu, J., Shin, H. S., Park, J. S., Lee, J. S., Chung, K. H., 2009. Identification of estrogen-like effects and biologically active compounds in river water using bioassays and chemical analysis. *Science of the Total Environment*. 407, 5787-5794.
- Okanouchi, N., Honda, H., Ito, R., Kawaguchi, M., Saito, K., Nakazawa, H., 2008. Determination of benzophenones in river-water samples using drop-based liquid phase microextraction coupled with gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Sciences*. 24, 627-630.

- Olujimi, O. O., Fatoki, O. S., Odendaal, J. P., Daso, A. P., 2012. Chemical monitoring and temporal variation in levels of endocrine disrupting chemicals (priority phenols and phthalate esters) from selected wastewater treatment plant and freshwater systems in Republic of South Africa. *Microchemical Journal*. 101, 11-23.
- Pasquini, L., Munoz, J.-F., Pons, M.-N., Yvon, J., Dauchy, X., France, X., Le, N. D., France-Lanord, C., Görner, T., 2014. Occurrence of eight household micropollutants in urban wastewater and their fate in a wastewater treatment plant. Statistical evaluation. *Science of the Total Environment*. 481, 459-468.
- Peñalver, A., Pocurull, E., Borrull, F., Marcé, R. M., 2001. Comparison of different fibers for the solid-phase microextraction of phthalate esters from water. *Journal of Chromatography A*. 922, 377-384.
- Peng, X., Yu, Y., Tang, C., Tan, J., Huang, Q., Wang, Z., 2008. Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China. *Science of the Total Environment*. 397, 158-166.
- Peng, Z. e., Wu, F., Deng, N., 2006. Photodegradation of bisphenol A in simulated lake water containing algae, humic acid and ferric ions. *Environmental Pollution*. 144, 840-846.
- Pennanen, S., Tuovinen, K., Huuskonen, H., Komulainen, H., 1992. The Development Toxicity of 2-Ethylhexanoic Acid in Wistar Rats. *Toxicological Sciences*. 19, 505-511.
- Petrovic, M., Eljarrat, E., Lopez de Alda, M. J., 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.
- Petrović, M., Gonzalez, S., Barceló, D., 2003. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 22, 685-696.
- Polo, M., Llompart, M., Garcia-Jares, C., Cela, R., 2005. Multivariate optimization of a solid-phase microextraction method for the analysis of phthalate esters in environmental waters. *Journal of Chromatography A*. 1072, 63-72.
- Prieto, A., Vallejo, A., Zuloaga, O., Paschke, A., Sellergen, B., Schillinger, E., Schrader, S., Möder, M., 2011. Selective determination of estrogenic compounds in water by microextraction by packed sorbents and a molecularly imprinted

- polymer coupled with large volume injection-in-port-derivatization gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 703, 41-51.
- Quednow, K., Püttmann, W., 2008. Endocrine disruptors in freshwater streams of Hesse, Germany: Changes in concentration levels in the time span from 2003 to 2005. *Environmental Pollution*. 152, 476-483.
- Quintana, J. B., Rodil, R., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D., 2007. Multiresidue analysis of acidic and polar organic contaminants in water samples by stir-bar sorptive extraction-liquid desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1174, 27-39.
- Regueiro, J., Llompart, M., Garcia-Jares, C., Garcia-Monteagudo, J. C., Cela, R., 2008. Ultrasound-assisted emulsification-microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters. *Journal of Chromatography A*. 1190, 27-38.
- Richardson, S. D., Ternes, T. A., 2005. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Analytical Chemistry*. 77, 3807-3838.
- Rocha, M. J., Cruzeiro, C., Reis, M., Pardal, M. Â., Rocha, E., 2014. Spatial and seasonal distribution of 17 endocrine disruptor compounds in an urban estuary (Mondego River, Portugal): Evaluation of the estrogenic load of the area. *Environmental Monitoring and Assessment*. 186, 3337-3350.
- Rocha, M. J., Cruzeiro, C., Rocha, E., 2013. Quantification of 17 endocrine disruptor compounds and their spatial and seasonal distribution in the Iberian Ave River and its coastline. *Toxicological and Environmental Chemistry*. 95, 386-399.
- Rocha, M. J., Ribeiro, C., Ribeiro, M., 2011. Development and optimisation of a GC-MS method for the evaluation of oestrogens and persistent pollutants in river and seawater samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 91, 1191-1205.
- Rocha, M. J., Ribeiro, M., Ribeiro, C., Couto, C., Cruzeiro, C., Rocha, E., 2012. Endocrine disruptors in the Leça River and nearby Porto Coast (NW Portugal): Presence of estrogenic compounds and hypoxic conditions. *Toxicological and Environmental Chemistry*. 94, 262-274.
- Rodriguez-Mozaz, S., López De Alda, M. J., Barceló, D., 2004. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1045, 85-92.

- Roth, B., Herkenrath, P., Lehmann, H. J., Ohles, H. D., Hömig, H. J., Benz-Bohm, G., Kreuder, J., Younossi-Hartenstein, A., 1988. Di-(2-ethylhexyl)-phthalate as plasticizer in PVC respiratory tubing systems: indications of hazardous effects on pulmonary function in mechanically ventilated, preterm infants. *Eur J Pediatr.* 147, 41-46.
- Rudel, R. A., Perovich, L. J., 2009. Endocrine disrupting chemicals in indoor and outdoor air. *Atmospheric environment (Oxford, England : 1994).* 43, 170-181.
- Russo, M. V., Notardonato, I., Avino, P., Cinelli, G., 2014a. Determination of phthalate esters at trace levels in light alcoholic drinks and soft drinks by XAD-2 adsorbent and gas chromatography coupled with ion trap-mass spectrometry detection. *Analytical Methods.* 6, 7030-7037.
- Russo, M. V., Notardonato, I., Avino, P., Cinelli, G., 2014b. Fast determination of phthalate ester residues in soft drinks and light alcoholic beverages by ultrasound/vortex assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *RSC Advances.* 4, 59655-59663.
- Saillenfait, A. M., Payan, J. P., Fabry, J. P., Beydon, D., Langonne, I., Gallissot, F., Sabate, J. P., 1998. Assessment of the Developmental Toxicity, Metabolism, and Placental Transfer of Di-n-butyl Phthalate Administered to Pregnant Rats. *Toxicological Sciences.* 45, 212-224.
- Sakhi, A. K., Lillegaard, I. T. L., Voorspoels, S., Carlsen, M. H., Løken, E. B., Brantsæter, A. L., Haugen, M., Meltzer, H. M., Thomsen, C., 2014. Concentrations of phthalates and bisphenol A in Norwegian foods and beverages and estimated dietary exposure in adults. *Environment International.* 73, 259-269.
- Sala, M., Inbar, M., 1992. Some hydrologic effects of urbanization in Catalan rivers. *CATENA.* 19, 363-378.
- Salazar, V., Castillo, C., Ariznavarreta, C., Campón, R., Tresguerres, J. A. F., 2004. Effect of oral intake of dibutyl phthalate on reproductive parameters of Long Evans rats and pre-pubertal development of their offspring. *Toxicology.* 205, 131-137.
- Sánchez-Avila, J., Bonet, J., Velasco, G., Lacorte, S., 2009. Determination and occurrence of phthalates, alkylphenols, bisphenol A, PBDEs, PCBs and PAHs in an industrial sewage grid discharging to a Municipal Wastewater Treatment Plant. *Science of the Total Environment.* 407, 4157-4167.
- 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.
- Santhi, V. A., Sakai, N., Ahmad, E. D., Mustafa, A. M., 2012. Occurrence of bisphenol A in surface water, drinking water and plasma from Malaysia with exposure assessment from consumption of drinking water. *Science of the Total Environment*. 427-428, 332-338.
- Schriks, M., Heringa, M. B., van der Kooi, M. M. E., de Voogt, P., van Wezel, A. P., 2010. Toxicological relevance of emerging contaminants for drinking water quality. *Water Research*. 44, 461-476.
- Serôdio, P., Nogueira, J. M. F., 2006. Considerations on ultra-trace analysis of phthalates in drinking water. *Water Research*. 40, 2572-2582.
- Shao, B., Han, H., Hu, J., Zhao, J., Wu, G., Xue, Y., Ma, Y., Zhang, S., 2005. Determination of alkylphenol and bisphenol a in beverages using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 530, 245-252.
- Shue, M. F., Chen, F. A., Chen, T. C., 2010. Total estrogenic activity and nonylphenol concentration in the Donggang River, Taiwan. *Environmental Monitoring and Assessment*. 168, 91-101.
- Silva, R. C., Meurer, E. C., Eberlin, M. N., Augusto, F., 2005. Determination of phthalates in water using fiber introduction mass spectrometry. *Analyst*. 130, 188-192.
- Skjevraak, I., Due, A., Gjerstad, K. O., Herikstad, H., 2003. Volatile organic components migrating from plastic pipes (HDPE, PEX and PVC) into drinking water. *Water Research*. 37, 1912-1920.
- Sodré, F. F., Locatelli, M. A. F., Jardim, W. F., 2010a. Occurrence of emerging contaminants in Brazilian drinking waters: A sewage-to-tap issue. *Water, Air, and Soil Pollution*. 206, 57-67.
- Sodré, F. F., Pescara, I. C., Montagner, C. C., Jardim, W. F., 2010b. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal*. 96, 92-98.
- Stales, C. A., Peterson, D. R., Parkerton, T. F., Adams, W. J., 1997. The environmental fate of phthalate esters: A literature review. *Chemosphere*. 35, 667-749.
- Staniszewska, M., Falkowska, L., Grabowski, P., Kwaśniak, J., Mudrak-Cegiołka, S., Reindl, A. R., Sokołowski, A., Szumiło, E., Zgrundo, A., 2014. Bisphenol A, 4-

- tert-octylphenol, and 4-nonylphenol in the Gulf of Gdańsk (Southern Baltic). *Archives of environmental contamination and toxicology*. 67, 335-347.
- Staples, C. A., Adams, W. J., Parkerton, T. F., Gorsuch, J. W., Biddinger, G. R., Reinert, K. H., 1997. Aquatic toxicity of eighteen phthalate esters. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 16, 875-891.
- Staples, C. A., Dome, P. B., Klecka, G. M., Oblock, S. T., Harris, L. R., 1998. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*. 36, 2149-2173.
- Stavarakakis, C., Colin, R., Hequet, V., Faur, C., Le Cloirec, P., 2008. Analysis of endocrine disrupting compounds in wastewater and drinking water treatment plants at the nanogram per litre level. *Environmental Technology*. 29, 279-286.
- Stephenson, R. R., 1983. Diphenylol propane: Acute Toxicity to *Daphnia magna* and *Selanastrum capricornutum*. Shell Research Ltd.
- Stone, C. M., Watkinson, R. J., 1983. Diphenylol propane: An Assessment of Ready Biodegradability. Report SBGR83.425. Sittingbourne Research Centre.
- Teuten, E. L., Saquing, J. M., Knappe, D. R. U., Barlaz, M. A., Jonsson, S., Björn, A., Rowland, S. J., Thompson, R. C., Galloway, T. S., Yamashita, R., Ochi, D., Watanuki, Y., Moore, C., Viet, P. H., Tana, T. S., Prudente, M., Boonyatumanond, R., Zakaria, M. P., Akkhavong, K., Ogata, Y., Hirai, H., Iwasa, S., Mizukawa, K., Hagino, Y., Imamura, A., Saha, M., Takada, H., 2009. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife.
- Thompson, D., Parry, S. J., Benzing, R., 1996. A novel method for the determination of migration of contaminants from food contact materials. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 213, 349-359.
- Tovar-Sánchez, A., Sánchez-Quiles, D., Basterretxea, G., Benedé, J. L., Chisvert, A., Salvador, A., Moreno-Garrido, I., Blasco, J., 2013. Sunscreen Products as Emerging Pollutants to Coastal Waters. *PLoS ONE*. 8, e65451.
- Verschueren, K., 1996. *Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals*. 836.
- Viecelli, N. C., Lovatel, E. R., Cardoso, E. M., Filho, I. N., 2011. Quantitative analysis of plasticizers in a wastewater treatment plant: influence of the suspended solids parameter. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 22, 1150-1155.
- Vogelsang, C., Grung, M., Jantsch, T. G., Tollefsen, K. E., Liltved, H., 2006. Occurrence and removal of selected organic micropollutants at mechanical, chemical and

- advanced wastewater treatment plants in Norway. *Water Research*. 40, 3559-3570.
- vom Saal, F. S., Hughes, C., 2005. An Extensive New Literature Concerning Low-Dose Effects of Bisphenol A Shows the Need for a New Risk Assessment. *Environmental Health Perspectives*. 113, 926-933.
- Voutsas, D., Hartmann, P., Schaffner, C., Giger, W., 2006. Benzotriazoles, alkylphenols and bisphenol A in municipal wastewaters and in the Glatt River, Switzerland. *Environmental Science and Pollution Research*. 13, 333-341.
- Wang, L., Ying, G. G., Zhao, J. L., Liu, S., Yang, B., Zhou, L. J., Tao, R., Su, H. C., 2011. Assessing estrogenic activity in surface water and sediment of the Liao River system in northeast China using combined chemical and biological tools. *Environmental Pollution*. 159, 148-156.
- Wang, W.-L., Wu, Q.-Y., Wang, C., He, T., Hu, H.-Y., 2015. Health risk assessment of phthalate esters (PAEs) in drinking water sources of China. *Environmental Science and Pollution Research*. 22, 3620-3630.
- Waring, R. H., Harris, R. M., 2005. Endocrine disruptors: A human risk? *Molecular and Cellular Endocrinology*. 244, 2-9.
- Wentzel, R., Point, T. L., Simini, M., Checkai, R., Ludwig, D., Brewer, L., 1996. Tri-service procedural guidelines for ecological risk assessments. Aberdeen Proving Ground, MD. US Army Edgewood Research, Development, and Engineering Center.
- Wenzel, A., Müller, J., Ternes, T., 2003. Study on endocrine disruptors in drinking water, Final report, ENV.D.1/ETU/2000/0083, ESWE-Institute for Water Research and Water Technology GmbH.
- Writer, J. H., Ryan, J. N., Keefe, S. H., Barber, L. B., 2012. Fate of 4-nonylphenol and 17 β -estradiol in the Redwood River of Minnesota. *Environmental Science and Technology*. 46, 860-868.
- Wu, M., Wang, H., Dong, G., Musselman, B. D., Liu, C. C., Guo, Y., 2015. Combination of solid-phase micro-extraction and direct analysis in real time-fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for sensitive and rapid analysis of 15 phthalate plasticizers in beverages. *Chinese Journal of Chemistry*. 33, 213-219.
- Wu, P. G., Pan, X. D., Ma, B. J., Wang, L. Y., Zhang, J., 2014. Determination of phthalate esters in non-alcoholic beverages by GC-MS and optimization of the extraction conditions. *European Food Research and Technology*. 238, 607-612.

- Wu, X., Hong, H., Liu, X., Guan, W., Meng, L., Ye, Y., Ma, Y., 2013. Graphene-dispersive solid-phase extraction of phthalate acid esters from environmental water. *Science of the Total Environment*. 444, 224-230.
- Xu, J., Liang, P., Zhang, T., 2007. Dynamic liquid-phase microextraction of three phthalate esters from water samples and determination by gas chromatography. *Analytica Chimica Acta*. 597, 1-5.
- Xue, F., Wu, J., Chu, H., Mei, Z., Ye, Y., Liu, J., Zhang, R., Peng, C., Zheng, L., Chen, W., 2013. Electrochemical aptasensor for the determination of bisphenol A in drinking water. *Microchimica Acta*. 180, 109-115.
- Xue, L., Zhang, D., Wang, T., Wang, X. M., Du, X., 2014. Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography for determination of phthalic esters in environmental water samples. *Analytical Methods*. 6, 1121-1127.
- Yan, H., Cheng, X., Yan, K., 2012. Rapid screening of five phthalate esters from beverages by ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction coupled with gas chromatography. *Analyst*. 137, 4860-4866.
- Yang, G. C. C., Liou, S. H., Wang, C. L., 2014a. The influences of storage and further purification on residual concentrations of pharmaceuticals and phthalate esters in drinking water. *Water, Air, and Soil Pollution*. 225.
- Yang, Y., Yu, J., Yin, J., Shao, B., Zhang, J., 2014b. Molecularly imprinted solid-phase extraction for selective extraction of bisphenol analogues in beverages and canned food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62, 11130-11137.
- Yilmaz, P. K., Ertaş, A., Kolak, U., 2014. Simultaneous determination of seven phthalic acid esters in beverages using ultrasound and vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science*. 37, 2111-2117.
- Yin, J., Meng, Z., Zhu, Y., Song, M., Wang, H., 2011. Dummy molecularly imprinted polymer for selective screening of trace bisphenols in river water. *Analytical Methods*. 3, 173-180.
- Yu, Z., Peldszus, S., Huck, P. M., 2007. Optimizing gas chromatographic-mass spectrometric analysis of selected pharmaceuticals and endocrine-disrupting substances in water using factorial experimental design. *Journal of Chromatography A*. 1148, 65-77.
- Zgola-Grześkowiak, A., Grześkowiak, T., 2011. Determination of alkylphenols and their short-chained ethoxylates in polish river waters. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 91, 576-584.

Bibliografia

- Zhan, M. J., Yang, X., Xian, Q. M., Kong, L. R., 2006. Photochemical Transformation of Bisphenol A Promoted by Nitrate Ions. *Bull Environ Contam Toxicol.* 76, 105-112.
- Zhang, H., Chen, X., Jiang, X., 2011. Determination of phthalate esters in water samples by ionic liquid cold-induced aggregation dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta.* 689, 137-142.
- Zhang, M., Huang, J., Zeng, J., Zhang, C., 2014. Silicon dioxide-poly(dimethylsiloxane) with a bilayer structure, incorporating multi-walled carbon nanotubes, supported on stainless steel wire as a solid-phase microextraction fiber for the determination of trace phthalate esters in drinking water samples. *RSC Advances.* 4, 12313-12320.
- Zhao, J. L., Ying, G. G., Wang, L., Yang, J. F., Yang, X. B., Yang, L. H., Li, X., 2009. Determination of phenolic endocrine disrupting chemicals and acidic pharmaceuticals in surface water of the Pearl Rivers in South China by gas chromatography-negative chemical ionization-mass spectrometry. *Science of the Total Environment.* 407, 962-974.
- Zhong, S., Tan, S. N., Ge, L., Wang, W., Chen, J., 2011. Determination of bisphenol A and naphthols in river water samples by capillary zone electrophoresis after cloud point extraction. *Talanta.* 85, 488-492.
- Zou, E., Fingerman, M., 1997. *Ecotoxicol Environ Saf.* 38, 281-5.