



Facultad de Ciencias

Departamento de Química Agrícola

# Contaminantes orgánicos halogenados: PBDE, DBDPE, Decloranes, OH-PBDE y MeO-PBDE. Desarrollo de metodologías analíticas y aplicación a muestras medioambientales

Memoria para obtener el Título de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid, dentro del programa de doctorado Química Agrícola, Alimentaria y Ambiental, presentada por:

**Adrián de la Torre Haro**

Directora del trabajo:



Dra. María de los Ángeles Martínez Calvo  
Grupo de Contaminantes Orgánicos Persistentes  
Departamento de Medioambiente  
Centro de Investigaciones Energéticas  
Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT)

Tutor del trabajo:



Dr. Raimundo Jiménez Ballesta  
Catedrático de Edafología.  
Departamento de Geología y Geoquímica  
Universidad Autónoma de Madrid (UAM)



*A Mila*

Not everything that can be counted counts,  
and not everything that counts can be counted.

Albert Einstein



MARÍA DE LOS ÁNGELES MARTÍNEZ CALVO, Investigadora Titular de Organismos Públicos de Investigación y Responsable del Grupo de Contaminantes Orgánicos Persistentes del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT),

#### CERTIFICA

Que el presente trabajo de investigación titulado: “CONTAMINANTES ORGÁNICOS HALOGENADOS: PBDE, DBDPE, DECLORANES, OH-PBDE Y MEO-PBDE. DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS Y APLICACIÓN A MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES”, constituye la memoria que presenta Adrián de la Torre Haro para optar al grado de doctor y que ha sido realizado bajo mi dirección en el Laboratorio de Contaminantes Orgánicos Persistentes del CIEMAT.

Para que así conste firmo la presente en Madrid a 15 de noviembre de 2010.

Dra. María de los Ángeles Martínez Calvo



## **AGRADECIMIENTOS**





Durante la realización de este trabajo he tenido la oportunidad de conocer a muchas personas, algunas de ellas empezaron siendo compañeros/as y se han convertido en amigos/as. Todas me han enseñado algo y de todas he tratado de aprender y es por ello por lo que me gustaría agradecerles su participación en este proyecto.

Mi profundo agradecimiento a la Dra. María de los Ángeles Martínez Calvo. Gracias por motivarme, dirigirme con acierto e implicarse en la superación de los problemas que se nos han presentado en estos años. Pero sobre todo, gracias por considerarme desde el principio uno más del laboratorio, permitiéndome trabajar codo con codo con el resto de compañeros y colaborar en trabajos que no estando recogidos en esta memoria, me han hecho madurar personal y científicamente.

A mis compañeros/as del Grupo de Contaminantes Orgánicos Persistentes del CIEMAT. Gracias a Miguel por ser siempre un amigo dentro y fuera del laboratorio, por enseñarme a leer entre las líneas de los cromatogramas y alimentar con sus comentarios y respuestas mi interés por esta profesión. Gracias a Irene, Paloma, Esther, Elena y Eva, sin vuestra ayuda y apoyo no hubiese sido posible realizar este trabajo.

A la Dr. Begoña Fabrellas Rodríguez, por inocularme el virus de los retardantes de llama, descubriéndome este tema apasionante, con el que he crecido y al que he dedicado estos últimos años. Gracias por apostar por mí desde el principio y darme la posibilidad de realizar este trabajo.

Al Dr. Fernando Martín Llorente y la Dra. Begoña Artíñano Rodríguez de Torre, por su apoyo en el desarrollo de este trabajo. A mis compañeros del CIEMAT: Adela, Aída, Antonio, Beatriz, Celia, Javier, Julio, Olga, Rafael, Sandra y Marcos, por emprender este camino juntos y tener siempre un rato para compartir dudas y proyectos.

A los compañeros del Canadian Centre of Inland Waters (CCIW, Environment Canada), por hacerrme sentir como en casa. En especial, al Dr. Mehran Alaee, por aceptarme en su laboratorio, por tantas charlas y divagaciones divinas y científicas, por hacerme partícipe de su amor por la Ciencia y enseñarme a pensar en ella “de otra manera”. A Jonathan Byer, por abrirme las puertas de su casa y familia, por su disposición y ayuda. A Gracina Pacepavicius y Helena Steers, por su trabajo incansable y apoyo en el laboratorio y por ser amigas de obligada visita en Canadá. A Ed Sverko, al Dr. Eric Reiner y la Dra. Shen Li por atormentarme con nuevos compuestos.

A la Dra. Ethel Eljarrat, al Dr. Damiá Barceló y a Paula Guerra del IIQAB (Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales de Barcelona, CSIC) por recibirme en su laboratorio y brindarme la posibilidad de trabajar con ellos, y al resto de personas del CEDEX, CSIC e INIA con las que he colaborado.

Al Dr. Raimundo Jiménez Ballesta, la Dr. Ana María Álvarez González, la Dra. Vanesa González-Quñones Ortas, el Dr. Enrique Eymar Alonso y al Dr. Francisco Javier López Andréu, por abrirme las puertas de la Universidad Autónoma de Madrid y fomentar con su trabajo la colaboración entre la Universidad y los Centros de Investigación españoles.

A mi familia: José Antonio, María Luisa, Raúl, Milagros y María José, por ser vuestro mucho del tiempo que he necesitado para terminar este trabajo, por vuestro cariño y apoyo incondicional. Ya hemos terminado.



## **ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**



## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ABS	Acrilonitrilo butadieno estireno
AEE	Aparatos eléctricos y electrónicos
APP	Polifosfato amónico $[\text{NH}_4\text{PO}_3]_n$
B	Campo magnético
BPA	Bisfenol A
BSEF	Foro de la Ciencia del Bromo y el Medio Ambiente (por sus siglas en inglés, Bromine Science and Environmental Forum)
CCTMA	Comité Científico de la Toxicidad, la Ecotoxicidad y el Medio Ambiente
CI	Ionización química (por sus siglas en inglés, Chemical Ionization)
COP	Contaminantes Orgánicos Persistentes
DBDPE	Decabromodifenil etano
DC	Corriente continua (por sus siglas en inglés, Direct Current)
DDT	1,1,1-Tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano
DecaBB	Decabromobifenilo
decaBDE	Decabromodifenil éter (congénere decabromado)
DecaBDE	Decabromodifenil éter (mezcla comercial)
Dec 602	Declorane 602
Dec 603	Declorane 602
Dec 604	Declorane 602
Dec 605 (DP)	Declorane 605 o Declorane Plus (DP).
DiBBPA	Dibromobisfenol A
DP	Declorane Plus o Declorane 605
DSL	Lista de Sustancias Domésticas publicada por el Ministerio de Medio Ambiente de Canadá ( <i>por sus siglas en inglés, Domestic Substances List</i> )
E	Campo eléctrico
EBE	Analizador magnético trisector, configuración: E+B+E
EE. UU.	Estados Unidos de América
EDAR	Estación de Depuración de Aguas Residuales
EI	Ionización Electrónica (por sus siglas en inglés, Electron Impact)
ECNI	Ionización química negativa por captura electrónica (por sus siglas en inglés, Electron Capture Negative Chemical Ionization)
EI-qMS	Ionización Electrónica con Detector de Masas Cuadrupolo
EI-TQMS	Ionización Electrónica con Detector de Masas Triple Cuadrupolo
EPA	Agencia Americana para la Protección del Medio Ambiente ( <i>por sus siglas en inglés, Environmental Protection Agency</i> )
EPS	Poliestireno expandido (por sus siglas en inglés, Expanded polystyrene)
ESI	Ionización por Electro spray (por sus siglas en inglés, Electrospray Ionization)
GC	Cromatografía de Gases (por sus siglas en inglés, Gas Chromatography)
GC-MS	Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrometría de Masas
GPC	Cromatografía de permeación por gel (por sus siglas en inglés, Gel Permeation Chromatography)
HBCD	Hexabromociclododecano
HCB	Hexaclorobenceno
HCH	Hexaclorociclohexanos
HPV	Registros de Compuestos Químicos con Alto Volumen de Producción (por sus siglas en inglés, High Production Volume (HPV) y Enhance High Production Volume (EHPV)).
HRGC	Cromatografía de Gases de Alta Resolución (por sus siglas en inglés, High Resolution Gas Chromatography)
HRLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (por sus siglas en inglés, High Liquid chromatography)
HRMS	Espectrometría de Masas de Alta Resolución (por sus siglas en inglés, High Resolution Mass Spectrometry)
HYP	Poliestireno de alto impacto (por sus siglas en inglés, High impact polystyrene)
IUPAC	Unión Internacinal de la Química Pura y Aplicada (por sus siglas en inglés, International

	Union of Pure and Applied Chemistry)
LOD	Límite de Detección (por sus siglas en inglés, Limit of Detection)
LRMS	Espectrometría de Masas de Baja Resolución (por sus siglas en inglés, Low Resolution Mass Spectrometry)
MDBDPE	Decabromodifenil etano marcado <sup>13</sup> C
Mirex (Declorane)	1,1 <sup>a</sup> ,2,2,3,3 <sup>a</sup> ,4,5,5 <sup>a</sup> ,5b,6-dodecacloroacta-hidro-1,3,4-meteno-1H-ciclobuta[cd]pentaleno
MeO-PBDE	Polibromodifenil éteres metoxilados
MonoBBPA	Monobromobisfenol A
MS	Espectrometría de Masas (por sus siglas en inglés, Mass Spectrometry)
m.s.	Masa Seca
NCI	Ionización Química Negativa (por sus siglas en inglés, Negative Chemical Ionization)
NCI-qMS	Ionización Química Negativa con Detector de Masas Cuadrupolo
N.D.	No Detectado
NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (por sus siglas en inglés, National Institute of Standards and Technology, USA)
OH-PBDE	Polibromodifenil éteres hidroxilados
OctaBDE	Octabromodifenil éter (mezcla comercial)
PA	Afinidad Protónica (por sus siglas en inglés, Protton Affinity)
PAH	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (por sus siglas en inglés, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons)
PBB	Bifenilos polibromados
PBDD	Polibromodibenzo-p-dioxinas
PBDF	Polibromodibenzo furanos
PBDE	Polibromodifenil éteres
PCB	Policlorobifenilos
PCDD	Policlorodibenzo-p-dioxinas
PBDF	Polibromodibenzo furanos
PCI	Ionización química positiva (por sus siglas en inglés, Positive Chemical Ionization.)
PentaBDE	Pentabromodifenil éter (mezcla comercial)
PFE	Extracción con Fluidos Presurizados (por sus siglas en inglés, Pressurized Fluid Extraction)
PIB	Producto Interior Bruto
ppb	Partes por billón
ppt	Partes por trillón
PTV	Inyector de vaporización por temperatura programada (por sus siglas en inglés, Programmed Temperature Vaporization Injector)
PVC	Policloruro de vinilo (por sus siglas en inglés, Polyvinyl chloride)
qMS	Analizador Cuadrupolar
qMS-EI	Analizador Cuadrupolar trabajando en modo ionización electrónica
qMS-CI	Analizador Cuadrupolar trabajando en modo ionización química
r	Factor de correlación
RSD	Desviación estándar relativa (cociente entre la desviación estándar y la media)
RF	Radiofrecuencia
RAEE	Residuos de Aparatos Eléctricos y Electrónicos
SIM	Registro selectivo de iones (por sus siglas en inglés, Selected Ion Monitored)
SRM	Material de Referencia (por sus siglas en inglés, Standard Reference Material)
SRM 2585	Material de Referencia de contaminantes orgánicos en polvo doméstico (por sus siglas en inglés, Standard Reference Material 2585 Organic Contaminants in House Dust)
S/N	Relación Señal / Ruido
TetraBDE	Tetrabromodifenil éter
TBBPA	Tetrabromobisfenol A
TqMS	Analizador Triple Cuadrupolar
TqMS-EI	Analizador Triple Cuadrupolar trabajando en modo impacto electrónico
Tri-BBPA	Tribromobisfenol A
TSC	Inventario de la Ley de Substancias Tóxicas (por sus siglas en inglés, Toxic Substances Control Act, TSCA, US. EPA)
TTR	Transtiretina

UBA	Agencia de Protección Medioambiental Alemana ( <i>por sus siglas en alemán, Umwelt Bundes Amt</i> )
UE	Unión Europea
US EPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos ( <i>por sus siglas en inglés, United States Environmental Protection Agency</i> )

Nota: Debido a la necesidad de estandarizar los métodos de análisis, para poder comparar los resultados obtenidos en esta investigación con otros estudios, en esta memoria se han utilizado cuando ha sido necesario las siglas o acrónimos correspondientes al término en inglés. Por el mismo motivo, y dado que el Sistema Internacional de Unidades (SI) admite la utilización del punto o la coma como separador decimal (BIPM, 2003), se ha elegido el primero por ser el utilizado en la mayoría de las revistas internacionales.





## ÍNDICE



# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>I</b>
<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....</b>	<b>V</b>
<b>INDICE.....</b>	<b>XI</b>
<b>CAPÍTULO 1.- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1.- PROBLEMÁTICA GENERAL DE LOS RETARDANTES DE LLAMA.....	1
1.2.- PRINCIPALES RETARDANTES DE LLAMA.....	2
1.2.1.- Ciclo de combustión de los polímeros.....	3
1.2.2.- Tipos de retardantes de llama.....	3
1.2.2.1.- Retardantes de llama halogenados.....	5
1.2.2.1.1.- Retardantes de llama bromados.....	7
1.2.2.1.2.- Retardantes de llama clorados.....	12
1.3.- POLIBROMODIFENIL ÉTERES METOXILADOS (MeO-PBDE) Y POLIBROMODIFENIL ÉTERES HIDROXILADOS (OH- PBDE).....	14
1.4.- LEGISLACIÓN.....	16
1.4.1.- Legislación relativa a los retardantes de llama evaluados.....	16
1.4.2.- Legislación relativa a la gestión de lodos de EDAR en España.....	18
<b>CAPÍTULO 2.- OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....</b>	<b>19</b>
2.1.- OBJETIVOS GENERALES.....	21
2.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS Y PLAN DE TRABAJO.....	21
<b>CAPÍTULO 3.- METODOLOGÍA ANALÍTICA.....</b>	<b>25</b>
3.1.- INTRODUCCIÓN.....	27
3.2.- EXTRACCIÓN.....	28
3.3.- PURIFICACIÓN Y/O FRACCIONAMIENTO.....	30
3.4.- ANÁLISIS INSTRUMENTAL.....	33
3.4.1.- Cromatografía de gases de alta resolución en columnas capilares.....	33
3.4.2.- Identificación y cuantificación.....	34
3.4.2.1.- Ionización electrónica (EI).....	35
3.4.2.2.- Ionización química (CI).....	36
3.4.2.2.1.- Ionización química positiva (PCI).....	36
3.4.2.2.1.- Ionización química negativa por captura electrónica (ECNI)	37
3.4.2.3.- Analizador cuadrupolar.....	38
3.4.2.4.- Analizador de sector magnético con doble enfoque, trisector (configuración EBE).....	38
3.4.2.5.- Analizador tandem, triple cuadrupolo.....	40
3.5.- MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....	40

<b>CAPÍTULO 4.- RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
4.1.- FUENTES Y COMPORTAMIENTO DE POLIBROMODIFENIL ÉTERES (PBDE) Y POLYCLORO DIBENZO-P-DIOXINAS (PCDD) EN LODOS DE DEPURADORA ESPAÑOLES.....	45
4.2.- CONCENTRACIONES Y FUENTES DEL CONTAMINANTE EMERGENTE DECABROMODIFENIL ETANO (DBDPE) EN LODOS DE DEPURADORAS.....	75
4.3.- CONCENTRACIONES Y FUENTES DE DECLORANE PLUS EN LODOS DE DEPURADOR.....	91
4.4.- NUEVOS RETARDANTES DE LLAMA, NORBORNENO HALOGENADOS, EN LODOS DE DEPURADORA ESPAÑOLES.....	101
4.5.- POLIBROMO DIFENIL ÉTERES Y SUS ANALOGOS METOXILADOS E HIDRÓXILADOS EN PLASMA DE PEZ GATO ( <i>AMEIURUS NEBULOSUS</i> ) DEL LAGO ONTARIO.....	109
<b>CAPÍTULO 5.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>137</b>
5.1.- RETARDANTES DE LLAMA EN LODOS DE EDAR ESPAÑOLES.....	139
5.1.1.- Análisis de retardantes de llama en lodos de EDAR.....	144
5.1.2.- Niveles de retardantes de llama en lodos de EDAR.....	155
5.2.- NIVELES DE PBDES Y SUS METOXILADOS E HIDRÓXILADOS EN PLAMA DE PEZ GATO ( <i>AMEIURUS NEBULOSUS</i> ) DEL LAGO ONTARIO....	165
5.2.1.- Análisis de PBDE, MeO-PBDE y OH-PBDE en plasma de pez gato ( <i>Ameiurus nebulosus</i> ) del lago Ontario.....	167
5.2.2.- Niveles de PBDE, MeO-PBDE y OH-PBDE en plasma de pez gato ( <i>Ameiurus nebulosus</i> ) del lago Ontario.....	175
<b>CAPÍTULO 6.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>187</b>
6.1.- CONCLUSIONES.....	189
6.2.- PERSPECTIVAS FUTURAS.....	191
<b>CAPÍTULO 7.- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>193</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>211</b>
ANEXO I.- COMPUESTOS DESCRITOS.....	213
ANEXO II.- NOMBRE Y NÚMERO DE LOS PBDE ANALIZADOS.....	217
ANEXO III.- NOMBRE Y NÚMERO DE LOS MeO-PBDE ANALIZADOS .....	219
ANEXO IV.- NOMBRE Y NÚMERO DE LOS OH-PBDE ANALIZADOS .....	221
ANEXO IV.- OTROS TRABAJOS PUBLICADOS.....	223

## **CAPÍTULO 1.- INTRODUCCIÓN**



## CAPÍTULO 1.- INTRODUCCIÓN

### 1.1.- Problemática general de los retardantes de llama

Para contribuir a la mejora de la calidad de vida que ha experimentado la población mundial en el último siglo ha sido necesario desarrollar nuevos productos químicos cuyas consecuencias a medio y largo plazo no se estudiaron en el momento de su fabricación. Éste es el caso de los retardantes de llama.

Los retardantes de llama son compuestos que se utilizan principalmente en plásticos, textiles, circuitos electrónicos y otros materiales, para prevenir su ignición (WHO, 1997). Estos compuestos permiten que el material que los contiene resista al fuego cuando se expone a una fuente de ignición de baja energía, como un cigarrillo, un fósforo, una vela, o un quemador de cocina (Fabrellas et al., 2004).

El uso de retardantes de llama no es nuevo. El historiador griego Herodotus (484-431 AC) ya describió cómo los egipcios (450 AC) impregnaban la madera con alúmina para prevenir su combustión. Doscientos años después los romanos mejoraron esta mezcla añadiéndole vinagre y utilizándola principalmente en aplicaciones militares, como por ejemplo en torres de asalto, donde también se usaron mezclas de arcilla y cabellos (Hindersinn, 1990). Y así, se han ido utilizando distintas formulaciones para diferentes aplicaciones a lo largo de la historia. La primera patente sobre una mezcla retardante de llama para madera y textiles fue registrada por Obadiah Wyld en 1735 (Nametz, 1970). Sin embargo, no es hasta el siglo XIX cuando a raíz del interés del Rey Luis XVIII en evitar la ignición de las cortinas de los teatros parisinos, Gay-Lussac inicia las primeras investigaciones científicas sobre este tipo de compuestos. Fruto de estos estudios aparecen distintas composiciones y sustancias químicas, muchas de ellas base de las mezclas comerciales que se utilizan en la actualidad.

Sin embargo la historia moderna de los retardantes arranca en el siglo XX con el desarrollo de polímeros sintéticos en la industria textil y su utilización durante la Segunda Guerra Mundial. Estas nuevas fibras resultaban más livianas que el algodón y además aportaban hidrofobicidad. Sin embargo, por este último motivo, a la hora de tratarlas contra el fuego no se podían usar sales inorgánicas solubles en agua, lo que hizo necesario desarrollar nuevos productos compatibles con dichos polímeros. Cuando terminó la guerra, la utilidad de estas fibras quedó completamente demostrada y su desarrollo y uso, basado en su hidrofobicidad y capacidad para repeler el fuego, creció exponencialmente en la segunda mitad del siglo XX. Un ejemplo muy claro es la disminución del algodón en la ropa de niños en EE. UU. que pasó de ser un 78 % en 1971 a un 10 % en 1973 (U.S. EPA, 1976).

Gracias a la utilización de retardantes de llama se han evitado cuantiosas pérdidas materiales y económicas. La “International Association for the Study of Insurance and Economics”, Geneva Association, publica anualmente un informe en el que evalúa los costes

del fuego a nivel internacional. Lamentablemente los datos para España son antiguos y escasos, sin embargo, se estima que los incendios suponen unas pérdidas totales de alrededor del 0.1 % del PIB (1.1 billones de euros en 2008) y causan unas 300 muertes al año en nuestro país (GAIN, 2010).

Por otro lado, unido a las propiedades beneficiosas que claramente presenta el uso de estos compuestos, su utilización conlleva también un riesgo para la salud de las personas. En este sentido, si la Segunda Guerra Mundial aceleró el desarrollo moderno de los retardantes de llama, el accidente acaecido en Michigan en 1973, supuso la primera señal de alarma referente a las implicaciones ambientales relativas a su uso. En la planta de la compañía Michigan Chemical Co., situada en St Louis, se producía, entre otros químicos, una mezcla comercial de retardantes de llama polibromobifenilos (PBB) bajo el nombre de Firemaster-BP6<sup>®</sup> y un aditivo para piensos de ganado vacuno (NutriMaster<sup>®</sup>). Por equivocación se produjo un envío de la mezcla del retardante a la Oficina de Servicios Agrícolas de Michigan en lugar del aditivo alimentario. Cuando se descubrió el error, en abril de 1974, los PBB habían entrado en la cadena alimentaria, a través de la leche y otros productos lácteos, carne bovina, porcina, ovejas, pollos y huevos (MDCH, 2010). Más de nueve millones de personas estuvieron expuestas (de Wit, 2002) y 25 años después del accidente los niveles de PBB aún podían ser detectados (Fabrellas et al., 2004). El accidente sirvió de alarma y a partir de entonces la comunidad científica comenzó a estudiar los posibles efectos de estos compuestos sobre los seres vivos y su dispersión en el medio ambiente. Gracias a estos estudios y a los resultados que han aportado, los retardantes de llama han sido objeto de sucesivas restricciones en cuanto a su producción, comercialización y uso.

### **1.2.- Principales retardantes de llama**

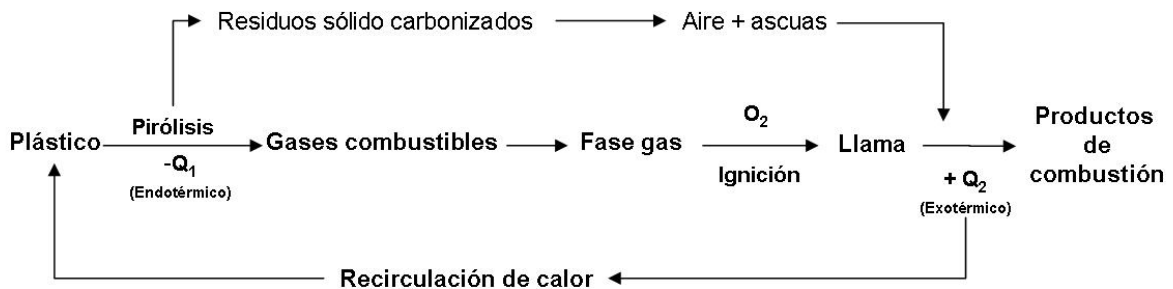
En este epígrafe se describen los mecanismos de acción de los distintos retardantes de llama, pero para poder comprenderlos se hace necesario explicar los procesos que engloban el ciclo de combustión de un material e introducir los conceptos de aditividad y reactividad.

En función de la manera en la que los retardantes de llama se incorporan a los distintos materiales, éstos se clasifican en: retardantes de carácter reactivo y retardantes de carácter aditivo (Alaee et al., 2003). Los compuestos de carácter reactivo se incorporan al material mediante enlaces covalentes entre éstos y el material, mientras que los de carácter aditivo, se disuelven simplemente en el material (Bergman, 1989). En el caso de los polímeros, la utilización de retardantes aditivos no afectará a su estabilidad térmica ni plasticidad, al no unirse éstos químicamente al material (de Wit., 2002), pero por este motivo serán más proclives a la lixiviación desde el producto que los contiene (Fabrellas et al., 2004).



### 1.2.1.- Ciclo de combustión de un polímero

Para comprender los mecanismos de acción de los retardantes de llama, es necesario conocer el mecanismo de propagación del fuego. Este mecanismo se desarrolla en cinco etapas: precalentamiento, descomposición, volatilización, combustión y propagación (Troitzsch, 1990). Estos pasos sucesivos se pueden englobar en el ciclo del fuego, tal y como se muestra en la figura 1.1. Supongamos un polímero sujeto a una fuente de calor, el calor descompone al polímero y genera gases combustibles resultado de la pirólisis. Si estos gases se encuentran en una adecuada proporción con oxígeno se produce la ignición, apareciendo la llama. Esta llama se mantiene gracias a la presencia de radicales de alta energía ( $H^+$ ,  $OH^-$ ) en la fase gas, los cuales descomponen moléculas produciendo carbono, que al reaccionar con oxígeno genera productos de combustión ( $CO_2$ ) y energía (térmica y lumínica). Parte de la energía térmica que se produce se libera al medio y parte se recircula al sistema, favoreciéndose la pirólisis y propagación del fuego.

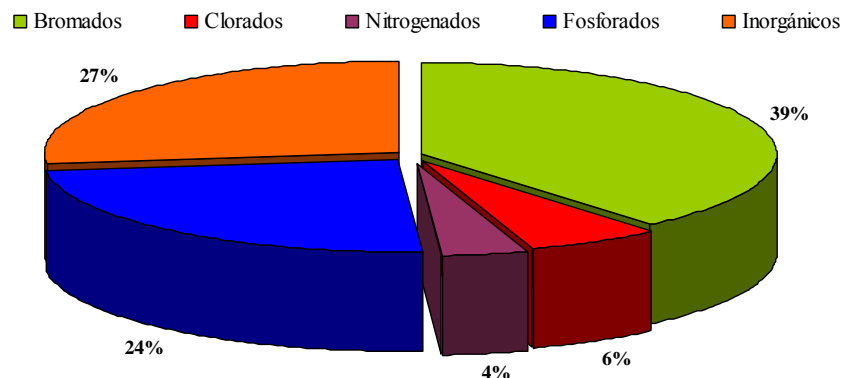


**Figura 1.1.** Ciclo de combustión de un polímero (Troitzsch, 1983).

El objetivo principal de un retardante de llama es aumentar la resistencia a la ignición del material que lo contiene y reducir la propagación del fuego con una mínima degradación de sus propiedades (Green, 1996). Para ello el retardante puede desarrollar distintos mecanismos de acción que se basan en la ruptura o inhibición de alguno de los equilibrios del ciclo de combustión descrito anteriormente. Cualquiera de estas rupturas persiguen la reducción del flujo de calor hacia el polímero y por tanto la disminución de su pirólisis (Troitzsch, 1990; WHO, 1997). En función de su naturaleza, el retardante actuará de forma química y/o física en la fase sólida y/o gas del ciclo de combustión.

### 1.2.2.- Tipos de retardantes de llama

Existen principalmente cuatro tipos de retardantes de llama: fosforados, nitrogenados inorgánicos y halogenados. Sus porcentajes de producción con respecto al total mundial se muestran en la figura 1.2.



**Figura 1.2.** Producción mundial de retardantes de llama en 2001 (BSEF, 2003).

Los principales retardantes de llama fosforados son: el fósforo rojo, y el fosfato amónico (APP) aunque también se utilizan retardantes organofosforados halogenados (Green, 1996). Estos retardantes reaccionan principalmente en la fase sólida del material. Al calentarse el retardante genera fórmulas poliméricas de ácido fosfórico y éste carboniza el polímero, extrayendo agua y formando un residuo carbonizado. Este residuo forma una película aislante entre el material y la fuente de calor. El aislamiento se produce mediante dos mecanismos: i) por un lado se separa al polímero de la fuente de calor (enfriamiento) y por otro ii) se evita el contacto entre los gases combustibles y el oxígeno. En el caso de retardantes organofosforados halogenados (conteniendo algún átomo de cloro o bromo), el retardante actuará combinando los mecanismos de acción de los distintos elementos (fosforados y halogenados). Los retardantes de llama fosforados se utilizan en espumas de poliuretano y poliamidas (fósforo rojo), pinturas, maderas y aceros (APP), tanto de forma reactiva como aditiva (WHO, 1997).

Los principales retardantes de llama nitrogenados son la melanina ( $C_3H_6N_6$ ) y productos derivados de ésta (WHO, 1997). Estos retardantes se suelen emplear en combinación con otros tipos de retardantes de llama y su mecanismo de acción se desarrolla principalmente de tres modos: i) reaccionando químicamente con el polímero, aumentando su estabilidad y disminuyendo la formación de gases combustibles (interacción química en fase sólida) (EFRA, 2006), ii) liberando nitrógeno en forma gaseosa lo cual diluye la concentración de gases en la fase gas (dilución) y iii) de forma sinérgica en la presencia de retardantes fosforados favoreciendo la intumescencia del material (aislamiento) (Grabner, 1993). Los retardantes de llama nitrogenados se utilizan principalmente en polímeros que contienen nitrógeno (poliamidas y poliuretanos), policloruros de vinilo (PVC) y poliolefinas (WHO, 1997).

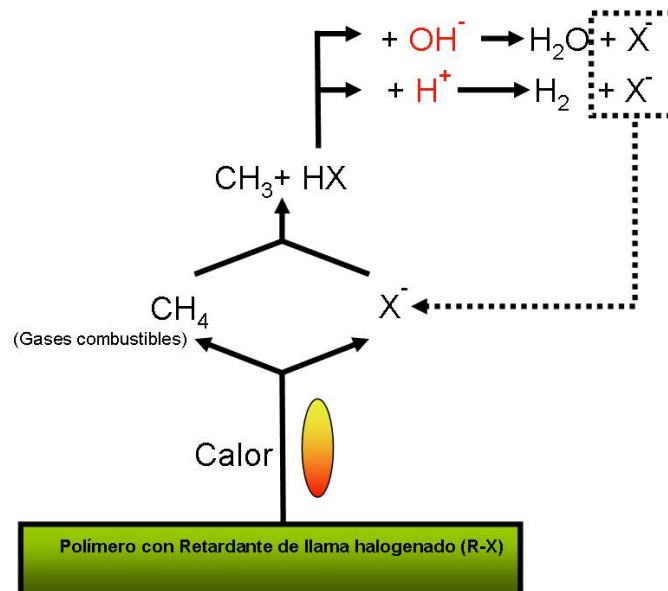
Los principales retardantes de llama inorgánicos son: hidróxidos de aluminio y magnesio, trióxido de aluminio y compuestos de boro. Estos retardantes pueden actuar bajo tres mecanismos: i) absorbiendo calor del sistema (enfriamiento) mientras se descompone, ii) liberando agua o gases no combustibles que diluyan los gases combustibles (dilución en fase gas) y iii) formando capas no inflamables y aislantes en la superficie del material (aislamiento). El  $Al_2(OH)_3$  se descompone en alúmina  $Al_2O_3$ , absorbiendo calor (enfriamiento) y formando

junto con el residuo carbonoso una capa protectora (aislamiento) y agua (dilución de la fase gas). Esta descomposición se produce a una temperatura alrededor de 200 °C, sin embargo en el caso del hidróxido de magnesio la temperatura necesaria aumenta hasta 300 °C, lo que facilita que este último se utilice en el caso de plásticos cuyas temperaturas de procesamiento son superiores a las 200 °C (EFRA, 2006). En el caso de los compuestos de boro se suma un cuarto mecanismo, favorecido por la formación de ácido bórico que puede carbonizar el material formando una capa aislante. Los hidróxidos de aluminio y magnesio se utilizan mayoritariamente en plásticos, mientras que los basados en boro, principalmente: ácido bórico y bórax (borato de sodio), se usan en materiales derivados de la celulosa (algodón y papel), debido a que ambos son solubles en agua (WHO, 1997).

### 1.2.2.1.- Retardantes de llama halogenados

Los retardantes de llama halogenados (bromados y clorados) son los que más se utilizan a nivel mundial (45%) (BSEF, 2003).

Los retardantes halogenados siguen principalmente un mecanismo de interacción química con los radicales libres presentes en la fase gas (Ulsamer et al., 1980), ver figura 1.3. Un retardante halogenado cuando se expone a altas temperaturas libera radicales libres del halógeno ( $X^{\cdot}$ ). Estos radicales reaccionan con las moléculas de hidrocarburo (gases combustibles), resultado de la pirólisis del material, generando HX. El HX reacciona con los radicales de alta energía ( $H^{\cdot}$  y  $OH^{\cdot}$ ) generando agua y radicales de menor energía ( $X^{\cdot}$ ), que quedan disponibles para empezar un nuevo ciclo de captura de  $H^{\cdot}$  y  $OH^{\cdot}$  (Troitzsch, 1983).



**Figura 1.3.** Esquema del mecanismo de acción química por captura de radicales de los retardantes de llama halogenados.

Por tanto la efectividad del retardante halogenado dependerá de: i) la cantidad de átomos halógenos que contenga y ii) la facilidad que presente para liberarlos o lo que es lo mismo, la energía de disociación heterolítica del enlace carbono-halógeno.

En función del halógeno podrán existir retardantes de flúor, cloro, bromo e iodo. Teniendo en cuenta que la energía de disociación heterolítica para el enlace carbono-halógeno sigue la siguiente secuencia  $C-F > C-Cl > C-Br > C-I$  (Morrison y Boyd, 1998) los retardantes de iodo resultarán aparentemente los más efectivos, ya que el enlace C-I es más débil. Sin embargo existe otro factor condicionante, la estabilidad térmica del retardante con respecto a la del polímero. Para que la efectividad sea máxima el retardante deberá descomponerse 50 °C por debajo de la temperatura de pirólisis del polímero (Rahman et al., 2001). Los retardantes iodados no son muy estables y se descomponen a menores temperaturas de las necesarias para que el polímero arda, liberando el halógeno demasiado pronto como para ser efectivos. En el otro extremo, los fluorados son compuestos muy estables y necesitan temperaturas demasiado altas para descomponerse (Alaee et al., 2003). Por este motivo los retardantes de llama halogenados más utilizados (39 y 6 % del volumen de producción mundial (BSEF, 2003) son los bromados y los clorados, respectivamente. Dentro de las dos posibilidades (bromados y clorados) los bromados resultan ser los más efectivos, debido a que el enlace C-Br es más débil, lo que hace que interfieran en el proceso de combustión en un momento más favorable. A esto se suma que el rango de temperaturas en el que se forma HBr es más estrecho, presentándose en mayor concentración en la zona de la llama. Por el contrario, el intervalo en el que se forma el HCl es más amplio y por tanto se presentará más diluido en la fase gas, lo que resultará en una menor eficiencia en la captura de radicales (Hindersinn y Wagner, 1967).

Los retardantes bromados pueden ser: alifáticos, cicloalifáticos y aromáticos. Como en el caso anterior, cuanto menos estables sean, con más facilidad se liberará el halógeno y más efectivos serán (alifáticos > cicloalifáticos > aromáticos) (Green, 1996). Pero también en este caso se ha de llegar a una situación de compromiso que combine facilidad para liberar el halógeno y estabilidad térmica del retardante. Es importante que el retardante permanezca estable durante el proceso de fabricación del producto y por este motivo los aromáticos son los más usados (WHO, 1997; Fabrellas et al., 2004).

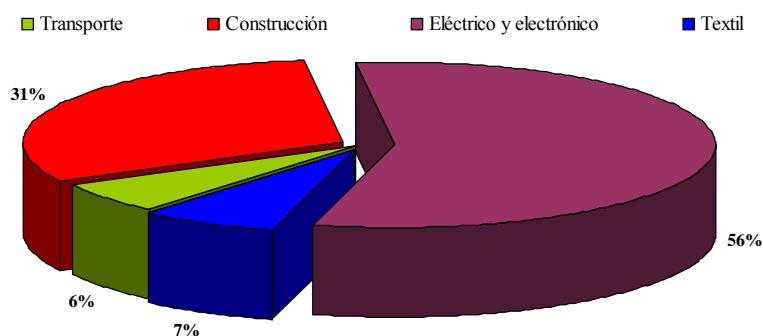
Aunque generalmente se considera que la interacción química con radicales libres en la fase gas es el principal mecanismo de acción de los retardantes halogenados (Ulsamer et al., 1980), también se debe tener en cuenta que estos compuestos pueden realizar mecanismos de dilución de la fase gas (Troitzsch, 1979) y aislamiento en la fase condensada (Hindersinn y Wagner, 1967). La primera opción se explicaría por la formación de gases no combustibles (HBr y HCl) que diluyen la fase gas y la segunda se desarrollaría por la acción catalizadora del HBr y HCl en la formación de productos de oxidación capaces de formar, junto con el material carbonizado, películas aislantes en el material.

En algunos casos estos retardantes se utilizan en combinación con trióxido de antimonio ( $Sb_2O_3$ ). Este compuesto no es en sí un retardante de llama, pero presenta un efecto sinérgico

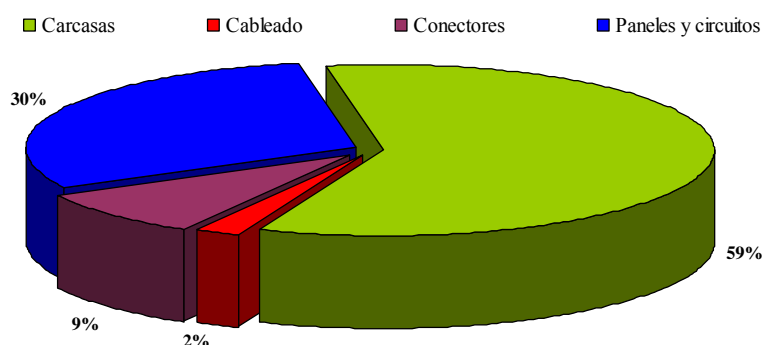
importante cuando se utiliza en combinación con retardantes halogenados. Este sinergismo responde a dos mecanismos: i) el  $Sb_2O_3$  cataliza las reacciones de liberación de los radicales ( $Br^\cdot$  y  $Cl^\cdot$ ) y ii) reacciona con los halógenos para formar compuestos volátiles de antimonio: haluros de antimonio ( $SbX_3$ ,  $SbX_2$ ,  $SbX$ ) u oxihidróxidos de antimonio ( $SbO^\cdot$ ,  $SbOH$ ), los cuales son capaces de capturar radicales de alta energía ( $OH^\cdot$ ,  $H^\cdot$ ) (Troitzsch, 1998).

### 1.2.2.1.1.- Retardantes de llama bromados

Como se ha comentado anteriormente, los retardantes de llama bromados son los que presentan una mejor relación coste beneficio y por tanto son los más utilizados en la actualidad. En la figura 1.4 se refleja el consumo de retardantes de llama bromados según los productos finales a los que se destinan. Como se puede ver, la principal aplicación corresponde al sector eléctrico y electrónico (carcasas, paneles y circuitos electrónicos, ver figura 1.5) y al sector de la construcción (aislamiento y materiales ignífugos) (BSEF, 2000 y 2003).



**Figura 1.4.** Distribución de los retardantes de llama bromados en función de su aplicación final (BSEF, 2000 y 2003).



**Figura 1.5.** Componentes de aparatos eléctricos y electrónicos que usan retardantes de llama bromados (BSEF 2000 y 2003).

Existen más de 75 tipos distintos de retardantes bromados (Birnbaum y Staskal, 2004), sin embargo los principales, en cuanto a volumen de producción y utilización actual o histórica,

son los siguientes: bifenilos polibromados (PBB), tetrabromobisfenol A (TBBPA), hexabromociclododecano (HBCD) y polibromodifenil éteres (PBDE).

Los bifenilos polibromados son compuestos aromáticos con estructura de bifenilo en la que los átomos de hidrógeno pueden estar sustituidos por átomos de bromo (de 1 a 10), dando lugar a 209 posibles congéneres, ver Anexo I. Son de carácter aditivo y se presentan en el ámbito comercial principalmente bajo tres formas: Hexa-, Octa-/nona- y Decabromobifenilo (WHO, 1994a). Los PBB fueron introducidos en el mercado para reemplazar a los policlorobifenilos (PCB) cuya utilización se prohibió en Europa en 1985 (Directiva 85/467/CEE), sin embargo a medida que se ha ido demostrando su toxicidad, su uso se ha ido delimitando bajo varias restricciones: 76/769/CEE, 2002/96/CE y 2002/95/CE, quedando prohibida su producción y permitiéndose sólo la comercialización en Europa del Decabromobifenilo (DecaBB) para usos en equipamiento eléctrico y electrónico siempre que no supere el 1 % en peso del material.

En la tabla 1.1 se muestran los volúmenes de producción para el TBBPA, HBCD, y las tres mezclas comerciales de los PBDE, (DecaBDE, OctaBDE y PentaBDE) (BSEF, 2000 y 2003). Aunque los últimos datos disponibles son del 2001, debido a la política de confidencialidad que impera en este tipo de industrias, a partir de ellos se puede comprobar que existen grandes variaciones en cuanto a los patrones de consumo para las distintas regiones. Por ejemplo, el 75 % de la producción mundial de TBBPA se consume en Asia mientras que en América se utiliza el 95 % de la producción mundial de la mezcla PentaBDE. Estas diferencias de consumo responden a las restricciones implementadas en la producción y uso de estos compuestos en las distintas regiones (Birnbaum y Staskal, 2004).

**Tabla 1.1.** Volumen de producción (toneladas métricas) de los principales retardantes de llama bromados en 2001. Estimación por regiones (BSEF, 2000 y 2003).

Mezcla comercial	América	Europa	Asia	Resto del mundo	Total
TBBPA	18000	11600	89400	600	119600
HBCD	2800	9500	3900	500	16700
DecaBDE	24500	7600	23000	1050	56150
OctaBDE	1500	610	1500	180	3790
PentaBDE	7100	150	150	100	7500
Total PBDE	33100	9360	24650	1330	68440

#### Tetrabromobisfenol A TBBPA

El tetrabromobisfenol A es un compuesto de estructura aromática en el que las cuatro posiciones libres del bisfenol se encuentran sustituidas por átomos de bromo (WHO, 1995), ver Anexo I. Es el retardante bromado más utilizado (BSEF, 2003). Sin embargo sus aplicaciones no son muchas. Alrededor del 91 % de la producción de TBBPA se añade de forma reactiva, en las resinas epóxicas que contienen los circuitos impresos (Alaee et al., 2003), aunque también se puede usar como aditivo en polímeros como el acrilonitrilo butadieno estireno (ABS) (WHO, 1997).

Hexabromociclododecano HBCD

El HBCD es un compuesto cicloalifático con un 76 % de contenido en bromo (Alaee et al., 2003), ver Anexo I. Se comercializa como mezcla racémica de sus tres diastereoisómeros ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), siendo mayoritario el  $\gamma$  (75 – 89 %), seguido del  $\alpha$  y  $\beta$  (10 – 13 % y 1 – 12 %, respectivamente) (Heeb et al., 2005). Se usa principalmente como aditivo del poliestireno expandido (EPS) (WHO, 1997), el cual se emplea ampliamente como aislante en la construcción.

A lo largo de esta investigación y fruto de una estancia en la Unidad de Calidad del Agua y del Suelo, del Departamento de Química Ambiental, del IIQAB (Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales de Barcelona), del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Barcelona, se diseñó y optimizó un método de análisis de HBCD y TBBPA en muestras ambientales. El método optimizado se publicó (Guerra et al., 2008) y presentó en varios congresos internacionales (de la Torre et al., 2007a; Guerra et al., 2007), ver Anexo II.

Polibromodifenil éteres (PBDE)

Los PBDE presentan dos anillos aromáticos unidos por un oxígeno en los que las posiciones de los hidrógenos pueden estar sustituidas por entre 1 y 10 átomos de bromo, ver Anexo I. De esta manera, existen 209 congéneres: 3 (monoBDE), 12 (diBDE), 24 (triBDE), 42 (tetraBDE), 46 (pentaBDE), 42 (hexaBDE), 24 (heptaBDE), 12 (octaBDE), 3 (nonaBDE) y 1 (decaBDE) (WHO, 1994; Arias, 2001). Por analogía con los PCB, estos compuestos se nombran utilizando el sistema IUPAC. Aunque al principio se creía que los PBDEs no podían tener un origen natural (WHO, 1994b), estudios recientes han demostrado que determinadas esponjas marinas son capaces de sintetizarlos en pequeñas cantidades (Teuten et al., 2005), siendo detectados en esponjas (Vetter et al., 2001b y 2002) y algas (Kuniyoshi y Ymaada, 1985; Malmvärn et al., 2005). Las principales características físico-químicas de los PBDE, clasificadas en función del grado de bromación, se resumen en la tabla 1.2.

**Tabla 1.2.** Principales características físico-químicas de los PBDE.

	Peso molecular <sup>a</sup>	Solubilidad en agua (25°C; $\mu\text{g/L}$ ) <sup>b,c,d,e,f</sup>	Presión de vapor (21°C, Pa) <sup>f,g,h,i,j</sup>	Log $k_{ow}$ <sup>b,k</sup>	Log $k_{oa}$ <sup>l</sup>
diBDE	328.0	21	$1.3 \times 10^{-3}$	5.03	
triBDE	406.9		$2.7 \times 10^{-3}$	5.5-5.6	
tetraBDE	485.8	11	$2.5 \times 10^{-4}$	5.9-6.9	10.5
pentaBDE	564.7	9	$4 \times 10^{-5}$	6.5-7.1	11.3
hexaBDE	643.6	4	$1.6 \times 10^{-6}$	6.9-7.9	
heptaBDE	722.3		$1.8 \times 10^{-7}$	7.5-8.3	12.8
octaBDE	801.4	0.5	$2.3 \times 10^{-7}$	8.4-8.9	13.6
nonaBDE	880.4		$2.4 \times 10^{-8}$	9.5	14.4
decaBDE	959.2	<0.1	$2.9 \times 10^{-9}$	10	15.3

<sup>a</sup> WHO, 1994b; <sup>b</sup> Alcock et al., 1999; <sup>c</sup> Stenzel y Markley, 1997; <sup>d</sup> CMABFRIP, 1997a; <sup>e</sup> CMABFRIP, 1997b; <sup>f</sup> European Communities, 2001; <sup>g</sup> European Communities 2002 y 2003; <sup>h</sup> Wong et al., 2001; <sup>i</sup> Tittlemier et al., 2002; <sup>j</sup> Wania y Dugani 2003; <sup>k</sup> Watanabe y Tatsukawa 1990; <sup>l</sup> Harner y Shoeib 2002.

Como se puede apreciar, los PBDE presentan bajas presiones de vapor, muy baja solubilidad en agua y altos coeficientes de partición octanol agua. Por estos motivos se puede esperar que cuando entren en el medio ambiente, tenderán a unirse a la fracción orgánica del material particulado (Environment Canada, 2006).

Los PBDE fueron introducidos en el mercado con el fin de sustituir a los PBB como retardantes de llama bromados tras el accidente de Michigan en 1973. Se utilizan principalmente con carácter aditivo añadiéndose al material después del proceso de fabricación, lo cual como se ha comentado anteriormente, facilita su lixiviación al medio ambiente durante el uso y desecho o reciclaje de los productos que los contienen. Los PBDE se han comercializado bajo tres mezclas comerciales: DecaBDE, OctaBDE y PentaBDE. Estas composiciones quedan clasificadas en función del contenido medio de bromo; la composición de las mismas (%) se muestra en la tabla 1.3.

**Tabla 1.3.** Composición (porcentaje) por grado de bromación de las tres mezclas bajo las que se comercializan los PBDE (WHO, 1994b) y porcentaje en peso del bromo que contienen (Alaee et al., 2003). Estos volúmenes no incluyen las cantidades importadas en artículos procesados.

	tri BDE	tetra BDE	penta BDE	hexa BDE	hepta BDE	octa BDE	nona BDE	deca BDE	% Br
DecaBDE							0.3-3	97-98	83
OctaBDE				10-12	43-44	31-35	9-11	0-1	79
PentaBDE	0-1	24-38	50-65	4-8					70

El **DecaBDE** se empezó a producir en Estados Unidos en 1976 (WHO, 1994b) y desde entonces se ha convertido en el segundo retardante de llama bromado más utilizado, por detrás del TBBPA. De las tres mezclas de PBDE, ésta es la más utilizada, representando el 82 % de la producción mundial de PBDE (BSEF, 2003). Esta mezcla se puede usar prácticamente en casi todos los polímeros, incluyendo: policarbonatos, resinas poliésteres, poliolefinas, acrilonitrilo butadieno estireno (ABS) (European Communities, 2002), poliamidas y cloruro de polivinilo (PVC) (Alaee et al., 2003). Debido a su estabilidad térmica, se emplea en polímeros que presentan altas temperaturas de procesado, como el poliestireno de alto impacto (HYP), el cual se usa principalmente en carcasas de aparatos eléctricos y electrónicos (Larsen, 1978).

La mezcla **OctaBDE** está constituida mayoritariamente (74 - 79 %) por congéneres hepta- y octabromados. Esta mezcla se ha utilizado principalmente en ABS (European Communities, 2003). Aunque puede presentar en menor medida otros usos, tales como: nylon, HYP, polietileno de baja densidad, policarbonato, resinas fenol-formaldehidas y poliésteres insaturados en revestimientos y adhesivos (WHO, 1994b).

La mezcla **PentaBDE** está compuesta principalmente por congéneres tetra- y pentabromados, siendo los congéneres BDE-47 y BDE-99 los mayoritarios. Esta mezcla se ha empleado en espumas flexibles de poliuretano para muebles y tapicerías (Pettigrew, 1993; European Communities, 2001). También se utilizó en resinas epóxicas y fenólicas (WHO, 1994b).



Como se comenta en detalle en el siguiente punto, el uso y comercialización de las mezclas PentaBDE y OctaBDE están prohibidos en Europa desde 2004 por la Directiva 2003/11/CE.

Los PBDE se pueden transformar bajo condiciones de pirólisis en polibromodibenzo-p-dioxinas (PBDD) y polibromodibenzo furanos (PBDF). Este hecho se ha demostrado en varios estudios (Hutzinger y Thoma, 1987; Thoma et al., 1987; Bienek et al., 1989;) y aunque se producen generalmente bajo altas temperaturas (400 – 800 °C), ha de tenerse en cuenta cuando la problemática ambiental de estos compuestos es analizada.

#### Decabromodifenil etano (DBDPE)

A medida que se prohíben determinadas mezclas de retardantes de llama, sirva como ejemplo la prohibición ya comentada de las mezclas PentaBDE y OctaBDE en Europa (Directiva 2003/11/CE), la industria se ve forzada a desarrollar nuevos compuestos capaces de satisfacer los estándares actuales en cuanto a prevención de incendios y sustituir aquéllos que resultaron ser perjudiciales. De esta manera y casi en paralelo a la prohibición de una determinada mezcla, se comercializa otra con aplicaciones similares a las que presenta aquélla a la que sustituye. Éste es el caso del decabromodifenil etano (DBDPE), ver Anexo I, el cual se ha propuesto como un sustituto de las mezclas DecaBDE en Europa (ECB, 2007), dado que presenta similares aplicaciones (Kierkegaard et al., 2004b).

Hasta donde el autor conoce, el DBDPE se comercializa desde mediados de los años 80 en dos mezclas comerciales SAYTEX® (Albermarle) y Firemaster® (Great Lakes Chemical Corp). Estas mezclas no se utilizan tanto como las de tipo DecaBDE debido a su mayor coste (Eljarrat et al., 2005). Sin embargo se prevé que su utilización aumente exponencialmente en los próximos años, principalmente en la industria termoplástica (Konstantinov et al., 2006), a causa de las políticas restrictivas en el uso de DecaBDE. A esta tendencia también contribuirá el hecho de que el DBDPE cumple la directiva alemana de las dioxinas (UBA, 1999) ya que no produce polibromodibenzo-p-dioxinas (PBDD) y sólo genera pequeñas cantidades de 2,3,7,8-tetrabromodibenzo furanos bajo condiciones de pirólisis (Pettigrew, 1993).

En un estudio publicado por Muir et al., 2009, se evaluaron los 222636 compuestos químicos recogidos en: i) la Lista de Sustancias Domesticas de Canadá (Environment Canada Domestic Substances List (DSL)), ii) los Registros de Compuestos Químicos con Alto Volumen de Producción (High Production Volume (HPV) y Enhance High Production Volume (EHPV)) y iii) el Inventario de la Ley de Sustancias Tóxicas (Toxic Substances Control Act, TSCA) de U.S. EPA. Como resultado, se publicó una lista donde se recogen los 50 compuestos persistentes, bioacumulables y tóxicos, potencialmente más peligrosos para el medio ambiente. En esta lista está incluido el DBDPE.

El primer trabajo demostrando la presencia de DBDPE en el medio ambiente se publicó en 2004 (Kierkegaard et al. 2004b) y desde entonces varios estudios han demostrado su alta dispersión, persistencia y bioacumulación incluso en humanos (Eljarrat et al., 2005; Julander et

al., 2005; Law et al., 2006; Zhu y Hites, 2006; Karlsson et al., 2007; Harrad et al., 2008; Qiu y Hites, 2008; Gauthier et al., 2009; Luo et al., 2009). Estos trabajos enfatizan la necesidad de investigar la presencia y comportamiento de este compuesto en el medio ambiente.

### **1.2.2.1.2.- Retardantes de llama clorados**

Los retardantes de llama clorados pueden ser: alifáticos (principalmente parafinas cloradas,  $C_xH_{(2x+2-y)}Cl_y$ ) y cicloalifáticos (Declorane o Mirex, Declorane 602, 603, 604 y 605 entre otros). Los retardantes aromáticos clorados no se utilizan por su mayor estabilidad (WHO, 1997). Una parte importante de la presente investigación, recogida en los puntos 4.3, 4.4 y 5.1 de esta memoria, se ha centrado en el análisis de Decloranes (Declorane o Mirex, Declorane 602, 603, 604, 605 o Declorane Plus (DP) y Clordano Plus (CP)) en lodos de depuradora.

#### Mirex

El Mirex (CAS 2385-85-5;  $C_{10}Cl_{12}$ ) se empezó a utilizar en EE. UU. en 1955 como plaguicida de las hormigas rojas o de fuego (*Solenopsis Saevissima Richteri* y *Solenopsis Invicta*) (Kaiser, 1978). Sólo existe constancia de su utilización para este fin en EE. UU., donde se aplicaron alrededor de 0.25 t de Mirex desde 1967 hasta 1978, año en el que se prohibió su utilización (U.S. NRC, 1978). Sin embargo este compuesto también se ha empleado como retardante de llama en caucho, papel, plásticos y pinturas (WHO, 1984). De las 1.9 t de Mirex producidas en EE. UU., alrededor del 74 % se utilizaron como retardante. Lamentablemente no existe información relativa a su producción en el resto del mundo, aunque países como Bélgica, Francia, Alemania, Japón, Países Bajos y Reino Unido, poseen patentes relativas a esta mezcla (Environment Canada, 1977).

Como se comenta en detalle en el punto 1.3 (Capítulo 1.- Introducción) de esta memoria, el Mirex forma parte de la “docena sucia”, está incluido en el Anexo A del Convenio de Estocolmo (UNEP, 2001) y por tanto su producción, uso, exportación o importación está prohibida en España y en el resto de los 151 países firmantes del Convenio.

#### Decloranes 602, 603, 604, 605 o Declorane Plus (DP)

Los Decloranes 602 (Dec 602; CAS 31107-44-5;  $C_{14}H_4Cl_{12}O$ ), 603 (Dec 603; CAS 13560-91-4;  $C_{17}H_8Cl_{12}$ ), 604 (Dec 604; CAS: 34571-16-9;  $C_{13}H_4Br_4Cl_6$ ) y 605 o Declorane Plus (Dec 605 o DP; CAS: 13560-89-9;  $C_{18}H_{12}Cl_{12}$ ), son retardantes halogenados de tipo aditivo utilizados desde los años 60, aunque su producción y uso comenzó a ser realmente importante a partir de 1978, cuando se empezaron a utilizar como sustitutos del Mirex (WHO, 1984). Los Dec 602, 603, 604 y 605 se diseñaron y sintetizaron tratando de evitar la toxicidad del norbornano hexaclorado (ver Anexo I), aumentando su tamaño molecular. Sin embargo, su toxicidad y bioacumulación ha sido recientemente demostrada (DP en peces (Tomy et al., 2007; Shen et al., 2010), gaviotas (Gauthier et al., 2007) y humanos (Ren et al., 2009); Dec 602, 603 y 604 en peces (Shen et al., 2010)), poniendo de manifiesto la necesidad de evaluar la dispersión de estos contaminantes emergentes en el medio. Al igual que el DBDPE, el DP también se ha

incluido en la lista de los 50 compuestos persistentes, bioacumulables y tóxicos, más peligrosos para el medio ambiente (Muir et al., 2009; Sverko et al., 2010).

Hasta hace poco tiempo se creía que el DP sólo se producía en la fábrica que la empresa Occidental Chemical (OxyChem, antigua Hooker Chemicals) posee en la localidad de Niagara Falls (NuevaYork, EE. UU.). Sin embargo, recientemente se ha descubierto una nueva fábrica de la compañía Anpon en Huaian (Jiangsu, China) (Wang et al., 2010) que también produce este retardante. La producción total de DP se estima entre 400 y 4500 toneladas anuales (U.S. EPA, 2010) siendo un producto químico de comercio internacional, con una utilización en Europa Occidental de alrededor de 800 toneladas al año (ECJRC, 2009). Los principales usos a los que se dedica el DP se relacionan con aplicaciones eléctricas y electrónicas: cables, conectores y circuitos electrónicos entre otros (OxyChem, 2010).

El DP está incluido en la DSL de Canadá, lo que significa que se fabrica, importa o usa en Canadá en una cantidad inferior a 100 kg al año. En los EE. UU. el DP está considerado un producto químico de alta producción (HPV Chemical) y por lo tanto está sujeto al protocolo HPV de la U.S. EPA (Tommy et al., 2007). Por este motivo la empresa OxyChem realizó el correspondiente plan de análisis (U.S. EPA, 2004). Los resultados de este plan demuestran que el DP presenta una alta lipofilicidad ( $\log K_{ow} = 9.3$ ), baja fotodegradación ( $> 24$  años) y bioacumulación en peces. De la misma forma que el DBDPE, el DP se ha propuesto como sustituto de las mezclas DecaBDE en Europa (ECB, 2007). Existen dos estereoisómeros posibles para el DP: *syn-DP* y *anti-DP*. Estos isómeros presentan diferentes propiedades fisico-químicas (OxyChem, 2010), lo que hace suponer un distinto comportamiento en el medio ambiente entre ellos.

Igual que el DP, los Decloranes 602, 603 y 604 están patentados por la empresa OxyChem, patentes 3392136 (Hindersinn y Marciniak, 1968), 3687983 (Dever y Carlson, 1972), 3891599 (Marciniak et al., 1975) y 4388429 (Ilardo y Scharf, 1983) en EE.UU. El Dec 602 y 604 están incluidos en la Lista de Sustancias No Domésticas (Non Domestic substance List, NDSL) de Canadá, lo que significa que aunque no se incluyen en la DSL, Canadá reconoce el comercio internacional de estos compuestos.

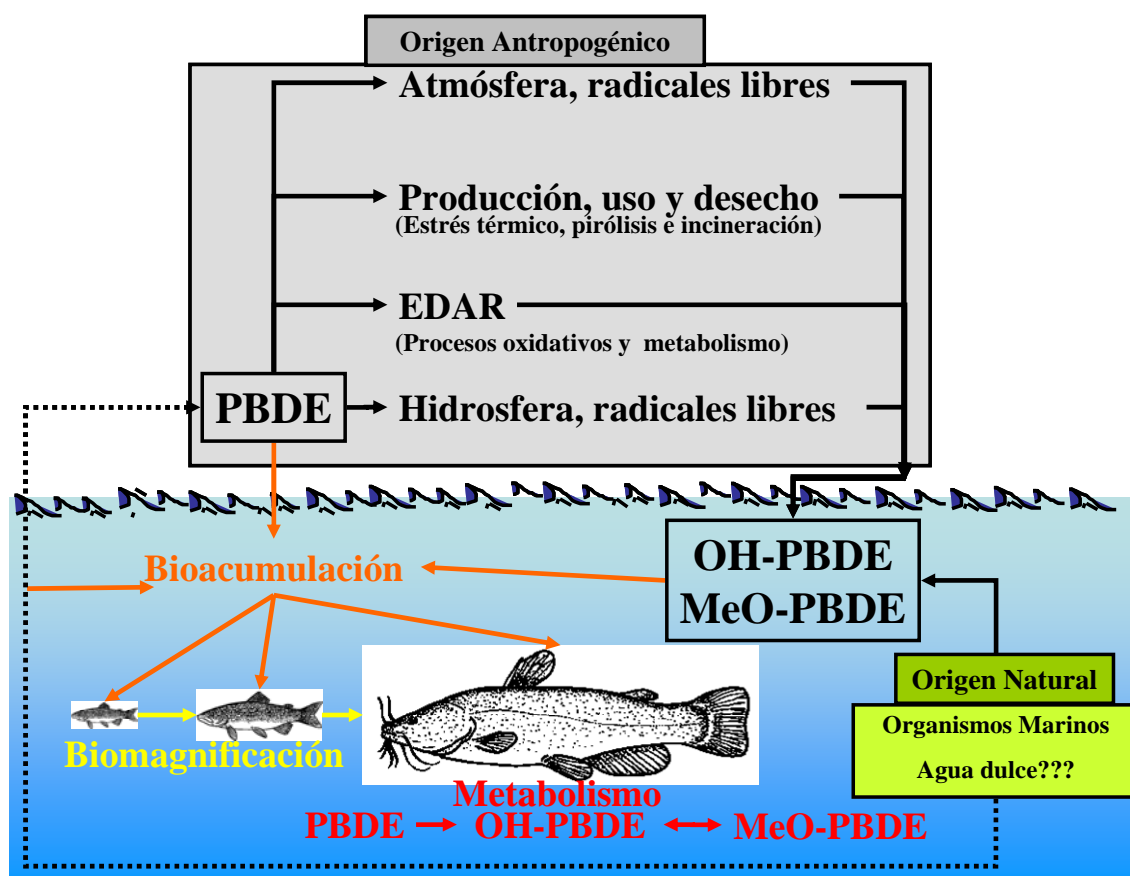
#### Clordano Plus (CP)

El Clordano Plus (CP) está también patentado por la empresa OxyChem, patentes 3392136 (Hindersinn y Marciniak, 1968) y 4388429 (Ilardo y Scharf, 1983), como retardante de llama. Sin embargo, hasta donde el autor conoce no existe información relativa a la producción, comercialización o uso de este compuesto. Se ha detectado como una impureza de las mezclas comerciales de clordano (Dearth y Hites, 1991) pero hasta el presente trabajo su presencia en el medio ambiente no había sido demostrada.

### 1.3.- polibromodifenil éteres metoxilados (MeO-PBDE) y polibromodifenil éteres hidroxilados (OH-PBDE)

Los polibromodifenil éteres metoxilados (MeO-PBDE) y polibromodifenil éteres hidroxilados (OH-PBDE), ver Anexos III y IV, son compuestos análogos a los PBDE, pero a diferencia de éstos, los MeO- y OH-PBDE nunca han sido sintetizados por el hombre (salvo con fines analíticos).

Existen varias alternativas a la hora de evaluar el origen de estos compuestos. Las principales vías de formación y movilización relativas a la presencia de MeO-PBDE y OH-PBDE en el medio ambiente, se muestran en la figura 1.6.



*Figura 1.6. Fuentes de MeO-PBDE y OH-PBDE relativas a las presencia de estos compuestos en el medio ambiente.*

#### *Origen natural*

Numerosos estudios han identificado MeO-PBDE y OH-PBDE como productos generados por organismos marinos (Fu et al., 1995; Handayani et al., 1997; Cameron et al., 2000; Vetter et al., 2001a; Marsh et al., 2004; Kierkegaard et al., 2004a; Teuten et al., 2005; Malmvärn et al., 2005 y 2008). Sin embargo, hasta la fecha no existen evidencias de la

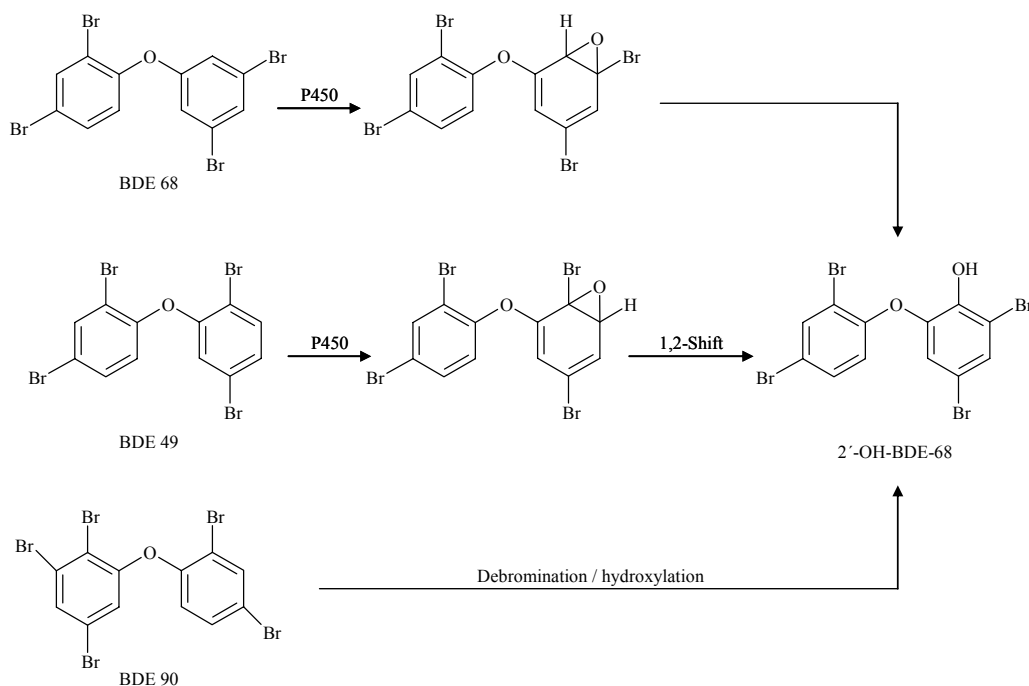
formación de estos compuestos por parte de organismos de agua dulce, cuya disponibilidad de bromo es mucho menor que la de los que se encuentran en el medio marino.

*Origen antropogénico*

Los MeO-PBDE y OH-PBDE también se pueden formar a partir de los PBDE mediante: i) estrés térmico, pirólisis o incineración, ii) reacciones atmosféricas de radicales hidroxilados (OH<sup>•</sup>) o metoxilados(CH<sub>3</sub><sup>•</sup>) y iii) procesos oxidativos incluidos en los tratamientos de aguas residuales (Hanglund et al., 1997; Ueno et al., 2008).

*Origen metabólico*

La presencia de OH-PBDE como metabolitos de PBDE ha sido demostrada en peces (Kierkegaard et al., 2001) y ratones (Örn y Klasson-Wehler, 1998; Malmberg et al., 2005; Marsh et al., 2006; Qiu et al., 2007b) expuestos a mezclas comerciales de PBDE. Incluso Qui et al., 2007b, propusieron tres posibles rutas metabólicas para la formación de OH-PBDE a partir de PBDE: i) derivatización metabólica directa del PBDE precursor, ii) epoxidación del PBDE precursor seguida de desplazamiento del átomo de bromo unido a uno de los carbonos epoxilados y iii) pérdida de bromos e hidroxilación (o viceversa), del PBDE precursor. En la figura 1.7 se proponen tres rutas metabólicas para la formación de 2'-OH-BDE-68 a partir de BDE-68, -49 y -90.

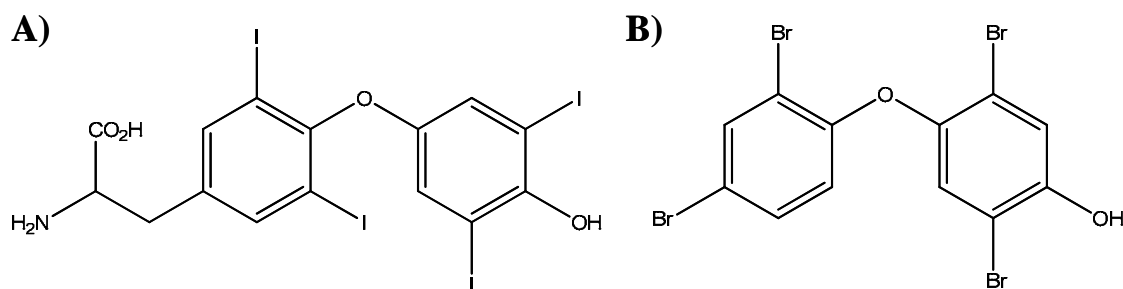


**Figura 1.7.** Rutas metabólicas propuestas para la formación de 2'-OH-BDE-68 a partir de BDE-68, -49 y -90.

En algunos casos existe la posibilidad de que compuestos de origen antrópico o natural sufran metabolismo y generen MeO-PBDE y/o OH-PBDE. En esta línea se encuentran estudios

que proponen: i) la presencia de MeO-PBDE y OH-PBDE en heces de origen animal y humano como resultado del metabolismo de PBDE (Ueno et al., 2008) y ii) la interconversión metabólica entre MeO-PBDE y OH-PBDE (Allard et al., 1987; Wang et al., 2009).

Los MeO-PBDE y OH-PBDE han sido identificados tanto en matrices abióticas: nieve, agua de lluvia y agua superficial de lagos (Ueno et al., 2008), como en matrices bióticas: algas y mejillones (Malmvärn et al., 2005), arenques y salmones (Haglund et al., 1997) y otros peces del medio marino (Asplund et al., 1999; Marsh et al., 2004), mamíferos marinos (van Babel et al., 2001; Vetter, 2001 a y b y 2002; Pettersson et al., 2004; Sinkkonen et al., 2004; Marsh et al., 2005; Stapleton et al., 2006; Wan et al., 2009), peces de agua dulce (Letcher et al., 2003; Kierkegaard et al., 2004; Valters et al., 2005; Houde et al., 2009) y aves (Haglund et al., 1997; Mc Kinney et al., 2006). Estos trabajos demuestran su bioacumulación y biomagnificación llegando incluso a detectarse en humanos (Hovander et al., 2002; Vetter y Jun, 2003; Athanasiadou et al., 2008; Qiu et al., 2009; Lacorte y Ikononou, 2009; Yu et al., 2010). La presencia de MeO- y OH-PBDE en los niveles tróficos más altos suscita gran preocupación por su gran similitud con la hormona tiroxina (T4) (ver figura 1.8.) y hace presuponer mecanismos de disrupción en la homeostasis de esta hormona (Meerts et al., 2001; Malberg, 2004).



**Figura 1.8.** Estructura de A) hormona tiroxina y B) 4'-OH-BDE-49.

## 1.4.- Legislación

### 1.4.1.- Legislación relativa a los retardantes de llama evaluados

Para abordar la legislación concerniente a los compuestos objeto de estudio de esta memoria en nuestro país, cabe la posibilidad de hacerlo bajo dos ámbitos de aplicación que han legislado sobre la producción, comercialización y utilización de retardantes de llama: a escala europea y a escala mundial.

#### Escala europea

En 2003 el Comité Científico de la Toxicidad, la Ecotoxicidad y el Medio Ambiente (CCTEMA) evaluó los riesgos medioambientales de las mezclas PentaBDE y OctaBDE, observando la necesidad de reducir dichos riesgos y destacando la preocupación por los

crecientes niveles de PentaBDE en la leche materna (Fabrellas et al., 2004). Tras estas conclusiones, el Parlamento Europeo y el Consejo aprobó la Directiva 2003/11/CEE que prohíbe comercialización y el uso de las mezclas PentaBDE y OctaBDE, así como de los productos que puedan contenerlos desde 2004.

Desde el 1 de Julio de 2008, la Unión Europea prohibió la utilización de la mezcla DecaBDE en aplicaciones eléctricas y/o electrónicas (EP, 2008). La prohibición se aplica sobre los componentes de este tipo que se fabrican o importan en Europa. Sin embargo, el uso de esta mezcla se permite en otras aplicaciones.

### Escala Mundial

A escala mundial algunos de estos compuestos están regulados bajo el Convenio de Estocolmo (UNEP, 2001). Este convenio fue firmado por 127 gobiernos el 22 de mayo de 2001, y entró en vigor en España el 17 de mayo de 2004 (JE, 2004). En la actualidad, octubre de 2010, lo han firmado 151 gobiernos. Desde su entrada en vigor, los países firmantes, entre los que se encuentra España, se comprometieron a reducir y/o eliminar las emisiones y descargas de los denominados Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP). Estos compuestos se caracterizan por tener: i) propiedades tóxicas, ii) ser resistentes a la biodegradación, iii) bioacumularse y iv) transportarse por el aire, el agua y las especies migratorias a través de las fronteras internacionales, depositándose lejos del lugar de su liberación. En este primer texto del convenio, se listaban 12 COP englobados en la denominada "docena sucia" y clasificados dentro de tres Anexos. En el Anexo A, se listan los compuestos cuya producción, uso, exportación o importación se debe eliminar: Aldrina, Clordano, Dieldrina, Endrina, Heptacloro, Hexaclorobenceno, Mirex, Toxafeno, y Policlorobifenilos. En el Anexo B se recogen los compuestos químicos cuya producción y utilización se debe restringir, con la excepción de su producción o uso contra vectores de enfermedades. En este Anexo sólo se incluye el 1,1,1-Tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano (DDT). En el Anexo C se listan los compuestos sobre los cuales se deben adoptar medidas que reduzcan la producción no intencional de los mismos: policlorodibenzo-p-dioxinas (PCDD) y policlorodibenzo furanos (PCDF), hexaclorobenceno y policlorobifenilos (PCB).

Un punto importante del Convenio de Estocolmo es el recogido en el Artículo 8 y Anexo D, donde se detallan la metodología a seguir y los requisitos de información y criterios de selección, para la propuesta de inclusión de un producto químico en los Anexos A, B y/o C. Básicamente estos criterios son: i) correcta identificación del compuesto ii) demostrada persistencia ( $t_{1/2} > 2$  meses en agua y  $t_{1/2} > 6$  meses en tierra), iii) demostrada bioacumulación ( $\log K_{ow} > 5$ ), iv) demostrado transporte a larga distancia y v) demostrada toxicidad.

A lo largo de la realización de los estudios que han finalizado con la elaboración de esta memoria se ha producido un hecho histórico que ha supuesto la reciente inclusión de 9 nuevos compuestos en el convenio en mayo de 2009 (COP4, 2009). Entre estos nuevos COP se incluyen los tetra-, penta-, hexa- y hepta-BDE, compuestos a los cuales se les dedica gran parte de este estudio. Este hecho ha servido para poner de manifiesto y refutar la necesidad de abordar

la problemática analítica y ambiental que presentan estos compuestos en España. De la misma forma, el presente trabajo demuestra la presencia de otros retardantes, algunos propuestos como sustitutos de PBDE (DBDPE y DP; (ECB, 2007)) y otros (Declorane 602, 603, 604 y Clorodano Plus), cuya presencia en el medio ambiente unida a su demostrada persistencia, bioacumulación y toxicidad (U.S. EPA, 2004; Gauthier et al., 2007; Tomy et al., 2008; Muir et al., 2009; Ren et al., 2009; Shen et al., 2010; Sverko et al., 2010) indica que deben ser considerados como contaminantes emergentes del siglo XXI.

#### **1.4.2.- Legislación relativa a la gestión de lodos de EDAR en España**

Como se explica en el siguiente capítulo, la mayor parte de esta investigación se ha realizado sobre lodos de depuradora, consecuentemente se hace necesario en este punto revisar la normativa que atañe a dicha matriz en España y Europa.

En España los lodos que se generan en las estaciones de depuración de aguas residuales (EDAR) son considerados residuos y por tanto se les aplica la Ley 10/1998, de 21 de abril, de residuos. Tanto en el anterior Plan Nacional de Lodos de Depuradora (PNLD, 2001) como en el actual (MARM, 2009a) se establece el orden de prioridad en que se debe decidir el destino final de los lodos. Este orden es el siguiente: i) la aplicación al suelo con fines de fertilización y reciclaje de los nutrientes y la materia orgánica, ii) la valorización energética en todas sus variantes, incluida la biometanización y iii) el depósito en vertederos. En este último plan se recoge que alrededor del 65 % de los lodos que se generaron en España en 2005 se emplearon en agricultura (MARM, 2009a).

El uso de lodos de depuradora de origen doméstico como enmienda orgánica esta regulado por la Directiva Europea 86/278/CEE, la cual se incorporó a la legislación española mediante el Real Decreto 1310/1990. En esta directiva se prohíbe el empleo de lodos sin tratar, salvo en los casos de inyección directa o enterramiento en el suelo, si lo autorizan los Estados Miembros (en España no está autorizado) y se establecen niveles máximos de concentración en lodo para metales pesados. Sin embargo, desde finales de los 90, la Unión Europea ha ido elaborando documentos de trabajo sobre una posible revisión de dicha Directiva, en los que se han ido incluyendo niveles máximos de concentración para compuestos orgánicos, entre los que se encuentran algunos COP: PCB, PCDD y PCDF ; EU, 2000). No obstante hay que destacar, que a fecha de realización de esta memoria, noviembre de 2010, no se han establecido niveles máximos en lodos aplicados a la agricultura, para ninguno de los contaminantes analizados en este estudio.



## **CAPÍTULO 2.- OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**



## **CAPÍTULO 2.- OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**

### **2.1.- Objetivos Generales**

Considerando lo descrito hasta ahora y en especial la reciente inclusión de algunos PBDE en el Anexo A del Convenio de Estocolmo (COP4, 2009), ha quedado patente que los retardantes de llama constituyen una serie de contaminantes orgánicos persistentes, cuyas peculiaridades toxicológicas y bioacumulativas justifican la necesidad de su control y seguimiento. Por lo tanto, es de primordial importancia evaluar la dispersión y fuentes de estos contaminantes en el medio ambiente, mediante el estudio de sus niveles ambientales y de los perfiles isoméricos de contaminación. Con este punto de partida se han propuesto dos objetivos en la realización de este trabajo.

1. Evaluar la presencia y utilización de polibromodifenil éteres (PBDE) y otros retardantes de llama halogenados emergentes (DBDPE, DP, Dec 602, Dec 603, Dec 604 y CP) en España, seleccionando una matriz integradora, que recoja los procesos de lixiviación de estos compuestos durante la producción, uso y desecho de los materiales manufacturados que los contienen.
2. Investigar la presencia de PBDE, MeO-PBDE y OH-PBDE en muestras biológicas, evaluando sus fuentes y estudiando el aporte debido a bioacumulación y/o metabolismo en las concentraciones de MeO-PBDE y OH-PBDE obtenidas.

### **2.2.- Objetivos específicos y plan de trabajo**

A partir de los dos objetivos anteriores se propone la realización de los siguientes objetivos específicos a través del siguiente plan de trabajo:

#### **OBJETIVO 1**

Para la realización de esta parte del estudio se ha seleccionado como matriz, lodos de estaciones de depuración de aguas residuales (EDAR) españolas. A las EDAR llegan residuos de tipo doméstico, comercial y/o industrial que se lixivian de los productos que los contienen durante su producción, uso y/o desecho. Una vez en la EDAR y teniendo en cuenta que los coeficiente de partición octanol agua ( $K_{ow}$ ) de los compuestos de interés (PBDE, DBDPE y Decloranes) son superiores a 4 (ver tabla 1.1) quedarán absorbidos al material particulado, concentrándose en el lodo.

Para la consecución de este objetivo se proponen los siguientes objetivos específicos:

- 1.1.- Puesta a punto de metodologías de análisis de PBDE, incluyendo las etapas de extracción, purificación y análisis instrumental, en lodos de depuradora.

- 1.2.- Aplicación del método desarrollado a muestras reales.
- 1.3.- Evaluación de la presencia de retardantes de llama emergentes (DBDPE, DP, Dec 602, Dec 603, Dec 604 y CP) en lodos de depuradora. Desarrollo de la metodología analítica necesaria y aplicación a muestras reales.
- 1.4.-Análisis de los resultados obtenidos: i) evaluación de la utilización de las distintas mezclas comerciales de PBDE y de otros retardantes emergentes (DBDPE y Decloranes) en la industria española, a través de las posibles correlaciones entre el contenido de estos compuestos en el lodo y el porcentaje de efluente industrial reconocido por las EDAR en su corriente de entrada y ii) evaluación de la influencia de las características de las EDAR así como de los procesos englobados en la línea de aguas y de lodos, en el contenido final de retardantes de llama del lodo.

Los trabajos necesarios para el cumplimiento de este objetivo se han realizado en el Grupo de Contaminantes Orgánicos Persistentes, del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) y en colaboraciones con el Canadian Center of Inland Waters (CCIW, Environment Canada, Burlington, Canadá) y el Laboratory Service Branch (MOE, Ontario Ministry, Toronto, Canadá).

## **OBJETIVO 2**

Para la realización de este objetivo se ha seleccionado, como matriz, plasma de peces gato (*Ameiurus nebulosus*) del lago Ontario. Aunque esta especie puede habitar en ecosistemas marinos, la selección de ejemplares de agua dulce evita en gran medida el aporte de PBDE, MeO-PBDE y OH-PBDE de origen natural y por tanto hace posible la evaluación de la influencia de los procesos antropogénicos.

Para la consecución de este objetivo se proponen los siguientes objetivos específicos:

- 2.1.- Puesta a punto de la metodología de análisis de PBDE, MeO-PBDE y OH-PBDE en plasma de peces, incluyendo las etapas de extracción, purificación, fraccionamiento y análisis instrumental.
- 2.2.- Aplicación del método desarrollado a muestras reales.
- 2.3.- Análisis de los resultados obtenidos, evaluando las fuentes potenciales de MeO-PBDE y OH-PBDE en plasma de pez gato del lago Ontario.

Los trabajos necesarios para el cumplimiento de este objetivo se han realizado en colaboración entre el Grupo de Contaminantes Orgánicos Persistentes, del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) y el Canadian Center of Inland Waters, (CCIW, Environment Canada, Burlington, Canadá).

Acciones	2006		2007		2008		2009		2010	
Planteamiento de problemas de investigación y diseño metodológico	■	■								
Objetivo 1.1		■								
Objetivo 1.2		■	■							
Objetivo 1.3				■			■	■	■	
Objetivo 1.4			■	■	■	■	■	■		
Objetivo 2.1					■	■				
Objetivo 2.2					■	■				
Objetivo 2.3						■	■			
Elaboración de la memoria									■	■
Discusión y conclusiones										■
Revisión de borradores y depósito de Tesis										■
Defensa de Tesis										■

**Tabla 2.1.** Cronograma relativo a las diferentes fases que conforman el presente estudio.



## **CAPÍTULO 3.- METODOLOGÍA ANALÍTICA**





## CAPÍTULO 3.- METODOLOGÍA ANALÍTICA

### 3.1.- Introducción

Hasta la fecha, el conocimiento sobre estos compuestos, su presencia, comportamiento y destino en el medio, es muy limitado. Sin embargo, en los últimos cinco años, han aparecido multitud de trabajos que desarrollan procesos de análisis basados principalmente en métodos establecidos para otros contaminantes orgánicos persistentes (COP) como pueden ser las PCDD y PCDF (Eljarrat y Barceló, 2004). Al mismo tiempo se han organizado varios ejercicios intercomparativos internacionales en los que se han incluido los PBDE como objeto de estudio. En el primer ejercicio interlaboratorio de PBDE a escala mundial, celebrado entre 1999 y 2000, los resultados para el BDE-47 fueron aceptables, pero los obtenidos para el BDE-99, -100, -153 y -154 señalaron que era necesario realizar mayores esfuerzos en su determinación (de Boer y Cofino, 2002). Además este estudio evidenció grandes problemas en la determinación del BDE-209. Sin embargo, hay que reconocer que a medida que los laboratorios han trabajado en sus métodos los resultados han ido mejorando, pero no llegan aún a tener la calidad necesaria como para producir datos fiables que brinden la oportunidad de evaluar la dispersión de estos compuestos en el medio (Takahashi et al., 2006).

La mayoría de los métodos desarrollados para analizar retardantes de llama halogenados utilizan en la etapa final de determinación y medida la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS). Este hecho encarece considerablemente el análisis y hace poco viable la implantación del método en laboratorios de rutina, los cuales no pueden asumir el gasto derivado de la adquisición de este tipo de equipos, su mantenimiento y la formación del personal que vaya a utilizarlos. Teniendo en cuenta que en general los retardantes de llama halogenados se encuentran en concentraciones muy superiores a las PCDD/F, se hace necesaria la evaluación y diseño de métodos basados en la espectrometría de masas de baja resolución (LRMS) para su determinación. Sin embargo y considerando que el diseño del método de análisis debe basarse en el estudio pormenorizado de la matriz a analizar y de los medios disponibles en el laboratorio, cabe la posibilidad de que sea necesaria la utilización de la HRMS, cuando los niveles del analito a determinar se encuentren por debajo de los límites de detección de LRMS o sea necesario recurrir a la alta selectividad de los equipos HRMS.

Igual que en el caso de las dioxinas y furanos, en el estudio de los retardantes de llama la parte analítica es de vital importancia. El análisis en este caso es una tarea difícil y compleja, principalmente por tres motivos (Casanovas et al., 1996).

- Necesidad de desarrollar métodos capaces de analizar estos compuestos en diferentes matrices tanto abióticas (en nuestro caso, lodos de depuradora), como bióticas (plasma de peces).

- Necesidad de determinación de estos contaminantes en niveles de ultratrazas: entre ppb (ng/g para PBDE, DBDPE y DP en lodos) y ppt (pg/g para Dec 602, 603, Mirex y CP en lodos y MeO- y OH-PBDE en plasma de peces).
- Presencia de compuestos interferentes en las matrices en concentraciones mucho más elevadas que los analitos.

Para superar estos escollos, el diseño de los métodos de análisis encaminados a la detección y determinación de estos contaminantes tiene que implementar, de una forma rigurosa, las siguientes bases:

- Extracción de los analitos de la muestra de la forma más selectiva y cuantitativa posible.
- Aplicación de metodologías de purificación rigurosas y selectivas para la purificación de los extractos y separación, por métodos físico-químicos, de los compuestos a analizar del resto de sustancias interferentes co-extraídas.
- Separación de los diferentes congéneres e isómeros mediante cromatografía de gases de alta resolución (HRGC).
- Detección sensible y selectiva de los distintos analitos mediante la utilización de la espectrometría de masas por alta (HRMS) y baja resolución (LRMS).
- Cuantificación exacta, por el método de dilución isotópica, cuando sea posible, sobre la base de la utilización de factores de respuesta obtenidos con los correspondientes congéneres marcados isotópicamente con  $^{13}\text{C}$ .

De la necesidad de cumplir estos fundamentos surgen métodos de análisis largos y complejos, donde se pueden diferenciar fundamentalmente tres etapas:

- Extracción
- Purificación
- Determinación Instrumental

En los siguientes apartados se describen los procedimientos de: extracción, purificación y determinación instrumental que se utilizaron en los distintos estudios que componen esta memoria.

### **3.2.- Extracción**

El objetivo de esta primera etapa se basa en la extracción de los compuestos de interés de la matriz que se esté analizando y su transferencia a un disolvente orgánico. La selección de

la técnica de extracción está condicionada por el tipo de matriz objeto de estudio. En este trabajo se han utilizado dos tipos de matrices, lodos de depuradora y plasma de peces. En el primer caso se realizó una extracción sólido-líquido optimizada en un equipo de Fluidos Presurizados (PLE). En el caso del plasma de peces se realizó una extracción líquido-líquido.

En función del tipo de muestra y de las condiciones en las que se encuentre, puede ser necesario realizar algún pretratamiento como paso previo a la extracción, para asegurar la homogeneidad del extracto que se va a analizar. Por ejemplo, en el caso de los lodos es necesario asegurarse de que la muestra está totalmente seca. Para ello, la muestra se debe secar a temperatura ambiente o en estufa a 40 °C, hasta conseguir una pesada constante. Una vez que la muestra está seca es conveniente triturarla para aumentar la superficie de contacto con el disolvente de extracción, facilitando de esta forma la desorción de los analitos hacia el disolvente.

Como ya se ha comentado anteriormente, en el diseño de este tipo de métodos de análisis es necesario prever las características de todas las etapas. En este sentido, en el pretratamiento de la muestra hay que tener en cuenta la forma en la que se va a realizar la determinación final. Cuando para la cuantificación se utiliza el método de disolución isotópica, se debe añadir a la muestra una concentración conocida de isómeros marcados con  $^{13}\text{C}$ . Este método permite calcular la recuperación de los compuestos marcados y evaluar la calidad del análisis, asumiendo que los analitos marcados con  $^{13}\text{C}$  se comportan igual que los nativos  $^{12}\text{C}$  presentes en las muestras.

Cuando es posible, la elección del tamaño de muestra se realiza a través de una búsqueda bibliográfica, que permite estimar los niveles de analito que se van a encontrar en la muestra problema. A partir de estos niveles y teniendo en cuenta la sensibilidad de la técnica instrumental elegida para la identificación de los analitos, se debe definir el tamaño de muestra requerido para el análisis. Cuando el análisis se centra en algún contaminante emergente, del que no se dispone de datos bibliográficos, como es el caso del análisis de DBDPE y Decloranes, la cantidad de muestra se debe definir a partir de la presencia de otros contaminantes relacionados con los de interés de los que sí se tienen datos.

A continuación se muestran los métodos de extracción utilizados en este estudio.

#### Extracción con Fluidos Presurizados (PFE)

Como respuesta a los inconvenientes asociados a la extracción mediante Soxhlet (altos tiempos de procesado, 24 h y gran consumo de disolventes, 400 ml), en el presente trabajo se ha optimizado una técnica nueva basada en la Extracción mediante Fluidos Presurizados (PFE) para lodos de depuradora. En la figura 3.1 se muestra el equipo utilizado.

La extracción mediante fluidos presurizados presenta como ventaja la posibilidad de trabajar en condiciones de presión (10 - 14 MPa) y temperatura (50 - 200 °C) elevadas, lo que favorece la solubilidad de los analitos, su desorción de la matriz y su difusión al disolvente

(Bjorklund et al., 2006). De este modo se consigue disminuir el tiempo necesario para realizar una extracción cualitativa (40 min) y se consume mucho menos disolvente (30 ml).

Cuando se trabaja con determinadas matrices, como puede ser el caso de los lodos de depuradora, las muestras pueden contener azufre elemental el cual es lo suficientemente soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos como para hacer necesaria su eliminación antes del análisis instrumental de las muestras (Hess et al., 1995). El azufre se puede eliminar mediante la formación de sulfuros de cobre ( $S_xCu_y$ ) (Mc Donald et al., 1992) añadiendo cobre en la celda de extracción



*Figura 3.1. Equipo de extracción mediante fluidos presurizados ASE 100.*

#### Extracción Líquido-Líquido

En el caso de muestras líquidas el método clásico empleado es la extracción líquido-líquido, que se basa en el reparto de los analitos entre dos líquidos inmiscibles. Con este método se extraen todas las sustancias hidrófobas mediante tratamiento con un disolvente apolar (hexano, éter etílico, éter de petróleo, etc.) o con mezclas de ellos.

### **3.3.- Purificación y/o fraccionamiento**

Aunque las metodologías de extracción desarrolladas tratan de realizar extracciones selectivas de los analitos de interés, siempre se extraen junto a éstos, sustancias interferentes que presentan características similares a las de dichos analitos, en cuanto a solubilidad en el extractante y que pueden interferir en las siguientes etapas de separación, identificación y cuantificación. Las técnicas de purificación pueden llevar asociadas etapas de fraccionamiento, las cuales resultan de gran interés cuando se pretenden analizar distintos analitos que pueden presentar interferencias en la determinación instrumental.

La efectividad con la que se realice este proceso influirá directamente en la sensibilidad de la medida final. Cuanto más limpio se encuentre el extracto menor presencia de interferencias habrá y disminuirá el fondo de señal en la medida “Ruido”, mejorando así la

relación Señal / Ruido y ganando sensibilidad en el método. Como desventaja, el aumento de la purificación implicará un mayor consumo de disolvente, mayores tiempos de procesado y por tanto mayor coste. Por este motivo, se debe llegar a un equilibrio, en el que a partir del estudio de: i) la matriz de la muestra, ii) la naturaleza y cantidad de los analitos y iii) las características de la técnica elegida para el análisis instrumental, se diseñen y optimicen las distintas etapas de purificación. Por ejemplo, para el análisis de DP en lodos de depuradora, tal y como se muestra en los capítulos 4 y 5 de esta memoria, el extracto sólo se purifica con una pequeña columna de sílice neutra y ácida. Esto se debe a que en su análisis no se realiza ningún fraccionamiento, dado que sólo se mide DP y la técnica instrumental elegida para su determinación es HRGC-MS/ECNI que resulta muy selectiva y sensible para este compuesto.

A continuación se muestran los métodos de limpieza o purificación utilizados en esta memoria:

#### Deshidratación oxidativa (Tratamiento con ácido sulfúrico)

En el caso del análisis de lodos de depuradora se hace necesaria la eliminación de la materia orgánica, lípidos e incluso proteínas que pueda contener el extracto (Eljarrat y Barceló 2004). Por ello se realizó un tratamiento de deshidratación oxidativa, con ácido sulfúrico concentrado (Hess et al., 1995) el cual se añade directamente sobre el extracto en un disolvente no polar (hexano). La muestra se agita para facilitar el contacto entre las fases y se deja reposar. En la parte inferior del embudo de decantación se deposita la fase acuosa con mayor densidad, resultante de la carbonización de la materia orgánica y en la parte superior queda el extracto purificado, ver figura 3.2.



**Figura 3.2.** Tratamiento con ácido sulfúrico concentrado de un extracto de lodos de EDAR.

#### Cromatografía de adsorción sólido-líquido en columna a presión atmosférica

En este estudio se han realizado purificaciones y/o fraccionamientos en columnas rellenas con distintos adsorbentes o fases y eluidas a presión atmosférica. Las fases utilizadas han sido: sílice, alúmina, Florisil<sup>®</sup> y carbón activo.

Normalmente los adsorbentes se han modificado con bases o ácidos, adquiriendo las propiedades de los compuestos químicos con los que se modifican. Por ejemplo, cuando la sílice se modifica con ácido sulfúrico, actúa como un intercambiador de cationes, reteniendo compuestos básicos y eliminando otros a través de reacciones de deshidratación, mediante condensaciones catalizadas por ácidos y por oxidaciones (Smith et al., 1984).

En el caso del análisis de MeO- y OH-PBDE se utilizó la fase comercial Florisil<sup>®</sup>. Esta fase está compuesta de sílice modificada (SiO<sub>2</sub>-MgO) y se utilizó para separar los MeO-PBDE de los OH-PBDE. El Florisil<sup>®</sup> adsorbe compuestos polares, mediante interacciones de los grupos hidroxilo y oxígeno (de Voogt, 1994), reteniendo compuestos fenólicos (OH-PBDE) que se recuperan eluyendo la columna con un disolvente más polar.

Independientemente del adsorbente utilizado, la columna se acondiciona haciendo una elución previa con el mismo disolvente que se utiliza para eluir los analitos. De esta forma no sólo se acondiciona la columna sino que además se facilita la compactación de la misma.

La figura 3.3 muestra una imagen de purificación de un extracto mediante separación cromatográfica utilizando una columna de sílice ácida modificada.

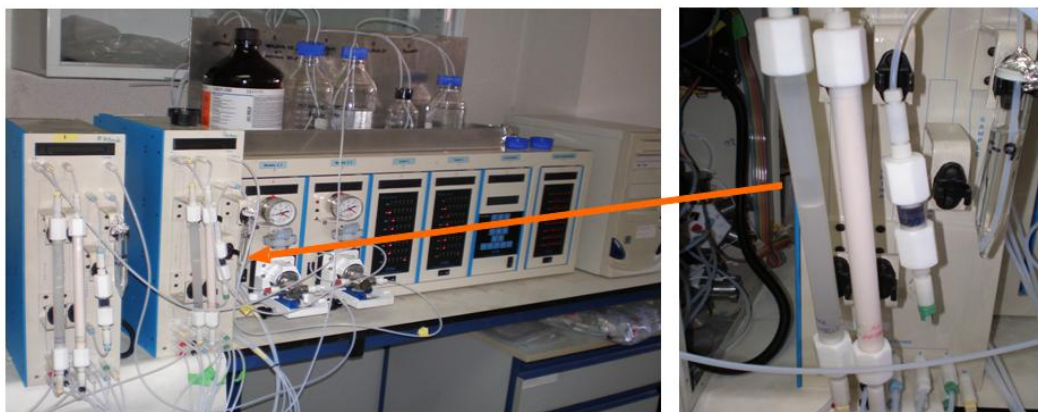


**Figura 3.3.** Purificación del extracto mediante separación cromatográfica en una columna de sílice ácida modificada.

#### Purificación Automatizada

El principal inconveniente de las técnicas de purificación descritas anteriormente, es el tiempo necesario para llevarlas a cabo. Un lodo que se ha extraído por ASE en 40 min puede tardar hasta dos días en pasar tratamiento ácido y columna de sílice modificada. Para poder solventar este cuello de botella se ha optimizado un método de purificación automatizada mediante FMS<sup>®</sup> (Fluid Management System), ver figura 3.4. Esta técnica permite introducir los extractos a presión, a través de columnas comerciales. En este equipo se utilizan columnas empaquetadas en tubos de teflón: sílice multicapa (ácida, básica y neutra), alúmina básica y carbón activo (PX-21). La elección de disolventes con la adecuada polaridad y las diferencias en cuanto a planaridad de los analitos, permite la separación simultánea de los distintos

compuestos (PCDD, PCDF, PCB, PBDE, DBDPE y Decloranes). Igual que en el apartado anterior (*Cromatografía de adsorción sólido-líquido en columna a presión atmosférica*), la separación se basa en: i) las interacciones que establecen los centros activos de los adsorbentes modificados con las moléculas de analito (Sílice multicapa y alúmina básica) y ii) la capacidad del carbón para retener moléculas planas, especialmente aquellas con anillos aromáticos adyacente y átomos electronegativos (PBDE, DBDPE, PCDD/F, no orto PCB) siendo necesaria la elución de estas columnas en flujo inverso con un disolvente plano (tolueno) para recuperar estos analitos de manera cuantitativa (Focant et al., 2004).



**Figura 3.4.** Equipo de purificación automatizada, Fluid Management System (FMS)<sup>®</sup> y detalle de las columnas utilizadas, de izquierda a derecha: sílice multicapa, alúmina y carbón.

### 3.4.- Análisis instrumental

Mediante la aplicación rigurosa de las etapas anteriores se consigue un extracto purificado en el que se deben encontrar mayoritariamente los analitos de interés. El problema a resolver ahora es la necesidad de detectar y cuantificar unos congéneres determinados, dentro de todos los presentes en el extracto. La complejidad de la muestra en este paso es aún bastante alta, por ejemplo si se analizan PBDE podemos enfrentarnos al análisis de hasta 209 congéneres, que se pueden convertir en 900 en el caso de los MeO- y OH-PBDE. Por este motivo será necesario realizar un último paso de separación cromatográfica antes de la detección y medida.

#### 3.4.1.- Cromatografía de gases de alta resolución en columnas capilares

La separación cromatográfica de los analitos se presenta como un paso clave en la determinación final de los mismos. En esta etapa del proceso se pretenden separar de la forma más completa posible los distintos congéneres. Para ello se han optimizado los parámetros que comprenden: i) la inyección de la muestra, ii) rampas de temperatura de la columna y iii) temperatura de la línea de transferencia y fuente del espectrómetro de masas.

La inyección de la muestra en el cromatógrafo se realiza mediante un puerto de inyección, en el que la muestra líquida se evapora y se introduce en la columna gracias al flujo de un gas portador. Este paso es de vital importancia cuando se analizan compuestos susceptibles de degradación (BDE-209 (de Boer y Wells, 2006) y Decolorane 605 (Sverko et al., 2008)).

Para la realización de los trabajos descritos en este documento se han utilizado columnas tubulares abiertas o capilares, con soporte de sílice fundida. En todos los experimentos se ha utilizado una columna no polar, DB-5-MS que posee una fase estacionaria (5%-fenil-metilpolisiloxano). Los PBDE eluyen en columnas apolares de menor a mayor grado de bromación. De esta forma se pueden establecer ventanas cromatográficas, definidas por el tiempo en el que eluyen de la columna conérgenes con el mismo grado de bromación. Al trasladar estas ventanas al espectrómetro de masas, se diseñan segmentos en función del grado de bromación, disminuyéndose el número de masas que éste tiene que barrer y por tanto aumentando el tiempo de barrido en cada una, lo que supondrá un aumento en la sensibilidad del análisis. Además, el uso de columnas no polares permite la utilización de temperaturas más altas en el horno, lo que significa métodos cromatográficos más cortos, menores tiempos de residencia y, consecuentemente, una disminución en la degradación de analitos susceptibles de sufrirla (BDE-209 y Decolorane 605).

### **3.4.2.- Identificación y cuantificación**

Éste es el paso final del análisis en el cual se trata de detectar y cuantificar los compuestos que eluyen de la columna cromatográfica. La optimización de esta etapa depende del equipo que se utilice y más concretamente de las características del detector y del modo de ionización en el que se trabaje.

La espectrometría de masas es la técnica más adecuada para conseguir la selectividad y sensibilidad necesaria para analizar retardantes de llama en muestras ambientales. En la selección de las distintas técnicas de espectrometría de masas recogidas en esta memoria, se ha tenido en cuenta los niveles de analito a determinar, utilizándose la espectrometría de masas de baja resolución (LRMS) para niveles altos de analito (ppb; ng/g) y la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) para niveles más bajos (ppt; pg/g). En ambos casos, los métodos se han diseñado y optimizado buscando: i) la máxima selectividad, ii) capacidad para distinguir compuestos que coeluyen al no separarse cromatográficamente y iii) la máxima sensibilidad, tratando de obtener para cada analito la mayor relación Señal / Ruido posible.

Tanto por alta como por baja resolución los espectrómetros funcionan básicamente en tres etapas: ionización, análisis y detección. En el primer paso las moléculas que eluyen de la columna cromatográfica son ionizadas y seguidamente los iones generados se expulsan de la fuente hacia la parte del analizador. En el analizador dichos iones se separan en función de su relación masa/carga mediante la aplicación de campos eléctricos y/o magnéticos. Por último los

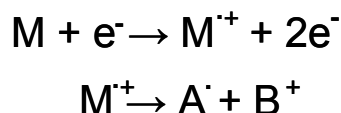


iones separados se detectan consecutivamente generándose el espectro de masas (Esteban, 1993).

En los trabajos experimentales descritos en esta memoria se han utilizado técnicas basadas en la ionización electrónica (EI) y en la ionización química (CI), con analizadores de tipo cuadrupolo, triple cuadrupolo y sector magnético (triple sector). Los resultados obtenidos están influenciados por el diseño de los equipos y su modo de funcionamiento. Por este motivo, a continuación se resumen las principales características de los modos de ionización y analizadores utilizados en el presente estudio.

### 3.4.2.1.- Ionización electrónica (EI)

En cualquiera de las técnicas de ionización utilizadas en este estudio, un filamento incandescente emite electrones al aplicar entre él y el colector o ánodo un determinado voltaje. En el caso de la ionización electrónica, se suele aplicar un voltaje de 70 V y por tanto se generan electrones de 70 eV. Cuando estos electrones pasan cerca de las moléculas neutras que eluyen de la columna, les transmiten suficiente energía como para arrancar un electrón y formar iones moleculares positivos (Davis y Freason, 1987).



*Figura 3.5. Esquema de la ionización electrónica.*

En función de la energía electrónica se producirán unos u otro iones. Si ésta es superior al potencial de ionización de las moléculas se producirá el ión molecular. En el caso de que la energía electrónica sea muy superior al potencial de ionización del ión molecular, éste dispondrá de ese exceso de energía como energía vibracional, lo que podrá provocar la ruptura de enlaces en el mismo. De esta manera se puede obtener la fragmentación del ión molecular, tal y como se muestra en la figura 3.5. Este hecho se puede reducir disminuyendo el voltaje, lo que hará que decrezcan las fragmentaciones, pero también disminuirá la cantidad de moléculas ionizadas. Los iones formados, fragmentos positivos, son expulsados de la fuente mediante un potencial positivo aplicado a una placa repulsora.

La ionización electrónica se utiliza para la determinación de PBDE, DBDPE, Decloranes 602, 603, 604, CP, MeO-PBDE y OH-PBDE en este estudio, capítulos 4 y 5 de la presente memoria.

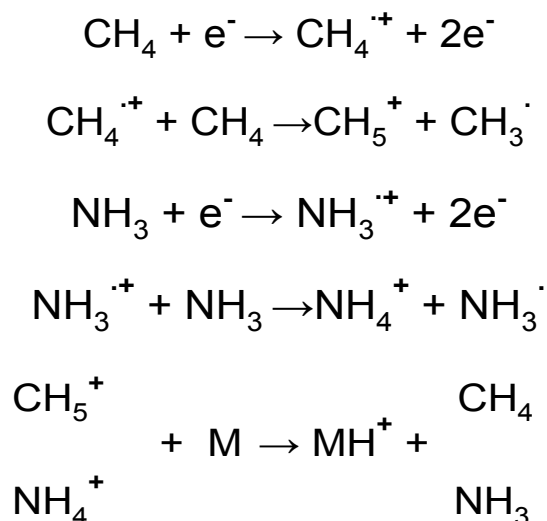
En algunos casos puede ser interesante trabajar con otro tipo de ionización más suave para disminuir la fragmentación, como puede ser la ionización química.

### 3.4.2.2.- Ionización química (CI)

La ionización química es una técnica de ionización suave, caracterizada por la presencia de un gas que puede funcionar como gas reactivo o moderador en función del tipo de ionización que se produzca.

#### 3.4.2.2.1.- Ionización Química Positiva (PCI)

En este caso la ionización se produce en varios pasos. En primer lugar los electrones emitidos por el filamento (~ 70 eV) ionizan el gas que se encuentra en una proporción mucho más alta que la de la muestra en la celda de ionización (~ 10<sup>4</sup>:1) (Mc Lafferty y Turecker, 1993). Como la celda está llena de este gas, los iones de gas reactivo que se forman reaccionan a su vez con moléculas neutras del mismo, formándose en cadena iones de gas reactivo (CH<sub>5</sub><sup>+</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Estos iones reactivos son fuertes ácidos de Brønsted y por tanto ionizan fácilmente las moléculas neutras que eluyen de la columna, mediante transferencia protónica (Kitson et al., 1996), ver figura 3.6.

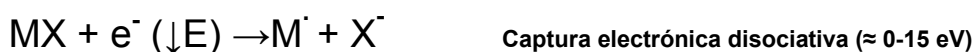
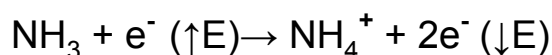


**Figura 3.6.** Esquema de la ionización del gas (CH<sub>4</sub> y NH<sub>3</sub>), formación del gas reactivo (CH<sub>5</sub><sup>+</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y posterior ionización molecular de los analitos mediante transferencia protónica.

La reacción de protonización molecular vendrá definida por la facilidad del gas reactivo para ceder el protón. De esta forma, a medida que aumente la afinidad protónica (PA) del gas, o lo que es lo mismo, disminuya la acidez del mismo, la ionización molecular será menos energética y por tanto disminuirá la fragmentación. Teniendo en cuenta que la PA del CH<sub>5</sub><sup>+</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> es 127 y 207 Kcal/mol (Esteban, 1993), respectivamente, se puede suponer que la ionización será más blanda con el amoníaco, disminuyendo las fragmentaciones y aumentando en general la sensibilidad para el ión molecular.

### 3.4.2.2.2.- Ionización química negativa por captura electrónica (ECNI)

En la ionización química se pueden producir iones negativos mediante captura electrónica. En este caso, se aumenta la presión de gas en la celda y consecuentemente se aumentan las probabilidades de que los electrones primarios (aquellos que se generan en el filamento) y secundarios (producidos a partir de la ionización del gas) colisionen con más partículas de gas, de forma que van perdiendo energía hasta llegar a intervalos de baja energía o energía térmica (< 20 eV) (Kitson et al., 1996). Una vez generados los electrones de baja energía, las moléculas con alta afinidad electrónica (como aquellas que contienen grupos electronegativos, en nuestro caso Br y Cl), son capaces de capturar estos electrones con una alta eficiencia, produciéndose la captura electrónica, molecular o disociativa, ver figura 3.7. Este tipo de ionización, basado en la interacción electrón-molécula puede resultar más sensible que la PCI, basada en interacción ión-molécula, dado que los electrones se pueden mover con mayor libertad, es decir, más rápido que los iones dentro de la fuente (Harrison, 1983). Este hecho hace que aumente la probabilidad de que se produzca la colisión y consecuentemente aumenta la sensibilidad de la técnica.



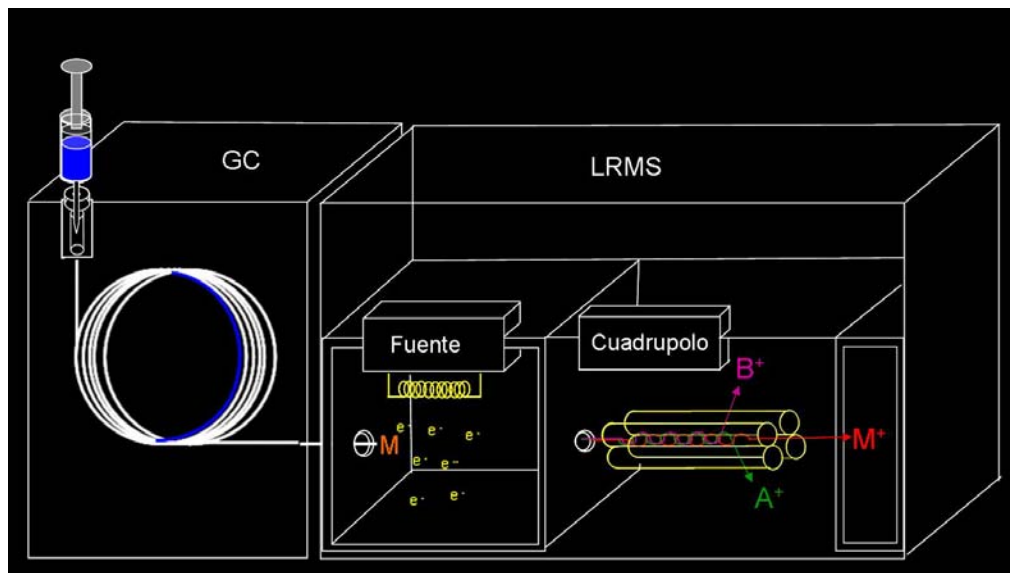
*Figura 3.7. Esquema de los procesos comprendidos en la ionización química negativa por captura electrónica (ECNI). Generación de electrones de baja energía y procesos de captura electrónica molecular.*

La ECNI se ve favorecida en compuestos halogenados, como pueden ser los retardantes de llama bromados y clorados, dada la elevada electronegatividad de los heteroátomos que contienen (Br y Cl). En este tipo de ionización el gas no se considera reactivo, sino moderador, ya que absorbe el exceso de energía que se genera en la reacción. Al contrario de los procesos descritos anteriormente (EI y PCI), se establece un potencial eléctrico negativo sobre la placa repulsora para expulsar los iones negativos de la fuente hacia el analizador.

A continuación se describen los analizadores empleados en este estudio.

### 3.4.2.3.- Analizador cuadrupolar

Este sistema consta de cuatro barras de sección teóricamente elíptica colocadas paralelamente entre sí y equidistantes del centro del espacio que dejan entre ellas.



**Figura 3.8.** Esquema de un analizador cuadrupolar acoplado a un cromatógrafo de gases.

Mediante la aplicación de distintos voltajes de corriente continua (DC) y de radiofrecuencia (RF) en cada pareja de barras opuestas, se consiguen trayectorias oscilantes estables para los iones de interés, atravesando éstos el espacio contenido entre las barras y llegando al detector (Esteban, 1983). Los cuadrupolos trabajan a una resolución de unidad y por tanto se consideran de baja resolución. La figura 3.8 muestra un esquema de un espectrómetro de masas con analizador cuadrupolar y acoplado a un cromatógrafo de gases.

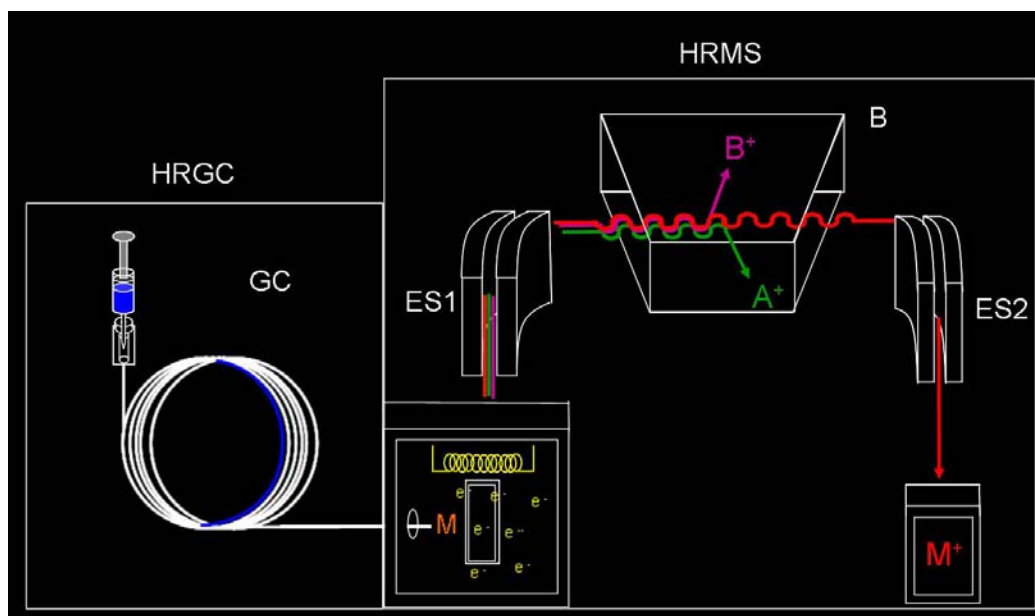
Este tipo de analizador se ha utilizado para la detección de PBDE y DP, puntos 4.1, 4.3 y 5.1 del presente trabajo.

### 3.4.2.4.- Analizador de sector magnético con doble enfoque, *triselector* (configuración EBE)

Este tipo de analizador consta de tres partes: un primer analizador electrostático (E1) seguido de un analizador magnético (B) y por último otro electrostático (E2), ver figura 3.9.

Al contrario de lo descrito anteriormente para los analizares cuadrupolares, en el analizador de triple sector los iones generados en la fuente son acelerados mediante la aplicación de campos eléctricos con voltajes de aceleración muy altos (4 - 10 kV) mientras que en los analizadores cuadrupolares en raras ocasiones se sobrepasan los 5 V. De esta forma, los iones adquieren una energía cinética muy alta y se mueven muy rápidamente por las zonas del tubo de vuelo libres de campo, pasando rápidamente de la fuente al analizador, eliminándose

trayectorias erráticas y maximizando el número de iones que entra en el analizador, lo que significa a la postre una mayor sensibilidad. Sin embargo, iones con la misma masa se pueden generar en distintas posiciones de la fuente y por lo tanto estarán sometidos a distinto potencial. Los iones con la misma masa podrán tener diferente energía cinética, lo que significa diferente velocidad y generará diferentes trayectorias, o lo que es lo mismo, ensanchamiento en el haz iónico.



**Figura 3.9.** Esquema de un analizador de triple sector (E1BE2): electrostático (E1), magnético (B) y electrostático (E2), acoplado a un cromatógrafo de gases.

El primer analizador electrostático (E1) actúa mediante dispersión y enfoque, seleccionando los iones cuya energía translacional coincide con el valor exacto del voltaje de aceleración, estrechando y focalizando el haz. Seguidamente se sitúa el imán o sector magnético, de manera que variando el campo magnético (B) se modifica la trayectoria de los iones en función de su relación masa / carga (m/z). Cuando la fuerza centrífuga de los iones sea igual a la fuerza del campo magnético (ver figura 3.10), la trayectoria entra en equilibrio (R) y los iones con esa determinada relación masa / carga se transmiten hacia el detector. Los iones que tengan una relación m/z mayor o menor describirán una trayectoria de mayor o menor radio, chocando con las paredes del tubo de vuelo. Por último se coloca otro analizador electrostático (E2) para volver a focalizar el haz aumentando la sensibilidad.

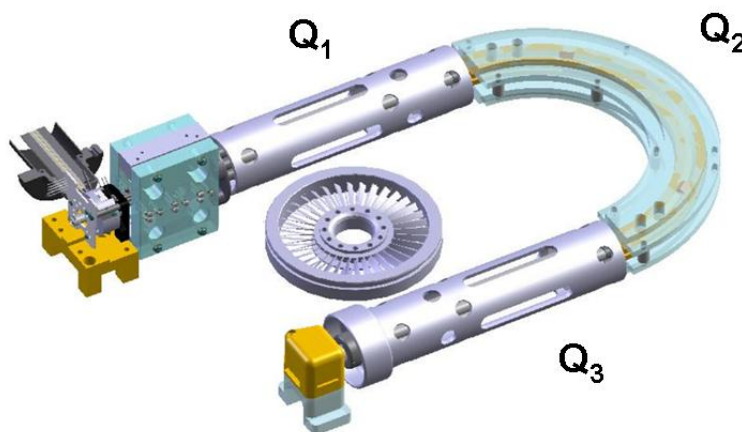
$$m/z = B^2R^2/2c^2V$$

**Figura 3.10.** Ecuación fundamental de la espectrometría de masas de campo magnético. Relación masa carga (m/z), campo magnético (B, radio de curvatura (R), velocidad de la luz (c) y voltaje (V).

Este tipo de analizador se ha utilizado para la detección de Decloranes 602, 603, 604, CP, MeO-PBDE y OH-PBDE, puntos 4.4, 4.5, 5.1 y 5.2 de esta memoria.

### 3.4.2.5.- Analizador tándem, triple cuadrupolo

La utilización del triple cuadrupolo posibilita el desarrollo de métodos tándem o MS/MS. Básicamente este analizador consta de tres cuadrupolos puestos en serie, ver figura 3.11. El primero y el último funcionan de forma habitual, separando iones con pulsos de RF y DC (ver 3.4.2.3. *Analizador cuadrupolar*), mientras que el segundo sólo funciona en RF, transmitiendo todos los iones. En este segundo cuadrupolo se introduce un gas, argón en el equipo utilizado, de forma que se producen múltiples colisiones entre los iones filtrados en el primer cuadrupolo (iones precursores) y los átomos neutros del gas. Si estas colisiones ión-neutro son suficientemente energéticas se produce la fragmentación, apareciendo los denominados *iones producto*. En el tercer cuadrupolo se separan los iones de interés que son conducidos al analizador.



**Figura 3.11.** Esquema de un analizador tándem, triple cuadrupolo. Modelo Varian 320 MS.

Este tipo de analizador se ha utilizado para la detección de DBDPE, puntos 4.2 y 5.1 de esta memoria.

### 3.5.- Métodos Estadísticos

Los resultados obtenidos se han tratado estadísticamente usando el programa SPSS 17.0 para Windows. Para comprobar el ajuste a la distribución normal se ha utilizado la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los datos que no se ajustaron a la distribución normal se transformaron logarítmicamente antes de analizarlos bajo otras pruebas. Para encontrar diferencias estadísticamente significativas se han utilizado la prueba de la T de Student (T-test) y prueba U de Mann-Whitney (U MW test).

Los Análisis de Componentes Principales (ACP) se han realizado bajo rotación por el método Varimax con normalización Kaiser. Las puntuaciones obtenidas en los distintos ACP se han analizado mediante análisis de conglomerados jerárquicos usando como método de conglomeración el del vecino más próximo y como intervalo de medida, las distancias euclídeas al cuadrado.





## **CAPÍTULO 4.- RESULTADOS**



## CAPÍTULO 4.- RESULTADOS

### 4.1.- Fuentes y comportamiento de polibromodifenil éteres (PBDE) y policlorodibenzodibenzo-p-dioxinas y furanos (PCDD/F) en lodos de depuradora españoles

*De la Torre, A., Alonso, E., Concejero, M.A., Sanz, P., Martínez, M.A. (2010). Sources and behaviour of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDD/Fs) in Spanish sewage sludge. Submitted to Waste Management.*

#### Resumen

En este trabajo se evaluó la presencia, fuentes potenciales y comportamiento de los polibromodifenil éteres (PBDE) y policlorodibenzo-*p*-dioxinas y furanos (PCDD/F) en lodos de depuradora españoles. Se analizaron un total de 120 muestras, recogidas en cuatro campañas trimestrales (una por temporada) de octubre de 2005 a septiembre de 2006. Los lodos se recogieron en 31 plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas (EDAR), de diferente tamaño (habitantes conectados a la depuradora) y geográficamente distribuidas por la España continental.

Una vez secas, las muestras se extrajeron mediante la técnica de fluidos presurizados (ASE 100, Dionex, Sunnyvale, CA, USA). La purificación se llevó a cabo en dos etapas: la primera consistió en una digestión con ácido sulfúrico concentrado y para la segunda, en la que también se realizó un fraccionamiento, se utilizó un equipo de purificación automatizada Power Prep™ System (FMS® Inc, USA), incluyendo columnas de sílice, alúmina y carbón. Se obtuvieron dos fracciones: fracción A, PBDE y Fracción B, PCDD/F. El análisis instrumental de PCDD/F se realizó en un HRGC-HRMS (Agilent 6890GC - Micromass Autospec Ultima) operando en ionización electrónica positiva a una resolución mayor de 10000 (10% valle). Para los PBDE se utilizó un equipo de baja resolución HRGC-LRMS (Agilent 6890GC - Agilent 5973MSD) operando en ionización electrónica positiva. La cuantificación de los PBDE y PCDD/F se realizó mediante dilución isotópica, utilizando patrones marcados con carbono trece (<sup>13</sup>C).

Se detectaron PBDE en todas las muestras, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas (Anova;  $p < 0.05$ ) entre los cuatro muestreos realizados. Las medias anuales de PBDE en las 31 EDAR evaluadas variaron desde 57.5 hasta 2605.8 ng/g m.s. (mínimo y máximo de las medias obtenidas en las cuatro campañas). Se obtuvo un patrón de congéneres similar en todos los lodos, siendo el BDE-209 el mayoritario (75.2 %), seguido del BDE-99 (6.3 %) y del BDE-47 (4.8 %). Este patrón demuestra el uso de mezclas DecaBDE en España. En este estudio se analizaron también policlorodibenzo-*p*-dioxinas y furanos (PCDD/F) pero los resultados obtenidos no se comentan en la discusión de esta memoria por encontrarse fuera del alcance de esta tesis.



**SOURCES AND BEHAVIOUR OF POLYBROMINATED DIPHENYL ETHERS (PBDEs), POLYCHLORINATED DIBENZO-P-DIOXINS AND DIBENZOFURANS (PCDD/Fs) IN SPANISH SEWAGE SLUDGE.**

*De la Torre, A., Alonso, E., Concejero, M.A., Sanz, P., Martínez, M.A.*

Persistent Organic Pollutants Group. Environmental Department, CIEMAT, Avd Complutense 22, Madrid 28040 (Spain)

**Keywords:** PBDEs; PCDD/Fs; Sewage sludge.

**Abstract**

Presence, sources and behaviour of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDD/Fs) were evaluated in Spanish sewage sludge. A total of 120 samples were collected in four campaigns (one per season) from October 2005 to September 2006 at 31 urban wastewater treatment plants (WWTPs). Concentrations of PBDEs (ranging between 57.53 -2605.83 ng/g dry weight) were two to three orders of magnitude higher than those obtained for PCDDs (0.17 -5.03 ng/g d.w.) and PCDFs (0.05 – 3.07 ng/g d.w.). All the samples presented I-TEQ levels (ranging between 2.06 to 44.43 ng/Kg d.w. I-TEQ) below proposed sewage sludge limit values for land application (100 ng/Kg d.w. I-TEQ; 3<sup>rd</sup> Draft EU 2000). Origin of these pollutants in the sludge was evaluated from their congener patterns. Use of deca-BDE commercial mixture seems to be the major source of PBDEs in the sludge, while faeces, presence of PCDD/Fs precursors such as pentachlorophenol, and atmospheric deposition are potential causes of PCDD/Fs levels. Statistical analyses were conducted to evaluate influence of WWTPs characteristics in the data obtained. No correlations ( $p > 0.05$ ) were found between pollutant concentrations (PBDEs and PCDD/Fs) and capacity nor sludge rate of the plants. Lower levels of PBDEs and PCDFs were found in WWTPs using biological nitrogen and phosphorous elimination, suggesting that these compounds are susceptible of microbial elimination. Principal components analysis confirms that industrial effluents (meanly textiles) are potential sources of PBDEs and PCDD/Fs in the sludge. According to our knowledge, this is the first report comparing together both PBDEs and PCDD/Fs sludge patterns.

**Introduction**

Many pollutants from human activity are presented in municipal and industrial sewer systems which could end up in sludge after going through Wastewater Treatment Plants (WWTPs) (Ligon et al., 2008). This sludge is managed worldwide in three main routes: agriculture application, incineration and landfilling. However, all of these options could entail the release of contaminants again to the environment, and therefore complete characterisation related to the presence of pollutants in the sludge should be considered before its management.

In a time trend study (1995-2020) conducted in Europe by Milieu et al., (2010) for the European Commission, agricultural application results the main sludge disposal route reaching

levels of 39, 48 and 49 %, followed by the incineration 22, 27 and 29 %, and by landfill 15, 12 and 9% (data for 2005, 2010 and 2020). Considering that the reuse of sludge in agriculture besides from being the majority management option, it is also an increasingly one, special attention must be paid on terrestrial ecosystems when hazardous compounds are added to soil with the sludge as fertilizer. Responding to this concern, the EU published in 2000 the third draft of future sludge directive for land application proposing cut-off values of different contaminants (EU, 2000). Nevertheless, the range of contaminants should be considered and their limit values in sludge are actually under discussion supposing a controversial issue among countries (Aparicio et al., 2009).

From all potential contaminant, those with high lipophilicity and low chemical/biological degradability are expected to concentrate in sludge since they are removed by sorption on organic particles during the wastewater treatment process (Katsoyiannis and Samara, 2007a). These properties, particularly persistence, semi-volatility and long half-life are key criteria of substances included into the Stockholm Convention called as Persistent Organic Pollutants (POPs). This international treaty was adopted to protect environmental and human health from adverse effects associated with exposure to POPs since they are toxic to both human and wildlife and have the availability to bioaccumulate and transfer through the food chain (Stockholm Convention, 2001). Consequently, there is a global concern about the presence of POPs in sewage sludge being widely investigated and documented around the world (Clarke et al., 2010a; Ju et al., 2009; Aparicio et al., 2009; Katsoyiannis and Samara, 2007a and b; Wang et al., 2007). Most researches have focused on POPs initially included into the Convention at 2001 such as polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) or polychlorinated biphenyls (PCBs). Concretely, these chemicals are the unique POPs included into the EU draft for sludge land application. However, limited studies regarding the rest of POPs (a total of 21), particularly for those POPs added recently to the Stockholm Convention (on May 2009; COP4 2009), such as polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), has been published.

Levels of POPs in sewage sludge seem to be conditioned by various circumstances such as: i) the emission sources, ii) the socio-economic status and the activities (industrial, offices, rural) of the catchments area where the wastewater has been originated, or iii) the type of wastewater treatment processes. However, no clear description of factors that influence the presence of POPs in sludge has been reported.

Due to gap of knowledge above mentioned, the aim of this study was primary to determine the levels and patterns of three different types of POPs (PBDEs, PCDDs and PCDFs) in Spanish sewage sludge. Congener patterns were evaluated trying to elucidate their potential sources. Finally, statistical analysis was conducted to investigate; i) correlations between the WWTPs characteristics and the concentration of PBDEs and PCDD/Fs, ii) the influence of wastewater treatment method in POPs levels.

## Materials and Methods

### Sewage sampling and WWTP description

This study was carried out as a part of the Program for Characterising Sewage Sludge developed for assessing the quality of sludge within the framework of the Spanish Nation Plan (2001-2006). Sewage sludge samples were collected in four campaigns (one per season) from October 2005 to September 2006 at thirty one urban WWTPs of differing sizes (connected inhabitants) and with different production of sludge (sludge rate; tonnes per year). These plants present combined sewer systems (sewerage joint stormwater drainage systems).

Complete characteristics of the facilities evaluates are listed in Table 1. In brief, WWTPs 1 to 20 apply aerobic water treatment, whereas samples 21 to 31 are subject to biological nitrogen (N) and phosphorous (P) compound elimination in three different digesters: anaerobic followed by anoxic and finally aerobic. Obtained sewage sludge were chemically treated (samples 13 and 31), not stabilized (samples 21, 25 and 28), or mesophilic anaerobically stabilized (all others). Samples resulting from consecutive water treatment and sewage stabilization were collected in amber-glass flasks for preserving from light, humidity and other external factors which might changes its chemical composition. Upon receiving in the laboratory samples were dried at 40 °C to a constant weigh, grounded into a fine powder, and stored at -18 °C until analysis.

Total sample is considered representative since total inhabitant equivalent and sludge rate related to the 31 WWTPs studied correspond to the 19% and 33 % of Spanish totals (Milieu et al., 2010).

### Reagents and standards

Analysis of PCDD/Fs and PBDEs were performed by isotopic dilution using labelled  $^{13}\text{C}$  solutions. EPA-Method 1613  $^{13}\text{C}$  (1613CS1 to 5, 1613LCS and 1613ISS; calibration, recovery and injection solutions) for PCDD/Fs and BDE-E-CS1 to 5, MBDE-MXE, and BDE-CVS-EISS, as calibration, recovery and injection solutions for PBDEs determination. All standards were purchased from Wellington Laboratories, Ontario (Canada).

Other chemicals used were anhydrous sodium sulphate, copper fine powder, sulfuric acid (95-97%) and solvents (hexane, dichloromethane, ethyl acetate and toluene) for organic trace analysis were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

### Extraction and Clean-up

An amount of 0.5 g of dried sample was spiked with  $^{13}\text{C}$  recovery standards (10  $\mu\text{L}$  of EPA1613LCS and 10  $\mu\text{L}$  of MBDE-MXE) prior to be extracted with Accelerated Solvent Extraction system (ASE 100, Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Sample was mixed, and homogenized with 2.5 g of anhydrous sodium sulphate and 0.5 g of copper fine powder to

remove elemental sulphur interferences. A mixture of hexane:dichloromethane (1:1 v/v) was used as solvent, at 100°C, 10.34MPai, 90% flush volume and three static cycles (10 min each).

Resulting extract was solvent exchanged with hexane and liquid-extracted with 50 ml of concentrated sulfuric acid to remove organic matter. Clean up and fractionation step was then performed in an automated purification Power Prep™ System (FMS Inc., USA) including acidic silica gel, basic alumina and carbon columns. Different mixtures of solvents were used to recover target analytes while retaining possible interferences.

Two fractions were obtained: Fraction A, containing PBDEs, eluted from the carbon column; Fraction B, contained PCDD/Fs, back flushed from the same column. Both fractions were concentrated to dryness under a flow of nitrogen using a Turbo Vap® II evaporator (Vertex, Technics, Madrid, Spain) and redissolved in nonane spiked with the <sup>13</sup>C injection standards solutions (5 µL EPA 1613-ISS and 5 µL of BDE-CVS-EISS) prior to GC-MS analysis.

### **Instrumental Analysis**

Instrumental analysis of PCDD/Fs was carried out by HRGC-HRMS, on a Micromass Autospec Ultima, operated in electron ionization mode at a resolution of at least 10,000 resolving power (10% valley). Gas chromatograph was equipped with a 60 m DB5-MS capillary column (0.25 mm i.d. x 0.25 µm film thickness; J&W Scientific, CA, USA). Split/ splitless injections of 1 µL were made onto an injector set isothermally at 280 °C. The initial oven temperature was set at 100°C (1 min hold time), ramped at 20 °C/min to 220 °C (1 min hold time), and ramped at 3 °C/min to 310 °C. Transfer line and ion source temperatures were 280 °C.

PBDEs determination was performed on an Agilent 5973 MSD connected to a Agilent 6890 GC and operated in electron ionization mode. The gas chromatograph was fitted with a 15 m DB5-MS capillary column (0.25 mm i.d. x 0.10 µm film thickness; J&W Scientific, CA, USA). Pulsed splitless (30 p.s.i.) injections were performed on an injector at 280 °C. The initial oven temperature was set at 140°C with a 1 min hold time, and ramped at 20 °C/min to 310 °C and held for 5 min. Transfer line, ion source and quadrupole temperatures were 280, 230, and 150 °C, respectively. Helium at a constant flow (1 ml/min) was used as carrier gas both for PCDD/Fs and PBDEs instrumental analysis.

### **Quality control**

Three criteria were used to ensure the correct identification and quantification of PCDD/Fs and PBDEs. First, the retention time must be within ± 1 s between the analyte and its labelled standard. Second, the ratio of quantifier and qualifier ions must be within ± 15 % of the theoretical values. Third, the signal to noise ratio must be greater than 5. Instrumental blanks were injections of nonane run after every sample and were used to monitor contamination between GC injections. Procedural blanks consists of siliceus earth (Scharlab, Barcelona, Spain) were carried out and analysed under the same conditions than



samples at a rate of one every ten samples on routine basis in the laboratory. Procedural blanks presented BDE-209 in concentration ranging from non detected to 0.003 ng/g d.w., three orders of magnitude lower than the lowest level found in the samples, whereas PCDD/Fs were at undetectable levels. Samples were blank corrected. Recoveries for  $^{13}\text{C}$ -PCDD/Fs and  $^{13}\text{C}$ -PBDEs in this study were  $71 \pm 25 \%$ , and  $84 \pm 14 \%$  (mean  $\pm$  SD), respectively.

### Statistical methods

The results were treated statistically using SPSS 11.5 for Windows. Primary, WWTPs were classified in different categories regarding to their Capacity (C1, C2, C3 and C4) and Sludge Rate (I, II, III and IV). The ranges of values that comprise these categories are detailed in Table 1. For finding statistical differences between WWTPs categories and PBDE and PCDD/F concentration on sludge, a Mann-Whitney W test was run. This test was chosen for reducing the weight of outliers when comparing the data. Logarithmic transformation of concentration was carried out before the statistical study. Finally, Principal Component Analysis (PCA) was conducted to find the relationships between concentrations of PBDEs and PCDD/Fs and the characteristics of WWTPs. In the PCA study, the concentrations were also logarithmically transformed. In addition, a rotation was used by the Varimax method. The scores obtained for each component in PCA were analysed for clustering the WWTP with similar characteristics (Nearest Neighbour method using Squared Euclidean as distance metric).

### Results and Discussion

Complete data obtained in the four sampling periods are listed in Tables S1, S2 and S3 (supplementary materials) and summarized in Table 1. The annual values were used since PBDEs and PCDD/Fs concentrations did not change significantly during four campaigns (ANOVA one-way,  $p < 0.05$ ). Consequently, seasonal trends could not be identified using the annual mean as representative whole-year value.

#### PBDEs in sewage sludge

Mean total concentrations for PBDEs range from 57.53 to 2605.83 ng/g dry weight (d.w). Similar levels, from several nanograms to micrograms per gram d.w. have been reported in sewage sludge worldwide (Clarke et al., 2010b; Eljarrat et al., 2008; Gevao et al., 2008; Hale 2001, 2003; Knoth et al., 2007; North 2004; Sánchez-Brunete et al, 2009; Song et al., 2006; Wang et al., 2007).

As shown in Fig. 1 a characteristic congener pattern was obtained for all WWTPs, being BDE-209 the major congener (accounting  $77.2 \pm 11.0\%$  to total PBDEs levels; mean  $\pm$  SD), followed by BDE-99 ( $6.3 \pm 4.1\%$ ; mean  $\pm$  SD) and BDE-47 ( $4.8 \pm 3.3\%$ ; mean  $\pm$  SD). Interestingly, relative high concentrations of BDE-206 ( $3.3 \pm 1.6\%$ ; mean  $\pm$  SD) and BDE-207 ( $3.0 \pm 2.2\%$ ; mean  $\pm$  SD) could also be observed.

**Table 1.** Main Characteristics of the WWTPs evaluated in this study. Mean concentrations of PBDEs, PCDDs and PCDFs in ng/g d.w. obtained with the 4 sampling periods. International toxicity equivalent factors (I-TEFs) 1988 were used.

WWTP	Capacity <sup>a</sup>		Sludge Rate <sup>b</sup>		Treat <sup>c</sup>	ΣPBDEs <sup>d</sup> (ng/g d.w.)	ΣPCDDs <sup>e</sup> (ng/g d.w.)	ΣPCDFs <sup>f</sup> (ng/g d.w.)	I-TEQ <sup>g</sup> (ng/Kg d.w.)
	(Connected inhabitants)		(tonnes d.w./year)						
1	188610	C1	4149	II	A	236.76	0.33	0.15	4.16
2	195000	C1	3000	II	A	353.09	0.66	0.22	6.40
3	400000	C2	4500	II	A	402.00	1.03	0.57	44.43
4	280000	C2	2569	II	A	1036.52	0.42	0.22	9.17
5	143324	C1	3838	II	A	904.36	0.73	0.17	4.62
6	288000	C2	50512	IV	A	394.55	0.50	0.17	5.38
7	620000	C3	18300	IV	A	723.67	0.54	0.17	7.52
8	575000	C3	47450	IV	A	571.16	0.49	0.19	11.08
9	562500	C3	7686	III	A	353.03	0.51	0.17	7.73
10	950000	C4	12867	III	A	359.93	0.73	0.19	5.89
11	1000000	C4	17949	IV	A	284.36	0.52	0.17	7.19
12	1314831	C4	12960	IV	A	751.74	1.17	0.27	13.42
13	105851	C1	3910	II	A	57.53	0.17	0.11	11.91
14	116000	C1	3709	II	A	316.30	0.55	0.20	7.25
15	80000	C1	2510	I	A	113.45	4.71	0.17	18.32
16	622673	C3	8108	III	A	219.01	0.64	0.12	5.53
17	228000	C2	4216	II	A	981.70	1.29	3.07	13.28
18	225000	C2	2500	I	A	2605.83	5.03	1.04	18.42
19	320000	C2	3147	I	A	464.26	0.49	0.25	4.47
20	165000	C1	2800	I	A	944.09	0.38	0.24	4.78
21	700000	C3	16719	IV	B	179.07	0.42	0.14	6.63
22	570000	C3	8166	III	B	194.68	0.45	0.14	4.72
23	590000	C3	32872	IV	B	283.99	0.54	0.16	7.92
24	852961	C4	24005	IV	B	132.99	0.60	0.21	7.31
25	259125	C2	17184	IV	B	279.15	0.43	0.09	3.29
26	195323	C1	1560	I	B	109.85	0.19	0.05	2.06
27	466560	C2	2680	I	B	381.96	0.66	0.22	5.47
28	382249	C2	12184	III	B	291.76	0.32	0.09	4.07
29	350000	C2	6600	II	B	396.27	0.95	0.20	7.33
30	650000	C3	8000	III	B	464.50	0.92	0.17	5.37
31	456304	C2	8639	III	B	352.90	0.32	0.19	15.60
					Mean	488.40	0.86	0.31	9.06
					Min	57.53	0.17	0.05	2.06
					Max	2605.83	5.03	3.07	44.43

<sup>a</sup> Capacity categories: WWTPs covering municipalities with C1) less than 200,000, C2) from 200,001 to 500,000, C3) from 500,001 to 800,000, and C4) more than 800,001 inhabitants.

<sup>b</sup> Sludge Rate categories: WWTPs that produce I) less than 3,147, II) from 3,147 to 6,600, III) from 6,600 to 12,867, and IV) more than 12,867 sludge (Ton d.m./year).

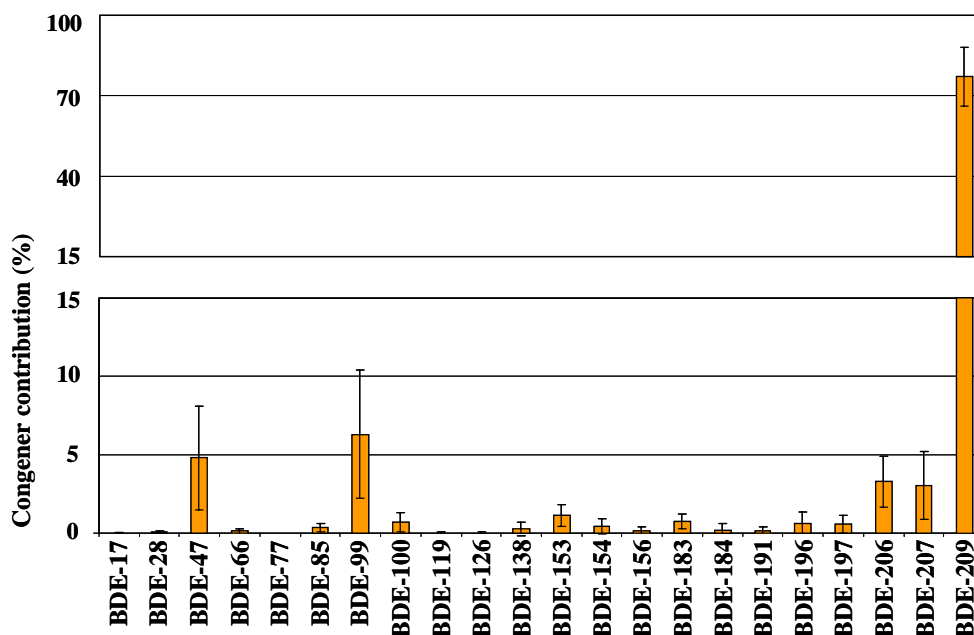
<sup>c</sup> Water treatment processes: A) Conventional biological (aerobic digester), B) Biological elimination of N and P (anaerobic + anoxic + aerobic digesters).

<sup>d</sup> ΣPBDEs: sum of BDE-28, 47, 66, 85, 99, 100, 153, 154, 156, 183, 184, 191, 196, 197, 206, 207 and 209.

<sup>e</sup> ΣPCDDs: sum of 1,3,6,8-TCDD; 1,3,7,9-TCDD; 2,3,7,8-TCDD; 1,2,3,7,8-PCDD; 1,2,3,4,7,8-HCDD; 1,2,3,6,7,8-HCDD; 1,2,3,7,8,9-HCDD; 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD and OCDD.

<sup>f</sup> ΣPCDFs: sum of 1,2,7,8-TCDF; 2,3,7,8-TCDF; 1,2,3,7,8-PCDF; 2,3,4,7,8-PCDF; 1,2,3,4,7,8-HCDF; 1,2,3,6,7,8-HCDF; 1,2,3,7,8,9-HCDF; 2,3,4,6,7,8-HCDF; 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF; 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF and OCDF.

<sup>g</sup> I-TEQ: sum of I-TEQ of PCDDs and PCDFs.



*Fig. 1. Congener pattern of PBDEs in the sludge. Bars and whiskers represent means and SDs, respectively.*

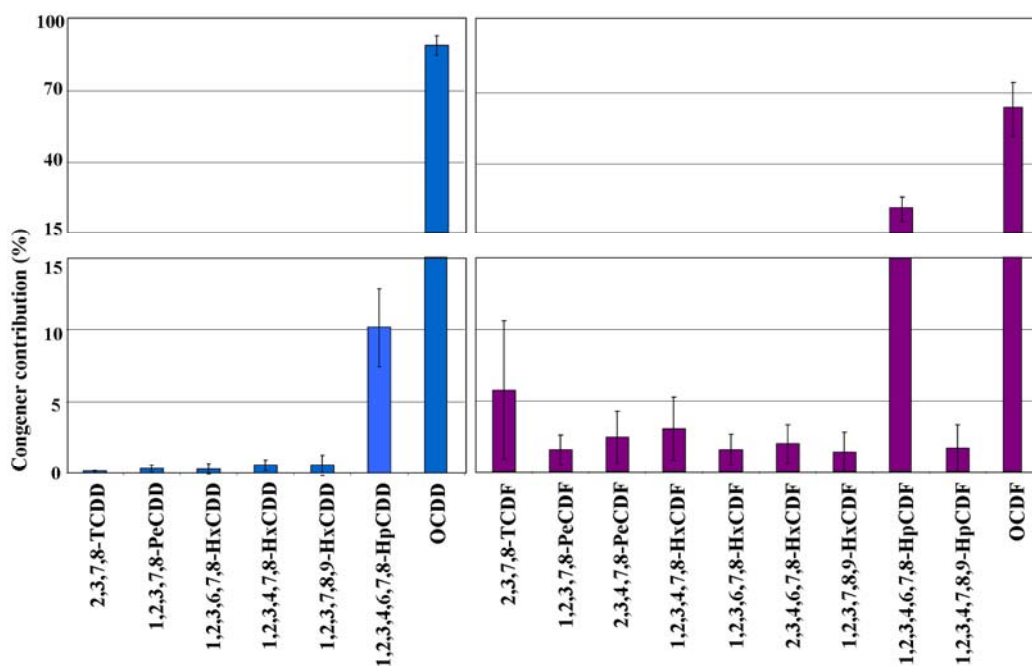
PBDEs have been commercialized under three groups of technical mixtures: Penta-, Octa-, and Deca- PBDE, however Penta and Octa formulations have been banned in Europe. Congener pattern found in this study is in agreement with the one reported by La Guardia et al. (2006) for two Deca- Technical mixtures (94.2 % BDE-209, 3.6 % BDE-207 and 2.2 % BDE-206; Saytex 102E and Bromkal 82-0DE) and evidences the use of Deca-PBDE formulations in Spain. Relative low BDE-209 contribution (77.2%) in the sludge compare to the Deca-PBDE technical mixtures (94.2%), could be explained by photolytic (Kajiwara et al., 2008; Shih et al., 2009) and anaerobic degradation (Gerecke et al., 2005 and 2006; Shin et al., 2010) of BDE-209, resulting in the presence of low brominated congeners, such as BDE-197, -183, -153, -154, -99 or -47. However these compounds could also be related to historical use of Penta- and Octa-PBDE formulations.

### PCDD/Fs in sewage sludge

Mean total concentrations for PCDDs and PCDFs range from 0.17 to 5.03 ng/g d.w and from 0.05 to 3.07 ng/g d.w, respectively. These levels were two to three orders of magnitude lower than those obtained for PBDEs. Toxicity (I-TEQ) was calculated using the international toxicity equivalent factors (I-TEFs). Total I-TEQs (sum of PCDDs and PCDFs) in this study ( $9.06 \pm 7.79$  ng/Kg d.w. I-TEQ; mean  $\pm$  SD) corroborate a decreasing trend in Spanish sewage sludge:  $144.29 \pm 81.33$  ng/Kg d.w. I-TEQ (mean  $\pm$  SD) in 1997 (Eljarrat et al., 1997);  $25.51 \pm 35.55$  ng/Kg d.w. I-TEQ (mean  $\pm$  SD) in 2001-2003 (Abad et al., 2005) and  $13.90 \pm 13.60$  ng/Kg d.w. I-TEQ (mean  $\pm$  SD) in 2004 (Fuentes et al., 2007). This fact is probably a result of restricted policies related to PCDD/Fs emission to the environment.

As for PBDEs, a characteristic congener patterns was obtained for PCDDs and PCDFs, being the octa (OCDD/Fs) followed by heptachlorinated (HpCDD/Fs) the major congeners (Fig. 2). Similar profiles have been reported by others authors (Abad et al., 2005; Eljarrat et al., 1997, 2003; Fuentes et al., 2007; Koch et al, 2001; Martínez et al., 2007). Although this congener profile match with PCDD/Fs deposition one (Abad et al., 2005), other sources such as faeces (Koch et al., 2001) should be considered. Furthermore, Klimm et al., (1998) demonstrated the formation of OCDDs and HpCDDs during semi anaerobic stabilization of sewage sludge. As commented before, samples evaluated in this study resulted from consecutive water treatment and sewage stabilization. Most of the WWTPs used mesophilic anaerobically stabilization, however presence of oxygen traces could not be dismissed. Furthermore, it has been found that OCDD and HpCDDs are formed in activated sludge in the presence of the precursors such as pentachlorophenol (PCP) (Öberg et al., 1992a, 1992b).

I-TEQ levels for all samples evaluated in this study (ranging from 2.06 to 44.43 ng/Kg d.w. I-TEQ; 120 samples collected in four campaigns in 31 WWTPs) are below proposed sewage sludge limit values for land application (100 ng/Kg d.w. I-TEQ; EU 2000). Therefore, land application will be a suitable management of sludge under this proposed legislation.



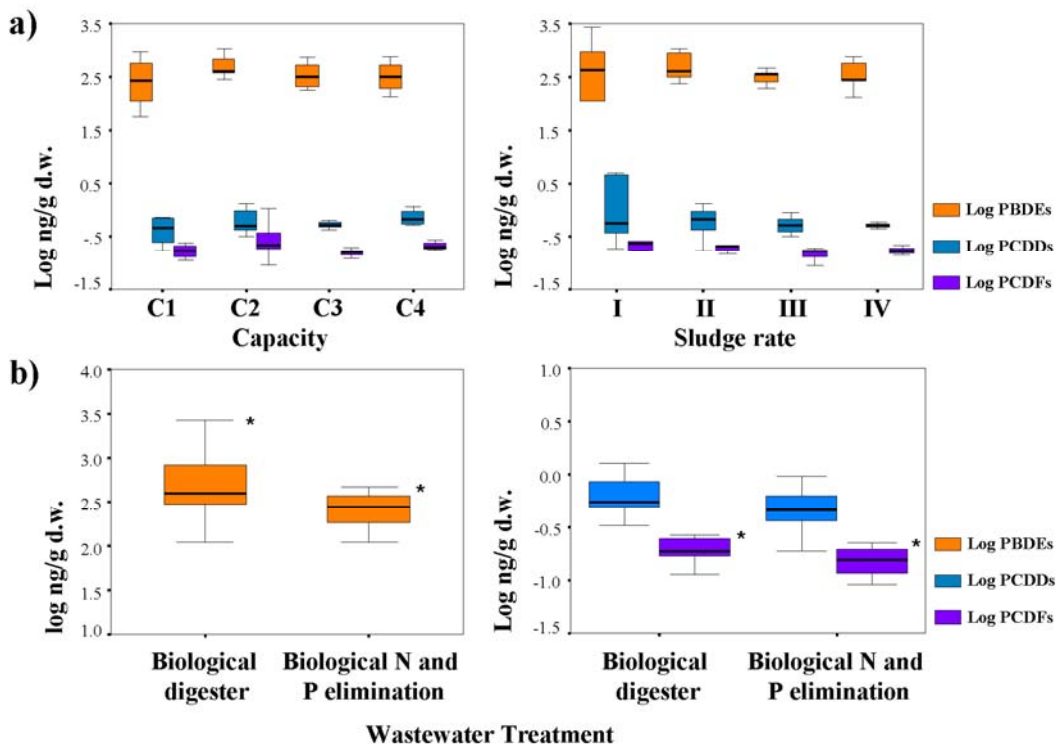
**Fig. 2.** Congener pattern of PCDD/Fs in the sludge. Bars and whiskers represent means and SDs, respectively.

### Influence of WWTPs characteristics on PBDEs and PCDF/Fs concentration

Considering the high variation of total PBDEs ( $488.40 \pm 474.60$  ng/g d.w.; mean  $\pm$  SD), total PCDDs ( $0.86 \pm 1.1$  ng/g d.w.; mean  $\pm$  SD) and total PCDFs ( $0.31 \pm 0.54$  ng/g d.w.; mean  $\pm$  SD), influence of the WWTPs characteristics (capacity, sludge rate and the type of water treatment process) was evaluated (Fig. 3).

No differences ( $p > 0.05$ ) between chemical concentration and the connected inhabitants of plants (capacity) were found neither for PBDEs nor PCDD/Fs (Fig. 3.a). The capacity of plants could be shown as an indicator of the catchment area activities excluding specific hotspot industrial sites. For example, higher municipalities could imply additional business, factories and offices while small populations mean a predominant household domestic wastewater. However, the results of this study suggest that the number of inhabitants does not change the source pattern of PBDEs and PCDD/Fs into wastewater indicating the high domestic wastewater contribution to sludge. That supports the assumption of other authors regarding the high relevance of this kind of wastewater as PCDD/Fs (Zhang et al., 2009) and PBDEs source (Gevao et al., 2008).

In the same manner, no differences were found ( $p > 0.05$ ) between PCDD/F and PBDE concentrations and sludge rate (Fig. 3.a). High sludge production could respond to: i) high loads of organic matter released into wastewater (Kupper et al., 2008), or to ii) high efficiency to remove organic matter by plants (Katsoyiannis and Samara, 2007a). That could lead to a dilution or concentration of POPs in sludge respectively. Nevertheless, the concentration of PBDEs and PCDD/Fs resulted independent of the production of sludge, signifying that this WWTPs characteristic is not enough indicative of POP concentration.

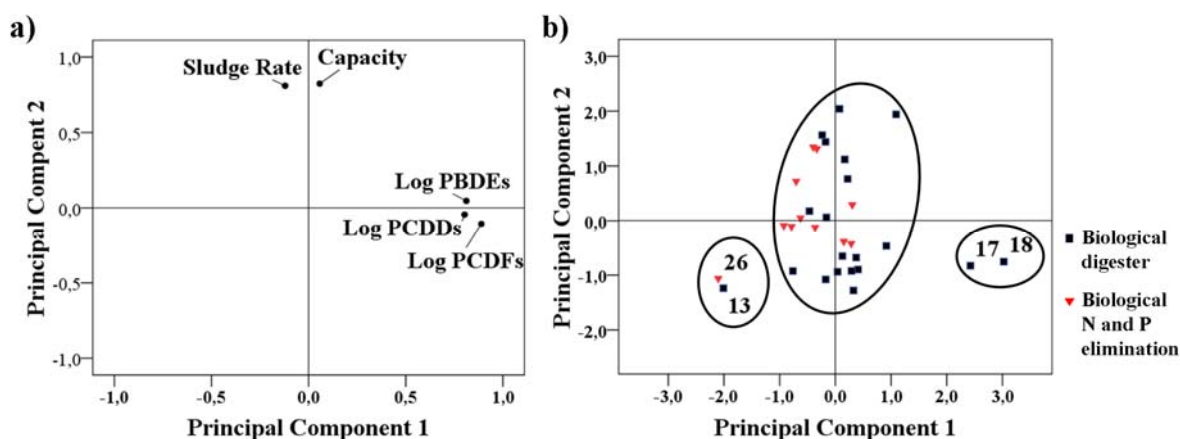


**Fig. 3.** Comparison of WWTP characteristics: a) Sludge rate and Capacity, b) Type of wastewater treatment, and the logarithmic transformed concentration of PBDEs, PCDDs and PCDFs. The boxes represent the inter-quartile range and the centre line within the box the median. The whiskers extend from the box to the minimum and maximum values, excluding outliers. \* Significant differences at 95% of confidence level.

Regarding the type of wastewater treatment, the PBDE and PCDF sludge concentration slightly decreased ( $p = 0.03$  and  $p = 0.02$ , respectively) when biological N and P elimination were employed (Fig. 3.b.). That fact could imply a degradation of PBDEs and PCDFs by microorganisms involved in N and P elimination, as shown in a previous work (de la Torre et al., 2010). However, no differences ( $p > 0.05$ ) were found on PCDDs concentration between two wastewater treatment processes.

In order to find potential relationships among both kind of POPs and the factors that conditioning their levels in sewage sludge, principal component analysis (PCA) was performed (Fig. 4).

Two principal components (PC) with eigenvalues above one were chosen. The calculation indicates that these two PCs explained 70% of the variability of the data, accounting for 43% (PC1) and 27% (PC2), respectively. Fig. 4.a. shows the loading on PC1 and PC2. PC1 is mainly influenced by POPs levels (log PBDEs and log PCDDs/Fs) while PC2 is influenced by Capacity and Sludge Rate. The proximity of log POPs (PCDDs, PCDFs and PBDEs) in Fig. 4.a. indicates high similarities on both POP patterns among different WWTPs. That might indicate similar sources, similar transport pathways to sewer systems, and/or similar partitioning during treatment process.



**Fig.4.** Results from Principal Components Analysis (PCA): a) loading plot contribution of each variable to each component; b) score plot of all samples on each component showing the three clustered groups. Samples are labelled according to WWTP number. Black squares correspond to WWTPs with conventional anaerobic digester and triangles represent those using biological N and P elimination.

The score plots of PCA are given in Fig. 4.b. Plants with conventional anaerobic digester (black squares in Fig. 4.b.) were predominantly distributed on positive values of PC1 while plants with biological N and P elimination (triangles in Fig. 4.b.) showed majority negative values. Hence, conventional WWTPs showed highest POP concentrations than plants with biological N and P elimination. That is in concordance with the results showed previously indicating potential biodegradation of these POPs during the biological N and P elimination.

Cluster analysis was performed with the scores identifying three groups of WWTPs grouped in Fig. 4.b. The first group corresponds to two WWTPs (17 and 18) with highly positive values of PC1. As the first component was dominated by the concentration of POPs, these plants are those with highest concentrations of PCDD/Fs and PBDEs. This group represents the most industrial area (North East Spain), Fig. S1, especially textiles industries. High PBDE levels could be expected, since these compounds are widely used in textile sector. In addition, PCDD/F levels could be related to the use of pentachlorophenol (PCP), a fungicide used in textiles (Langenkamp et al., 2001), that has been reported to produce PCDD/Fs under anaerobic conditions (Öberg et al., 1992a). Use of PCP is regulated since 2004 under the Rotterdam Convention (Rotterdam Convention, 2004), however Spain derogated the banned of its use in textiles and treated wood until 31 December 2008 (EU, 2003).

The second group (comprised of WWTPs 13 and 26), in the bottom left side of Fig. 4.b., is negatively influenced by PC1 (concentration of POPs) and PC2 (Capacity and Sludge Rate). These plants correspond to small cities with non-specific POP release or industries suggesting that the household wastewater is the only PBDE and PCDD/F source. The last group encloses the rest of WWTPs including 87% of the plants which are distributed uniformly around PC1 and PC2.

Considering that agricultural application of sewage sludge is widely used in Europe (accounting of 48 % to the total production) and especially in Spain (65 %) (Mileau et al., 2010) and the transfer of PCDD/Fs and PBDEs from the sludge to the soil (Eljarrat et al., 1997, 2008) and the terrestrial food web (Hulster et al., 1994; Matscheko et al., 2002; Mueller et al., 2006; Vermeulen et al., 2010) have been demonstrated, the concentrations obtained from the present study are cause of concern. Presence of PBDEs and PCDD/Fs in the sludge should also be considered when landfill and incineration are used as sewage sludge disposal routes. Levels of PBDEs and PCDD/Fs in landfill leachates (Choi and Lee, 2006; Oliaei et al., 2002; Osako et al., 2002, 2004) have to be taken into account, especially in poorly designed landfill sites (Odusanya et al., 2009). PBDEs could also generate polybrominated dibenzo-p-dioxins (PBDDs) and dibenzofurans (PBDFs) under pyrolysis conditions (WHO/IPC, 194), and therefore incineration of sludge could be a potential source of PBD/Fs into the environment.

## Conclusions

This study supports exhaustive information about the presence of PBDD/Fs and PBDEs in sludge from a European country. Results revealed that WWTPs characteristics (capacity and sludge rate) not influenced PBDEs and PCDD/Fs levels in the sludge. However, biological N and P elimination wastewater treatment method seems to reduce PBDEs and PCDFs concentrations.

In-depth monitoring programs are needed for understanding the both new (PBDEs) and classical POPs (PCDD/Fs) levels and patterns on sludge around the world. Data from this study could be useful for sludge management and for attempts to understand and predict the emission

of these POPs by dynamic models with sludge land-application. To our knowledge, this is the first study comparing together both types of POP patterns.

### Acknowledgements

This work has been supported by the Spanish Minister of Science and Innovation through the Characterization of the Atmospheric Pollution and POP Unit, Environment Department, CIEMAT, Spain, and by the Center of Civil Engineering Research (CEDEX) through the 44-403-1-096 project (Research on sludge from wastewater treatment. Directive 86/278/CEE) signed with the Ministry of Environment.

### References

- Abad, E., Martínez, K., Planas, C., Palacios, O., Caixach, J., Rivera, J., 2005. Priority organic pollutant assesment of sludges for agricultural purpose. *Chemosphere* 61, 1358 – 1369.
- Aparicio, I., Santos, J.L., Alonso, E., 2009. Limitation of the concentration of organic pollutants in sewage sludge for agricultural purposes: A case study in South Spain. *Waste Management* 29, 1747 - 1753.
- Choi, K.I., Lee, D.H., 2006. PCDD/Fs in leachates from Korean MSW landfills. *Chemosphere* 63, 1353 – 1360.
- Clarke, B.O., Porter, N.A., Marriott, P.J., Blackbeard, J.R., 2010a. Investigating the levels and trends of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyl in sewage sludge. *Environ. Int.* 36, 323 - 329.
- Clarke, B.O., Porter, N.A., Symons, R.K., Marriot, P.J., Stevenson, G.J., Blackbeard, J.R., 2010b. Investigating the distribution of polybrominated diphenyl ethers through an Australian wastewater treatment plant. *Sci. Total. Environ.* 408, 1604 – 1611.
- COP 4, Fourth Meeting of the Conference of the Parties to the Stockholm Convention, 2009. International Institute for Sustainable Development (IISD) Earth Negotiations Bulletin, 15.
- De la Torre, A., Concejero, M.A., Martínez, M.A., 2010. Concentrations and sources of an emerging pollutant, decabromodiphenyl ethane (DBDPE), in sewage sludge for land application. Submitted for publication to *Waste Management* 03 August 2010.
- Eljarrat, E., Caixach, J., Rivera, J., 1997. Effect of sewage sludges contaminated with polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls on agricultural soils. *Environ. Sci. Technol.* 31, 2765 - 2771.
- Eljarrat, E., Caixach, J., Rivera, J., 2003. A comparison of TEQ contributions from PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs in sewage sludges from Catalonia, Spain. *Chemosphere* 51, 595 - 601.
- Eljarrat, E., Marsh, G., Labandeira, A., Barceló, D., 2008. Effect of sewage sludges contaminated with polybrominated diphenylethers on agricultural soils. *Chemosphere* 71, 1079 - 1086.
- EU, 2000. Working document on sludge, 3rd draft. Brussels. <[http://europa.eu.int/comm/environment/waste/sludge/sludge\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/environment/waste/sludge/sludge_en.pdf)> (Accessed July 2010).
- EU, 2003. Regulation of the European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restrictions of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency and amending Directive 1999/45/EC and



- Regulation (EC), on Persistent Organic Pollutants. <[http://ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/REACH/REACH\\_PROPOSAL/COM\\_PROPOSAL\\_2003/COM\\_2003\\_0644\\_6.pdf](http://ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/REACH/REACH_PROPOSAL/COM_PROPOSAL_2003/COM_2003_0644_6.pdf)> (Accessed July 2010).
- Fuentes, M.J., Font, R., Gómez-Rico, M.F., Moltó, J., 2007. Multivariant statistical analysis of PCDD/FS in sewage sludges from different areas of the Valencian Community (Spain). *Chemosphere* 67, 1423 - 1433.
- Gerecke, A.C., Hartmann, P.C., Heeb, N.V., Kohler, H.E., Giger, W., Schmid, P., Zennegg, M., Kohler, M., 2005. Anaerobic degradation of Decabromodiphenyl ether. *Environ. Sci. Technol.* 39, 1078 – 1083.
- Gerecke, A.C., Giger, W., Hartmann, P.C., Heeb, N.V., Kohler, H.E., Schmid, P., Zennegg, M., Kohler, M., 2006. Anaerobic degradation of brominated flame retardants in sewage sludge. *Chemosphere* 64, 311 – 317.
- Gevao, B., Muzaini, S., Helaleh, M. 2008., Occurrence and concentrations of polybrominated diphenyl ethers in sewage sludge from three wastewater treatment plants in Kuwait. *Chemosphere* 71, 242 - 247.
- Hale, R.C., La Guardia, M.J., Harvey, E.P., Gaylor, M.O., Mainor, T.M., Duff, W.H., 2001. Flame retardants. Persistent pollutants in land-applied sludges. *Nature* 412, 140 - 141.
- Hale, R.C., Alae, M., Manchester-Neesvig, J.B., Stapleton, H.M., Ikonomou M.G., 2003. Polybrominated diphenyl ether flame retardants in North America environment. *Environ. Int.* 29, 771 - 779.
- Hulster, A., Mueller, J.F., Marschner, H., 1994. Soil–plant transfer of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans to vegetables of the cucumber family (Cucurbitaceae). *Environ. Sci. Technol.* 28, 1110–1115.
- Ju, J.H., Lee, I.S., Sim, W.J., Eun, H., Oh, J.E., 2009. Analysis and evaluation of chlorinated persistent organic compounds and PAHs in sludge in Korea. *Chemosphere* 74, 441 - 447.
- Kajiwara, N., Noma, Y., Takigami, H., 2008. Photolysis studies of Technical Decabromodiphenyl ethat (DecaBDE) and ethane (DeBDethane) in plastics under natural sunlight. *Environ. Sci. Technol.* 42, 4404 - 4409.
- Katsoyiannis, A., Samara, C., 2007a. The fate of dissolved organic carbon (DOC) in the wastewater treatment process and its importance in the removal of wastewater contaminants. *Environ. Sci. & Pollut. Res.* 14, 284 - 292.
- Katsoyiannis, A., Samara, C., 2007b. Comparison of active and passive sampling for the determination of persistent organic pollutants (POPs) in sewage treatment plants. *Chemosphere* 67, 1375 - 1382.
- Klimm, C., Schramm, K.W., Henkelmann, B., Martens, D., Kettrup, A., 1998. Formation of octa- and heptachlorinatedibenzo-p-dioxins during semi anaerobic digestion of sewage sludge. *Chemosphere* 37, 9 – 12.
- Knoth, W., Mann, W., Meyer, R., Nebhuth, J., 2007. Polybrominated diphenyl ethers in sewage sludge in Germany. *Chemosphere* 67, 1831 – 1837.
- Koch, M., Knoth, W., Rotard, W., 2001. Source identification of PCDDs in sewage treatment plant of German village. *Chemosphere* 43, 737 – 741.
- Kupper, T., de Alencastro, L.F., Gatsigazi, R., Furrer, R., Grandjean, D., Tarradellas, J., 2008. Concentrations and specific loads of brominated flame retardants in sewage sludge. *Chemosphere* 71, 1173 - 1180.

- La Guardia, M.J., Hale, R.C., Harvey, E., 2006. Detailed polybrominated diphenyl ether (PBDE) congener composition of the widely used Penta-, Octa-, and Deca-PBDE technical flame-retardant mixtures. *Environ. Sci. Technol.* 40, 6247 - 6254.
- Langenkamp, H., Part, P., Erhardt, W., Prüß, A., 2001. Organic contaminants in sewage sludge for agricultural use. European Comision Joint Research Centre Institute for Environment and Sustainability Soil and Waste Unit. <[http://ec.europa.eu/environment/waste/sludge/pdf/organics\\_in\\_sludge.pdf](http://ec.europa.eu/environment/waste/sludge/pdf/organics_in_sludge.pdf)> (Accessed July 2010).
- Ligon, A.P., Zuehlke, S., Spittler, M., 2008. GC-MS analysis of organic compounds in wastewater and sewage sludge. *J. Sep. Sci.* 31, 143 - 150.
- Martínez, K., Abad, E., Palacios, O., Caixach, J., Rivera, J., 2007. Assessment of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in sludges according to the European environmental policy. *Environ. Int.* 33, 1040 - 1047.
- Matschenko N., Tysklind, M., de Wit, C., Bergek, S., Andersson, R., Sellström, U., 2002. Application of sewage sludge to arable land-soil concentrations of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls, and their accumulation in earthworms. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2515 - 2525.
- Milieu Ltd, WRc and RPA for the European Commission, 2010. Environmental, economic and social impacts of the use of sewage sludge on land. <[http://ec.europa.eu/environment/waste/sludge/pdf/part\\_iii\\_report.pdf](http://ec.europa.eu/environment/waste/sludge/pdf/part_iii_report.pdf)> (Accessed July 2010).
- Mueller, K.E., Mueller-Spitz, S.R., Henry, H.F., Vonderheide, A.P., Soman, R.S., Kinkle, B.K., Shann, J.R., 2006. Fate of pentabrominated diphenyl ethers in soil: abiotic sorption, plant uptake, and the impact of interspecific plant interactions. *Environ. Sci. Technol.* 40, 6662 - 6667.
- North, K.D., 2004. Tracking Polybrominated Diphenyl Ether Releases in a Wastewater Treatment Plant Effluent, Palo Alto, California. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4484 - 4488.
- Öberg, L.G., Andersson, R., Rappe, C., 1992a. De novo formation of hepta- and octa-chlorodibenzo-p-dioxins from pentachlorophenol in municipal sewage sludge. *Organohalogen Compounds* 9, 351 - 354.
- Öberg, L.G., Rappe, C., 1992b. Biochemical formation of PCDD/Fs from chlorophenols. *Chemosphere* 25, 49 - 52.
- Odusanya, D.O., Okonkwo, J.O., Botha, B., 2009. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in leachates from selected landfills sites in South Africa. *Waste Management* 29, 96 - 102.
- Oliaei, F., King, P., Philips, L., 2002. Occurrence and concentrations of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in Minnesota environment. *Organohalogen Compounds* 58, 1885 - 188.
- Osako, M., Kim, Y.J., Lee, D.H., 2002. A pilot and field investigation on mobility of PCDDs/PCDFs in landfill site with municipal solid waste incineration residue. *Chemosphere* 48, 849-856.
- Osako, M., Kim, Y.J., Sakai, S., 2004. Leaching of brominated flame retardants in leachate from Japan. *Chemosphere* 57, 1571 - 1579.
- Rotterdam Convention, 2004. Rotterdam Convention on the Prior Informed Consent Procedure for Certain Hazardous Chemicals and Pesticides in International Trade. <<http://www.pic.int/home.php?type=s&id=77>> (Accessed July 2010).
- Sánchez-Brunete, C., Miguel, E., Tadeo, J., 2009. Analysis of polybrominated diphenyl ethers in sewage sludge by matrix solid-phase dispersion and isotope dilution GC-MS. *J. Sep. Sci.* 32, 109 - 117.

- Shih, Y.H., Wang, C.K., 2009. Photolytic degradation of polybromodiphenyl ethers under UV-lamp and solar irradiations. *J. Hazard. Mater.* 165, 34 – 38.
- Shin, M., Duncan, B., Seto, P., Falletta, P., Lee, D.Y., 2010. Dynamics of selected pre-existing polybrominated diphenylethers (PBDEs) in municipal wastewater sludge under anaerobic conditions. *Chemosphere* 78, 1220 – 1224.
- Song, M., Chu, S., Letcher, R.J., Seth, B., 2006. Fate, partitioning, and mass loading of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) during the treatment processing of municipal sewage. *Environ. Sci. Technol.* 40, 6241 – 6246.
- Stockholm Convention, 2001. The Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. Available from: <<http://chm.pops.int/default.aspx>> (Accessed July 2010).
- Vermeulen, F., Covaci, A., D'Have, J., Van der Brink, N.W., Blust, R., De Coen, W., Bervoets, L., 2010. Accumulation of background levels of persistent organochlorine and organobromine pollutants through the soil-earthworm-hedgehog food chain. *Environ. Int.* 36, 721- 727.
- Wang, Y., Zhang, Q., Lv, J., Li, A., Liu, H., Li, G., Jiang, G., 2007. Polybrominated diphenyl ethers and organochlorine pesticides in sewage sludge of wastewater treatment plants in China. *Chemosphere* 68, 1683–1691.
- WHO/ICP, 1994. Environment Health Criteria 162. Brominated Diphenyl Ethers. World Health Organization, Geneva.
- Zhang, T., Yu, G., Wang, B., Fiedler, H., Huang, J., Deng, S., 2009. Bioanalytical characterization of dioxin-like activity in sewage sludge from Beijing, China. *Chemosphere* 75, 649-653.

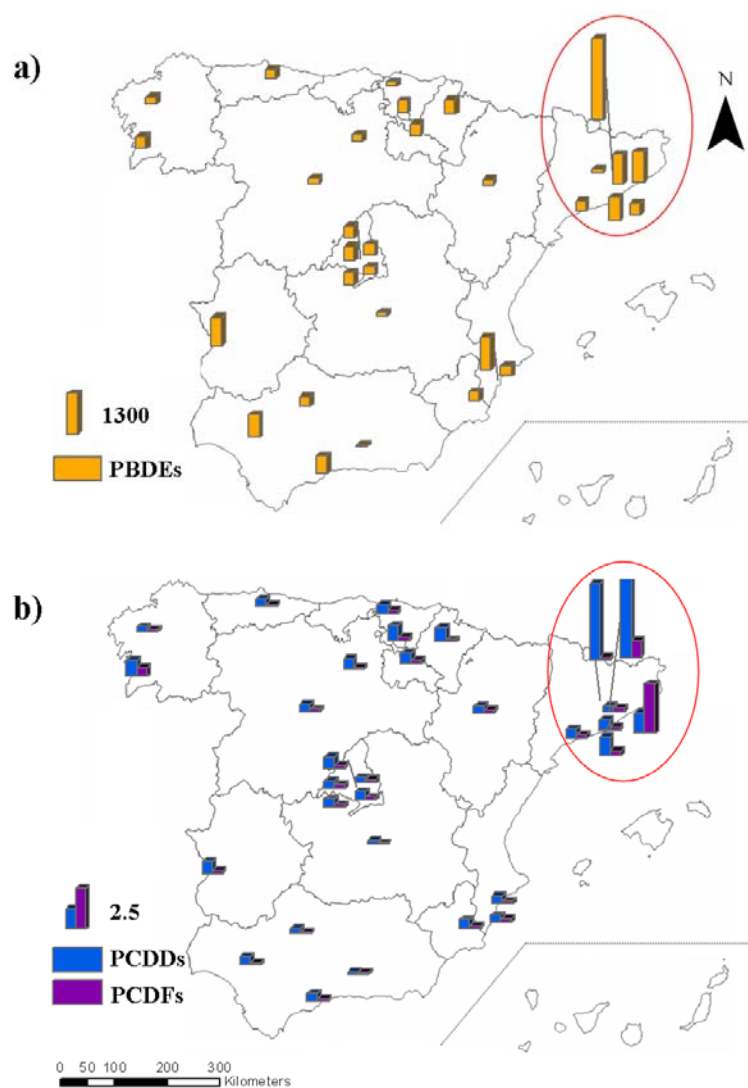


SUPPLEMENTARY MATERIAL

**SOURCES AND BEHAVIOUR OF POLYBROMINATED DIPHENYL ETHERS (PBDES), POLYCHLORINATED DIBENZO-P-DIOXINS AND DIBENZOFURANS (PCDD/FS) IN SPANISH SEWAGE SLUDGE.**

*De la Torre, A., Alonso, E., Concejero, M.A., Sanz, P., Martínez, M.A.*

Persistent Organic Pollutants Group. Environmental Department, CIEMAT, Avd Complutense 22, Madrid 28040 (Spain)



*Fig. S1. Concentrations of PBDEs a) and PCDDs and PCDFs b) in ng/g d.w. corresponding with WWTPs evaluated.*

**Table S1**

Concentrations of PBDEs (ng/g d.w.) obtained in the 31 WWTPs evaluated

WWTP	Campaign	BDE	BDE	BDE	BDE	BDE	BDE	BDE	BDE	BDE	BDE	BDE	BDE	BDE	BDE	BDE	BDE	BDE	BDE	BDE	BDE	BDE	BDE	Mean $\Sigma$ PBDEs $\pm$ SD
		17	28	47	66	77	85	99	100	119	126	138	153	154	156	183	184	191	196	197	206	207	209	
1	1	n.d.	n.d.	14.97	n.d.	n.d.	1.17	28.44	3.74	n.d.	n.d.	0.61	4.24	2.15	0.33	3.06	0.15	0.16	2.09	2.12	12.16	9.89	213.21	298.49
	2	n.d.	0.08	4.93	0.12	n.d.	0.42	7.15	0.38	n.d.	0.06	0.72	1.58	0.51	0.54	1.63	0.94	0.64	0.95	1.07	4.31	3.17	149.38	178.58
	3	n.d.	0.03	0.82	n.d.	n.d.	n.d.	1.89	0.36	n.d.	n.d.	n.d.	0.20	0.09	n.d.	0.26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5.45	9.10
	4	0.07	0.30	26.93	0.29	n.d.	1.65	27.45	2.53	2.31	n.d.	0.80	5.40	1.29	n.d.	2.49	0.16	0.17	1.44	1.30	12.20	11.33	362.77	460.88
2	1	n.d.	0.90	31.29	n.d.	n.d.	1.66	49.50	6.14	n.d.	n.d.	n.d.	5.28	2.48	n.d.	2.92	0.43	n.d.	0.33	0.00	4.21	1.87	236.60	343.61
	2	n.d.	0.15	12.65	0.26	0.03	0.75	16.73	1.31	n.d.	n.d.	n.d.	4.48	3.52	n.d.	3.26	3.09	1.66	1.81	2.32	6.05	5.61	136.68	200.35
	3	n.d.	0.20	16.58	0.31	n.d.	1.51	23.63	2.77	n.d.	n.d.	0.82	4.15	1.27	n.d.	2.74	0.52	0.31	1.83	1.83	10.59	7.92	330.92	407.92
	4	0.83	0.30	23.31	0.51	n.d.	2.07	32.73	1.91	n.d.	n.d.	n.d.	5.21	1.19	n.d.	1.51	0.38	n.d.	1.22	1.08	14.02	10.11	364.10	460.47
3	1	0.15	0.16	11.75	n.d.	n.d.	0.93	23.10	2.42	n.d.	n.d.	0.50	3.76	1.09	n.d.	3.18	0.15	0.31	3.16	3.27	28.57	37.17	484.13	603.79
	2	n.d.	0.36	17.92	n.d.	n.d.	1.34	24.73	4.43	n.d.	n.d.	0.97	3.39	2.29	1.70	3.38	0.71	0.98	2.51	2.79	11.42	6.83	378.67	464.43
	3	n.d.	0.33	25.86	0.48	n.d.	1.21	25.12	3.91	n.d.	n.d.	0.62	4.72	1.90	0.38	2.33	0.22	0.13	1.00	1.41	6.54	6.50	169.01	251.36
	4	n.d.	0.18	12.56	0.29	n.d.	0.78	16.19	1.48	n.d.	n.d.	0.23	1.82	0.57	0.25	1.09	n.d.	0.08	0.64	0.64	5.17	3.76	242.40	288.13
4	1	n.d.	0.21	22.42	0.41	n.d.	2.05	42.61	5.39	n.d.	n.d.	0.81	6.02	2.76	0.50	3.95	0.16	0.25	4.51	3.51	45.43	34.74	1296.81	1472.54
	2	n.d.	0.39	25.44	0.35	n.d.	1.84	31.75	4.12	n.d.	n.d.	0.95	4.59	1.83	0.56	2.37	0.44	0.32	1.47	1.50	12.46	8.27	1570.78	1669.42
	3	n.d.	0.34	21.83	0.54	n.d.	2.80	29.73	4.35	n.d.	n.d.	2.46	7.54	3.56	n.d.	4.46	1.99	1.46	3.35	2.67	21.98	15.49	674.20	798.78
	4	n.d.	0.19	14.77	0.17	n.d.	0.76	15.35	1.79	n.d.	n.d.	0.40	2.95	1.01	n.d.	0.58	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4.42	4.01	161.01	207.41
5	1 <sup>a</sup>																							
	2	n.d.	n.d.	31.23	0.49	n.d.	1.80	34.91	3.70	n.d.	n.d.	n.d.	6.14	3.27	0.32	4.70	1.06	0.78	3.96	3.35	32.84	25.78	1064.43	1218.76
	3	n.d.	0.39	26.52	0.56	n.d.	1.76	33.21	3.08	n.d.	n.d.	0.98	6.07	1.53	1.37	3.63	0.54	0.46	2.76	2.55	20.11	16.48	491.39	613.38
	4	0.16	0.55	29.05	1.27	n.d.	1.31	31.07	0.72	n.d.	0.20	n.d.	3.49	1.64	n.d.	1.08	n.d.	n.d.	4.61	n.d.	32.71	31.22	740.72	879.79
6	1	n.d.	0.15	9.71	0.35	n.d.	0.75	18.12	1.05	n.d.	n.d.	0.48	3.66	0.51	n.d.	3.50	0.13	0.23	4.98	4.07	28.29	32.28	462.66	570.92
	2	n.d.	0.15	7.52	0.24	n.d.	0.68	11.12	1.93	n.d.	n.d.	1.04	2.49	1.56	0.78	1.81	0.73	0.74	1.27	1.39	4.34	3.32	122.54	163.64
	3	n.d.	0.30	18.11	0.25	n.d.	0.84	16.26	1.62	n.d.	n.d.	0.44	2.95	0.71	0.29	2.08	0.18	0.16	0.90	1.16	4.82	5.19	114.09	170.36
	4	0.13	0.41	21.96	0.36	n.d.	1.23	20.11	1.22	n.d.	n.d.	0.66	4.22	0.84	n.d.	3.28	0.18	0.18	2.08	2.09	15.40	15.46	583.19	672.99
7	1	n.d.	0.26	10.97	0.77	n.d.	0.85	20.38	2.72	n.d.	n.d.	0.49	3.20	1.27	0.11	1.98	n.d.	n.d.	2.87	2.05	22.68	22.87	418.52	511.99
	2	n.d.	0.66	28.02	0.57	n.d.	2.57	42.10	4.21	n.d.	n.d.	2.55	7.25	2.21	0.73	5.37	1.88	2.00	3.31	5.00	20.47	13.91	1082.19	1225.01
	3	n.d.	0.45	21.51	0.30	n.d.	1.15	21.88	2.78	n.d.	n.d.	0.74	5.62	1.93	0.08	1.75	0.27	0.15	1.02	1.05	7.77	7.08	224.47	299.99
	4	0.25	0.49	34.77	1.29	n.d.	2.73	38.97	1.31	n.d.	n.d.	0.76	9.77	1.17	n.d.	2.96	n.d.	0.38	2.41	2.01	24.22	19.29	714.91	857.68
8	1	n.d.	0.14	10.07	n.d.	n.d.	0.86	21.08	1.93	n.d.	n.d.	0.52	3.57	0.81	n.d.	2.28	0.12	0.24	2.52	2.21	26.70	19.40	766.23	858.71

9	2	n.d.	0.09	11.70	0.28	n.d.	1.07	17.76	3.53	n.d.	n.d.	10.60	2.64	1.72	1.34	0.63	0.30	0.26	0.60	0.54	11.49	5.90	635.36	705.81	
	3	n.d.	0.03	0.57	0.05	0.04	0.11	0.81	0.13	n.d.	n.d.	0.29	0.45	0.28	0.09	0.28	0.30	0.20	0.35	0.29	3.31	3.44	110.76	121.78	
	4	0.23	0.34	22.75	0.32	n.d.	n.d.	23.57	0.93	2.04	n.d.	n.d.	6.56	n.d.	0.00	4.92	n.d.	3.21	0.00	3.43	15.21	9.99	504.92	598.44	571.16 ± 318.12
	1	n.d.	0.45	14.72	n.d.	n.d.	1.23	30.25	3.77	n.d.	n.d.	0.71	5.17	1.76	0.08	3.94	0.21	0.83	9.57	6.15	33.89	27.06	474.16	613.95	
10	2	n.d.	0.17	12.92	n.d.	n.d.	0.99	17.56	2.42	n.d.	n.d.	0.80	3.17	1.24	0.18	1.61	0.49	0.43	1.17	1.11	4.51	3.40	121.85	174.04	
	3	n.d.	0.32	29.21	0.31	n.d.	2.25	38.51	4.78	n.d.	n.d.	1.24	5.71	2.11	0.20	2.77	0.70	0.74	4.33	2.14	8.25	7.15	94.63	205.37	
	4	n.d.	0.32	8.08	0.84	n.d.	1.93	11.15	0.39	0.71	n.d.	0.40	1.43	n.d.	n.d.	1.58	n.d.	0.00	1.28	1.29	14.02	11.58	363.96	418.96	353.03 ± 205.20
	1	n.d.	0.16	11.49	0.28	n.d.	0.89	19.07	2.12	n.d.	n.d.	0.35	2.85	0.69	0.24	2.23	n.d.	0.07	1.97	1.97	15.93	14.58	323.45	398.34	
11	2	n.d.	0.28	14.91	0.33	n.d.	1.49	19.19	3.10	n.d.	n.d.	1.54	4.23	2.56	0.35	2.89	1.26	0.83	1.59	2.06	9.66	7.39	277.87	351.52	
	3	0.13	0.41	19.61	0.41	n.d.	1.01	18.50	3.56	n.d.	n.d.	0.37	4.25	1.79	0.48	3.39	0.15	0.18	1.57	1.88	9.59	9.14	282.60	359.03	
	4	n.d.	0.25	14.41	0.44	n.d.	0.82	20.06	1.78	n.d.	n.d.	0.33	3.20	0.77	n.d.	2.32	0.00	0.10	1.35	1.57	10.55	10.29	262.18	330.41	359.93 ± 28.39
	1	n.d.	0.26	6.78	0.07	n.d.	0.61	13.24	1.17	n.d.	n.d.	0.37	2.71	0.59	n.d.	2.36	0.74	0.13	3.10	2.53	19.80	21.18	335.77	411.41	
12	2	n.d.	0.11	5.21	0.13	n.d.	0.65	7.32	1.43	n.d.	0.23	1.96	2.73	1.66	1.43	2.52	1.82	1.66	1.76	2.25	5.35	4.96	110.64	153.82	
	3	0.09	0.32	16.19	0.37	n.d.	0.83	16.54	2.11	n.d.	n.d.	0.36	5.34	1.72	0.09	2.13	0.32	0.17	1.74	1.55	11.17	10.86	300.10	371.99	
	4	n.d.	0.18	19.61	0.33	n.d.	1.26	27.77	2.93	n.d.	n.d.	0.34	3.66	1.07	n.d.	1.45	n.d.	0.10	1.00	0.99	5.59	6.25	127.67	200.21	284.36 ± 126.42
	1	0.09	0.96	31.75	0.25	n.d.	2.88	64.62	8.15	n.d.	n.d.	1.41	14.00	6.97	n.d.	13.68	n.d.	n.d.	10.54	12.34	64.48	59.46	1014.20	1305.78	
13	2	n.d.	0.39	22.01	1.00	n.d.	1.31	26.55	3.89	n.d.	n.d.	10.87	3.94	1.74	0.36	2.73	0.54	0.38	1.57	1.49	8.07	6.61	227.21	320.65	
	3	n.d.	0.48	23.35	0.77	n.d.	1.73	32.03	3.03	n.d.	n.d.	1.58	7.00	2.01	0.59	5.59	0.98	0.63	3.46	3.60	20.92	19.13	693.61	820.48	
	4	0.19	0.46	34.41	0.48	n.d.	2.02	36.46	3.45	n.d.	n.d.	1.10	7.99	1.76	0.06	4.19	0.22	0.31	2.96	2.59	17.80	17.29	426.30	560.06	751.74 ± 422.00
	1	n.d.	n.d.	2.80	0.52	n.d.	0.31	5.56	0.58	n.d.	n.d.	0.51	1.26	0.48	0.52	0.84	1.07	0.35	2.22	1.52	3.79	5.75	13.43	41.51	
14	2	n.d.	0.05	1.92	0.12	n.d.	0.61	2.72	0.21	n.d.	n.d.	0.00	0.67	0.23	n.d.	0.59	n.d.	n.d.	0.86	1.05	2.49	4.56	40.37	56.45	
	3	n.d.	0.14	9.24	0.48	n.d.	0.40	8.71	1.46	n.d.	n.d.	0.13	1.65	0.67	n.d.	1.28	n.d.	n.d.	0.58	0.79	4.13	3.95	79.20	112.81	
	4	0.06	0.05	2.59	0.07	n.d.	0.17	3.63	0.34	n.d.	n.d.	n.d.	0.57	0.19	n.d.	0.35	n.d.	n.d.	0.22	0.25	0.91	1.30	8.63	19.33	57.53 ± 39.89
	1	n.d.	0.09	4.71	n.d.	n.d.	0.41	7.61	0.59	n.d.	n.d.	n.d.	1.54	0.23	n.d.	1.07	n.d.	0.22	3.97	2.56	14.97	17.17	134.34	189.47	
15	2	n.d.	0.45	12.31	n.d.	n.d.	0.79	15.63	0.86	n.d.	n.d.	0.77	2.85	1.95	0.39	2.13	0.66	0.52	1.46	1.69	8.28	7.36	238.39	296.49	
	3	n.d.	0.33	23.31	0.36	n.d.	1.84	27.56	3.88	n.d.	n.d.	1.13	4.76	2.07	0.38	2.75	0.54	0.52	1.67	1.68	9.82	8.63	271.30	362.53	
	4	n.d.	0.29	15.32	0.42	n.d.	0.95	21.89	0.87	n.d.	n.d.	0.31	3.40	0.48	n.d.	2.79	n.d.	0.10	1.65	1.72	13.70	12.33	340.45	416.69	316.30 ± 97.80
	1 <sup>a</sup>	n.d.	0.17	6.39	0.27	n.d.	0.74	6.65	1.67	n.d.	0.38	1.25	2.13	2.11	1.07	1.43	1.43	0.80	0.65	1.06	2.11	1.34	15.94	47.58	
16	2	n.d.	0.16	12.11	0.13	n.d.	0.76	13.80	0.96	n.d.	n.d.	0.65	2.69	0.76	0.29	1.57	0.34	0.30	0.88	0.99	4.54	3.99	92.05	136.96	
	3	0.08	0.17	8.24	0.27	n.d.	0.45	11.51	0.51	n.d.	n.d.	n.d.	1.57	0.30	n.d.	0.66	n.d.	0.08	0.24	0.34	3.85	3.39	124.15	155.81	113.45 ± 57.82
	1	n.d.	0.05	6.57	0.36	n.d.	0.37	12.57	1.14	n.d.	n.d.	0.43	2.20	0.53	0.09	1.67	0.13	0.17	3.94	2.63	17.84	11.99	271.89	334.57	
	2	n.d.	0.08	1.95	0.09	n.d.	0.27	1.18	0.04	0.02	n.d.	0.42	0.35	0.11	0.32	0.94	0.58	0.47	0.96	0.92	2.83	2.67	52.04	66.23	
16	3	n.d.	0.22	17.24	0.25	n.d.	1.15	20.00	2.05	n.d.	n.d.	0.51	4.58	1.07	n.d.	1.92	n.d.	n.d.	1.95	1.33	7.97	7.37	207.37	274.97	
	4	n.d.	0.17	13.39	0.54	n.d.	0.97	18.47	1.26	n.d.	n.d.	0.28	2.01	0.49	n.d.	0.67	n.d.	0.08	0.55	0.44	3.90	3.11	153.93	200.25	219.01 ± 115.73

17	1	0.12	0.30	12.91	0.56	n.d.	1.08	23.70	4.15	n.d.	n.d.	0.31	3.90	2.45	n.d.	2.59	n.d.	0.24	2.98	2.30	42.13	35.75	1449.91	1585.37	
	2	0.15	0.57	14.63	0.26	n.d.	0.92	18.85	2.26	n.d.	n.d.	0.51	3.01	0.98	0.35	2.02	0.54	0.37	1.47	1.30	14.92	8.62	666.97	738.70	
	3	n.d.	0.43	15.67	0.40	n.d.	1.58	18.89	2.24	n.d.	n.d.	1.21	3.70	1.63	0.56	2.78	0.71	0.70	2.23	1.80	21.68	15.95	748.71	840.88	
	4	n.d.	0.30	9.64	0.24	n.d.	0.46	9.68	0.68	n.d.	n.d.	0.25	1.19	0.35	n.d.	0.84	0.00	0.11	0.28	0.32	7.75	4.40	725.37	761.87	981.70 ± 404.82
18	1	0.26	0.79	19.72	n.d.	n.d.	2.03	34.18	4.13	n.d.	0.25	0.90	5.49	2.49	n.d.	6.49	0.51	0.61	15.91	6.91	379.00	235.25	3553.20	4268.11	
	2	0.09	0.75	13.56	n.d.	n.d.	1.78	23.65	3.56	n.d.	n.d.	1.58	4.05	2.02	0.32	4.17	0.95	0.91	3.25	2.07	92.56	25.09	3362.26	3542.61	
	3	n.d.	0.63	14.95	n.d.	n.d.	1.20	19.36	2.87	n.d.	n.d.	1.18	4.32	1.83	0.50	4.07	0.72	0.71	3.86	2.99	88.24	35.09	714.60	897.12	
	4	n.d.	0.98	29.63	1.35	n.d.	1.74	35.75	0.52	n.d.	n.d.	0.56	4.29	0.58	n.d.	4.20	n.d.	0.44	3.40	2.77	33.66	27.77	1567.84	1715.46	2605.83 ± 1565.59
19	1	0.08	0.10	10.12	n.d.	n.d.	0.83	20.57	1.16	n.d.	n.d.	0.52	4.14	0.58	n.d.	3.30	n.d.	0.15	3.57	3.04	25.88	34.93	744.18	853.15	
	2	0.12	0.21	11.49	0.28	n.d.	1.06	16.05	3.28	n.d.	n.d.	1.11	3.32	2.37	0.61	3.01	0.80	0.76	1.90	2.00	12.23	9.11	337.43	407.13	
	3	0.08	0.27	16.47	n.d.	n.d.	0.77	15.31	1.05	n.d.	n.d.	0.32	3.92	0.77	n.d.	3.02	0.14	0.15	2.03	2.17	13.17	14.27	345.65	419.56	
	4	n.d.	0.36	18.67	0.26	n.d.	0.97	24.87	0.73	n.d.	n.d.	0.00	0.20	0.32	n.d.	0.53	0.00	n.d.	n.d.	n.d.	1.91	0.73	127.66	177.22	464.26 ± 282.19
20	1	n.d.	0.04	16.88	0.21	n.d.	1.28	30.31	5.71	n.d.	0.51	0.48	4.64	2.46	n.d.	3.31	0.11	n.d.	7.58	4.84	46.05	46.95	689.98	861.35	
	2	0.05	0.26	11.03	0.36	n.d.	1.25	14.51	2.44	0.24	n.d.	1.65	3.52	2.01	1.01	2.20	1.33	0.98	1.73	1.61	12.68	8.43	1336.21	1403.50	
	3	n.d.	0.66	30.41	0.70	n.d.	2.10	38.01	7.18	n.d.	n.d.	1.53	6.45	4.05	0.78	5.10	1.55	2.27	4.60	5.20	25.07	16.22	843.05	994.93	
	4	0.07	0.33	13.13	0.62	1.94	0.79	17.00	1.77	n.d.	0.07	0.51	2.27	1.12	0.26	1.68	0.55	0.28	2.33	1.35	13.40	9.98	447.14	516.59	944.09 ± 366.62
21	1	n.d.	n.d.	9.22	n.d.	n.d.	0.90	17.97	1.77	n.d.	n.d.	0.42	2.98	0.78	n.d.	2.97	n.d.	n.d.	2.14	2.14	13.92	10.93	231.10	297.23	
	2	n.d.	0.07	4.34	0.09	n.d.	0.37	8.01	0.89	0.79	n.d.	0.47	1.35	0.80	0.36	1.45	0.72	0.48	0.84	1.13	3.08	2.67	88.95	116.89	
	3	n.d.	0.08	4.53	0.11	n.d.	0.35	6.12	0.57	0.13	n.d.	0.49	1.30	0.41	0.30	1.13	0.38	0.28	0.77	0.76	3.96	3.00	98.41	123.09	
	4 <sup>a</sup>																								179.07 ± 102.37
22	1	n.d.	0.21	10.19	0.06	n.d.	0.93	22.94	2.34	n.d.	n.d.	0.49	3.47	1.59	n.d.	2.10	0.17	n.d.	2.42	2.51	16.21	10.00	305.03	380.67	
	2	n.d.	0.07	3.21	0.12	n.d.	0.52	2.74	0.04	n.d.	n.d.	0.35	0.42	0.06	0.22	0.76	0.40	0.39	0.70	0.71	2.47	2.05	52.16	67.38	
	3	0.07	0.17	20.08	0.78	n.d.	1.16	20.98	2.49	n.d.	n.d.	0.57	4.12	1.15	n.d.	1.49	n.d.	0.05	0.88	0.79	4.72	3.44	96.18	159.12	
	4	n.d.	0.17	15.45	0.30	n.d.	0.88	20.46	2.74	n.d.	n.d.	0.32	2.72	1.14	n.d.	1.13	n.d.	0.12	0.80	0.79	5.81	5.60	113.11	171.55	194.68 ± 132.41
23	1	n.d.	n.d.	6.91	0.43	n.d.	0.49	11.60	1.66	n.d.	n.d.	0.43	1.93	1.07	0.32	1.37	0.36	0.25	1.37	1.36	8.53	12.80	103.48	154.37	
	2	n.d.	n.d.	8.10	0.54	n.d.	1.32	24.50	2.25	n.d.	n.d.	1.09	4.62	1.78	0.78	2.65	1.20	1.06	1.98	3.20	14.67	10.13	470.25	550.12	
	3	n.d.	n.d.	22.53	0.34	n.d.	1.55	26.34	2.00	n.d.	n.d.	1.79	4.70	2.01	1.02	3.79	2.08	1.26	2.16	2.85	8.25	7.55	254.80	345.12	
	4	0.18	0.14	9.21	0.23	n.d.	0.79	13.88	1.19	n.d.	0.24	0.35	2.02	0.89	0.15	0.55	0.27	0.07	n.d.	n.d.	1.21	0.86	54.01	86.24	283.99 ± 208.55
24	1	n.d.	0.12	5.17	n.d.	n.d.	0.35	9.89	1.56	0.46	n.d.	0.22	1.69	0.79	0.00	1.49	0.20	0.10	1.69	1.72	11.07	9.39	165.35	211.26	
	2	n.d.	0.05	3.44	0.18	n.d.	0.45	4.61	0.47	n.d.	n.d.	0.29	0.80	0.40	0.25	0.61	0.20	0.23	0.36	0.53	2.09	3.18	34.44	52.56	
	3	n.d.	0.03	6.04	0.12	n.d.	0.61	9.88	0.61	n.d.	n.d.	0.59	2.13	0.54	0.30	1.29	0.40	0.28	0.60	0.76	4.09	3.64	75.16	107.05	
	4	n.d.	0.09	8.20	0.37	n.d.	0.63	14.04	1.00	n.d.	n.d.	0.31	2.27	0.48	0.11	1.18	0.21	0.10	0.54	0.74	4.82	4.27	121.74	161.09	132.99 ± 68.45
25	1	n.d.	n.d.	16.90	n.d.	n.d.	2.28	38.87	3.86	n.d.	n.d.	0.89	6.11	1.69	n.d.	2.16	n.d.	n.d.	1.12	1.65	17.40	11.16	358.00	462.11	
	2	n.d.	n.d.	4.87	n.d.	n.d.	n.d.	5.74	1.01	n.d.	n.d.	0.46	1.31	0.85	0.27	0.83	0.68	0.37	n.d.	0.29	1.46	0.85	112.18	131.18	
	3	n.d.	0.14	7.44	0.21	n.d.	0.34	7.30	1.26	n.d.	n.d.	0.31	2.05	0.96	0.10	1.06	0.21	0.12	0.50	0.62	4.73	4.22	154.94	186.50	



	4	n.d.	n.d.	9.66	0.22	n.d.	0.56	14.08	1.29	n.d.	n.d.	0.30	2.04	0.59	n.d.	1.09	n.d.	0.14	0.88	0.86	9.08	10.33	285.69	336.82	279.15 ± 149.75
26	1	n.d.	n.d.	2.51	0.23	n.d.	0.24	4.40	0.45	n.d.	0.00	0.34	0.84	0.25	0.32	1.71	n.d.	1.25	6.46	4.71	11.46	17.69	68.10	120.95	
	2	n.d.	0.07	3.32	0.13	n.d.	0.49	4.91	0.77	n.d.	0.23	0.35	1.06	0.63	0.31	0.99	0.31	0.27	1.22	1.02	4.04	4.64	49.34	74.10	
	3	0.09	0.09	4.65	0.08	n.d.	0.25	4.83	0.70	0.08	n.d.	n.d.	1.16	0.38	n.d.	1.10	n.d.	n.d.	1.07	0.73	4.36	4.71	76.19	100.47	
	4	n.d.	0.21	8.99	0.57	n.d.	0.45	9.08	1.28	n.d.	n.d.	n.d.	2.59	1.09	n.d.	1.67	n.d.	n.d.	1.46	1.40	5.00	6.65	103.44	143.88	109.85 ± 29.71
27	1	n.d.	0.78	23.96	0.74	n.d.	2.00	47.80	5.61	n.d.	n.d.	0.85	6.93	2.35	n.d.	3.63	n.d.	n.d.	3.11	3.20	19.60	18.50	314.64	453.70	
	2	0.25	1.03	16.98	0.60	n.d.	3.18	9.94	n.d.	n.d.	n.d.	1.41	4.14	3.91	2.28	4.16	3.71	2.13	2.89	2.62	13.98	10.58	439.10	522.89	
	3	n.d.	n.d.	19.03	0.20	n.d.	0.65	16.01	2.46	n.d.	n.d.	0.22	2.54	1.11	n.d.	1.27	n.d.	n.d.	0.47	0.60	3.89	3.33	98.99	150.78	
	4	n.d.	0.18	15.30	0.22	n.d.	1.03	20.59	1.64	n.d.	n.d.	0.32	2.33	0.73	n.d.	1.33	n.d.	0.08	0.79	0.87	6.98	4.83	343.24	400.47	381.96 ± 162.07
28	1	n.d.	n.d.	21.36	n.d.	n.d.	1.44	34.82	3.34	n.d.	n.d.	0.55	3.83	0.94	0.06	1.64	n.d.	n.d.	1.47	1.58	9.51	12.21	162.40	255.15	
	2	n.d.	0.38	27.53	n.d.	n.d.	1.56	25.40	3.31	n.d.	n.d.	1.48	3.87	2.32	0.87	2.35	1.51	0.97	1.59	1.35	14.74	9.14	475.08	573.46	
	3	0.09	0.27	27.85	0.46	n.d.	1.15	22.69	1.86	n.d.	n.d.	0.57	3.35	1.10	0.14	1.13	0.26	0.15	0.61	0.68	3.87	3.62	109.05	178.90	
	4	n.d.	0.17	18.57	0.42	n.d.	0.65	19.71	0.81	n.d.	n.d.	0.12	1.39	0.21	n.d.	0.34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.17	1.19	113.78	159.52	291.76 ± 192.28
29	1	n.d.	0.27	24.26	0.52	n.d.	2.36	58.14	6.82	n.d.	n.d.	0.97	8.55	3.34	n.d.	3.20	0.17	0.22	2.90	2.55	29.44	20.51	614.30	778.53	
	2	n.d.	0.16	6.93	0.23	n.d.	0.87	3.49	0.13	n.d.	n.d.	0.76	0.82	0.24	0.37	2.61	0.42	0.39	1.39	1.72	5.23	4.65	170.37	200.76	
	3	0.1	0.25	17.46	0.70	n.d.	0.89	16.72	1.17	n.d.	n.d.	0.41	3.99	0.62	n.d.	2.97	n.d.	n.d.	1.32	1.40	8.28	7.70	271.51	335.49	
	4	n.d.	0.26	5.69	0.67	n.d.	1.13	9.72	0.28	n.d.	n.d.	0.49	1.13	0.24	0.12	1.64	n.d.	0.21	1.36	1.33	7.13	8.13	230.79	270.32	396.27 ± 260.71
30	1	n.d.	n.d.	15.44	n.d.	n.d.	1.73	29.01	1.62	n.d.	n.d.	0.59	4.41	0.72	n.d.	2.77	0.17	0.11	2.80	2.42	28.18	20.09	585.87	695.93	
	2	n.d.	0.10	6.82	0.13	n.d.	0.54	8.45	1.70	n.d.	0.11	0.69	1.84	1.25	0.34	1.00	0.51	0.26	0.67	0.67	2.97	3.01	60.16	91.22	
	3	0.28	0.53	28.79	0.51	n.d.	1.53	25.68	2.78	n.d.	n.d.	0.85	5.58	1.87	0.24	3.91	0.60	0.34	2.19	2.53	19.16	19.02	499.97	616.01	
	4 <sup>a</sup>																								464.50 ± 326.36
31	1	n.d.	0.15	6.86	n.d.	n.d.	0.64	14.44	0.57	0.49	n.d.	0.39	2.57	0.31	n.d.	2.20	0.51	0.13	2.55	2.22	18.22	19.01	389.32	460.59	
	2	n.d.	0.09	4.52	0.10	n.d.	0.37	6.30	0.69	n.d.	n.d.	0.51	4.46	0.35	0.24	1.18	0.41	0.26	0.83	0.85	6.18	4.87	185.20	217.42	
	3	0.09	0.27	40.61	n.d.	n.d.	2.58	40.82	4.93	n.d.	n.d.	0.29	7.72	1.98	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10.45	7.97	451.92	569.64	
	4	0.04	0.16	19.59	0.21	n.d.	1.37	25.29	1.81	n.d.	n.d.	0.33	2.50	0.64	n.d.	0.49	n.d.	n.d.	0.28	0.24	2.73	1.89	106.36	163.94	352.90 ± 193.77

n.d. = non detected.

<sup>a</sup> Samples for sampling season 1 (WWTPs 5 and 15) and season 4 (WWTPs 21 and 30) were not analyzed.

**Table S2**

Concentrations of PCDDs (ng/Kg d.w.) obtained in the 31 WWTPs evaluated.

WWTP	Campaign	2,3,7,8-TCDD	1,2,3,7,8-PeCDD	1,2,3,4,7,8- HxCDD	1,2,3,6,7,8-HxCDD	1,2,3,7,8,9-HxCDD	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	OCDD	$\Sigma$ PCDDs	Mean $\Sigma$ PCDDs $\pm$ SD
1	1	n.d.	2.33	0.46	2.64	1.35	49.39	408.16	464.33	334.35 $\pm$ 109.67
	2	n.d.	1.65	n.d.	0.88	0.56	20.85	196.93	220.87	
	3	n.d.	n.d.	n.d.	2.24	n.d.	38.63	340.79	381.67	
	4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	270.55	270.55	
2	1	n.d.	1.53	n.d.	2.36	1.26	64.96	707.54	777.66	657.69 $\pm$ 127.28
	2	n.d.	n.d.	3.26	4.36	2.34	51.70	507.76	569.42	
	3	n.d.	n.d.	n.d.	3.61	n.d.	51.89	472.52	528.02	
	4	n.d.	n.d.	n.d.	2.55	n.d.	65.17	687.96	755.67	
3	1	2.24	3.65	1.92	7.08	8.65	148.87	1256.81	1429.23	1034.93 $\pm$ 341.73
	2	0.50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	86.53	763.76	850.80	
	3	0.77	n.d.	9.28	62.15	19.41	6783.45	63610.30	70485.36	
	4	0.85	2.72	n.d.	3.61	3.39	78.71	735.48	824.75	
4	1	n.d.	2.60	n.d.	3.66	1.86	72.40	446.55	527.07	423.62 $\pm$ 72.62
	2	n.d.	1.27	n.d.	4.01	1.93	60.19	315.53	382.94	
	3	n.d.	1.71	1.41	3.86	n.d.	56.50	301.41	364.89	
	4	n.d.	4.55	5.78	10.10	8.24	90.06	300.86	419.59	
5	1 <sup>a</sup>									730.29 $\pm$ 84.94
	2	n.d.	1.99	n.d.	2.45	n.d.	63.48	734.18	802.11	
	3	n.d.	2.19	1.08	3.43	1.90	74.52	669.11	752.23	
	4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	87.58	548.95	636.54	
6	1	n.d.	0.85	0.11	2.64	1.03	56.57	461.90	523.10	497.46 $\pm$ 140.86
	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	25.79	283.65	309.43	
	3	n.d.	1.99	n.d.	4.02	n.d.	54.48	446.29	506.79	
	4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	69.26	581.24	650.51	
7	1	n.d.	1.77	0.48	2.06	2.17	44.23	419.40	470.11	537.37 $\pm$ 85.15
	2	n.d.	n.d.	3.86	3.37	7.82	52.12	392.73	459.90	
	3	n.d.	n.d.	n.d.	3.46	3.02	53.73	530.06	590.28	
	4	n.d.	1.61	n.d.	3.68	3.13	46.34	574.41	629.18	
8	1	n.d.	1.91	0.45	1.70	1.54	51.13	527.17	583.90	487.86 $\pm$ 100.36
	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	31.42	316.00	347.42	
	3	n.d.	2.76	1.05	4.25	3.32	53.47	433.28	498.13	
	4	n.d.	n.d.	n.d.	4.58	n.d.	61.01	456.38	521.98	
9	1	n.d.	1.56	n.d.	2.63	1.20	65.26	710.70	781.35	423.90
	2	n.d.	n.d.	n.d.	1.95	n.d.	35.21	325.45	362.61	
	3	n.d.	1.73	n.d.	n.d.	n.d.	46.15	376.03	423.90	

	4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	51.94	416.30	468.24	509.02 ± 186.64
10	1	n.d.	0.94	0.18	2.37	2.08	70.39	631.77	707.74	
	2	n.d.	n.d.	n.d.	1.52	n.d.	37.93	429.13	468.58	
	3	n.d.	2.43	n.d.	2.65	4.41	63.01	552.88	625.38	
	4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	95.43	1021.67	1117.10	729.70 ± 276.67
11	1	n.d.	1.13	0.51	1.77	1.01	45.07	428.86	478.33	
	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	37.82	370.43	408.26	
	3	n.d.	n.d.	1.15	2.67	n.d.	45.44	450.97	500.23	
	4	n.d.	5.41	5.33	8.43	4.10	73.89	581.97	679.12	516.48 ± 115.30
12	1	n.d.	2.07	1.10	4.44	3.25	70.71	1766.21	1847.78	
	2	n.d.	n.d.	n.d.	2.41	n.d.	57.77	978.73	1038.91	
	3	n.d.	n.d.	1.73	3.54	1.77	0.00	807.19	814.23	
	4	0.73	3.49	2.27	7.52	3.54	99.25	883.16	999.96	1175.22 ± 458.97
13	1	0.31	0.69	0.57	1.25	1.01	18.81	139.81	162.45	
	2	n.d.	2.10	2.67	4.36	14.61	52.15	220.99	296.88	
	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8.04	59.20	67.24	
	4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	22.75	121.38	144.13	167.67 ± 95.50
14	1	n.d.	1.64	0.79	2.61	2.01	56.28	448.28	511.62	
	2	n.d.	n.d.	1.20	3.85	n.d.	45.90	449.42	500.37	
	3	n.d.	2.37	n.d.	4.41	n.d.	68.19	597.80	672.77	
	4	n.d.	n.d.	n.d.	2.26	n.d.	50.31	463.55	516.12	550.22 ± 81.27
15	1 <sup>a</sup>									
	2	n.d.	n.d.	n.d.	16.86	n.d.	890.45	4099.53	5006.84	
	3	n.d.	1.37	2.20	11.34	6.79	775.97	3827.08	4624.75	
	4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	714.82	3810.53	4525.35	4718.98 ± 254.20
16	1	n.d.	2.09	2.12	4.69	4.51	65.48	532.22	611.11	
	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	35.18	337.37	372.54	
	3	n.d.	n.d.	n.d.	3.14	n.d.	104.46	912.48	1020.08	
	4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.30	44.76	507.07	553.13	639.21 ± 273.48
17	1	n.d.	0.95	0.27	3.24	2.18	125.29	1467.75	1599.69	
	2	n.d.	1.09	n.d.	2.43	n.d.	61.02	1086.38	1150.92	
	3	n.d.	1.94	n.d.	3.88	2.99	82.39	1664.54	1755.75	
	4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	36.18	625.06	661.24	1291.90 ± 492.44
18	1	n.d.	1.90	0.38	3.88	2.80	138.15	1152.08	1299.19	
	2	n.d.	n.d.	n.d.	2.28	n.d.	91.78	721.01	815.06	
	3	n.d.	3.79	5.04	22.81	9.06	1400.42	14400.72	15841.85	
	4	n.d.	2.24	n.d.	6.39	n.d.	199.86	1960.64	2169.13	5031.31 ± 7228.77
19	1	n.d.	1.13	0.19	2.24	0.96	40.77	445.48	490.77	
	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.82	47.38	498.50	546.70	

	3	n.d.	2.00	n.d.	n.d.	n.d.	0.00	505.92	507.91	
	4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	20.15	394.69	414.84	490.06 ± 55.33
20	1	n.d.	1.41	0.10	1.81	2.10	43.74	314.50	363.66	
	2	n.d.	n.d.	n.d.	1.50	n.d.	38.70	314.56	354.75	
	3	n.d.	1.03	1.30	n.d.	2.22	42.62	382.08	429.26	
	4	n.d.	n.d.	n.d.	1.54	n.d.	46.78	332.65	380.98	382.16 ± 33.23
21	1	n.d.	0.43	0.23	1.34	0.77	41.80	404.42	449.00	
	2	n.d.	n.d.	n.d.	1.30	n.d.	21.05	233.57	255.92	
	3	n.d.	3.56	3.84	6.20	7.68	43.42	489.19	553.89	
	4 <sup>a</sup>									419.60 ± 151.14
22	1	n.d.	2.01	2.14	4.09	4.98	56.31	470.38	539.90	
	2	n.d.	n.d.	n.d.	1.53	n.d.	32.61	326.55	360.68	
	3	n.d.	n.d.	n.d.	3.04	n.d.	47.59	444.70	495.33	
	4	n.d.	n.d.	n.d.	1.61	n.d.	37.44	380.93	419.98	453.97 ± 79.48
23	1	n.d.	4.08	4.65	6.33	7.27	54.31	602.36	679.00	
	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	33.98	574.47	608.44	
	3	n.d.	5.08	7.11	8.22	9.39	38.64	441.98	510.42	
	4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	28.02	330.32	358.34	539.05 ± 138.90
24	1	n.d.	0.78	0.30	2.92	3.08	78.85	622.56	708.49	
	2	n.d.	n.d.	n.d.	2.35	n.d.	32.54	302.98	337.87	
	3	n.d.	n.d.	1.70	5.06	2.19	66.83	510.46	586.23	
	4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	81.95	669.10	751.05	595.91 ± 185.67
25	1	n.d.	0.60	0.51	1.35	0.49	33.71	285.68	322.34	
	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	93.29	809.94	903.23	
	3	n.d.	n.d.	n.d.	1.91	1.60	32.63	244.30	280.43	
	4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	24.69	197.43	222.12	432.03 ± 316.81
26	1	n.d.	0.81	0.40	0.85	1.00	38.96	193.37	235.38	
	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	160.87	160.87	
	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	170.92	170.92	
	4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.46	n.d.	183.11	184.57	187.94 ± 33.09
27	1	n.d.	1.40	0.36	3.21	2.03	86.42	861.41	954.82	
	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.99	60.10	649.69	711.78	
	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.36	50.98	490.89	543.22	
	4	n.d.	n.d.	n.d.	2.35	n.d.	47.66	365.03	415.03	656.21 ± 233.23
28	1	n.d.	0.80	0.22	0.94	0.91	39.67	344.89	387.42	
	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	47.19	427.32	474.51	
	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	20.09	175.92	196.01	
	4	n.d.	n.d.	n.d.	2.19	1.22	30.26	172.66	206.33	316.07 ± 137.42
29	1	n.d.	1.22	0.47	3.11	3.40	80.82	906.04	995.07	

	2	n.d.	n.d.	n.d.	12.95	5.87	122.18	1187.18	1328.18	
	3	n.d.	n.d.	n.d.	4.98	n.d.	80.94	697.62	783.55	
	4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	63.93	643.35	707.28	953.52 ± 277.86
30	1	n.d.	1.07	0.27	3.29	1.91	96.23	956.05	1058.83	
	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	75.87	728.49	804.36	
	3	n.d.	n.d.	1.06	4.41	2.42	88.56	788.24	884.68	
	4 <sup>a</sup>									915.96 ± 130.09
31	1	n.d.	0.80	0.25	1.21	2.12	44.32	313.36	362.06	
	2	n.d.	n.d.	n.d.	0.48	n.d.	15.66	163.28	179.42	
	3	0.87	n.d.	4.52	4.34	6.72	40.98	296.90	354.34	
	4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	36.67	351.24	387.92	320.94 ± 95.43

n.d. = non detected.

<sup>a</sup> Samples for sampling season 1 (WWTPs 5 and 15) and season 4 (WWTPs 21 and 30) were not analyzed.

**Table S3**

Concentrations of PCDFs (ng/Kg d.w.) obtained in the 31 WWTPs evaluated.

WWTP	Campaign	2,3,7,8-TCDF	1,2,3,7,8-PeCDF	2,3,4,7,8-PeCDF	1,2,3,4,7,8-HxCDF	1,2,3,6,7,8-HxCDF	2,3,4,6,7,8-HxCDF	1,2,3,7,8,9-HxCDF	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	OCDF	∑PCDFs	Mean ∑PCDFs ± SD
1	1	6.33	1.20	2.68	2.80	1.03	1.75	0.10	44.36	1.09	133.98	195.31	
	2	7.74	n.d.	1.97	2.68	0.91	1.05	n.d.	17.99	n.d.	44.29	76.64	
	3	4.79	1.62	3.86	3.61	2.24	2.22	n.d.	34.66	n.d.	94.54	147.54	
	4	5.82	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10.66	n.d.	36.92	n.d.	121.38	174.77	148.57 ± 51.79
2	1	16.15	3.48	3.54	5.05	1.25	2.52	n.d.	54.75	1.71	128.30	216.74	
	2	13.79	n.d.	3.35	5.04	2.46	3.85	n.d.	39.32	3.81	127.15	198.78	
	3	6.93	1.92	3.42	6.30	2.28	1.58	n.d.	43.65	2.87	219.61	288.56	
	4	5.13	1.75	3.74	3.96	3.10	3.54	n.d.	41.19	n.d.	99.91	162.32	216.60 ± 53.05
3	1	21.82	4.68	7.24	8.38	3.96	3.25	0.51	69.12	3.62	180.38	302.97	
	2	14.46	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	41.94	n.d.	102.61	159.02	
	3	2.71	1.70	n.d.	7.05	3.07	11.94	n.d.	266.48	17.31	1354.74	1665.00	
	4	5.18	3.23	3.74	4.04	2.97	3.92	n.d.	29.61	n.d.	82.60	135.29	565.57 ± 736.69
4	1	10.80	1.16	2.76	4.12	1.37	2.65	n.d.	68.54	1.88	168.71	261.98	
	2	12.02	1.39	2.85	4.38	1.46	1.95	n.d.	46.14	n.d.	141.07	211.26	
	3	5.53	n.d.	1.75	6.02	1.88	2.79	n.d.	46.53	n.d.	132.90	197.40	
	4	7.45	6.00	11.05	11.26	11.80	18.05	5.64	57.23	8.23	77.28	213.98	221.16 ± 28.16
5	1 <sup>a</sup>												
	2	8.56	1.26	2.89	3.58	1.65	2.51	n.d.	37.75	n.d.	131.20	189.40	
	3	4.68	2.37	n.d.	3.92	2.90	3.46	n.d.	39.02	1.78	115.85	173.97	
	4	3.92	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	39.18	n.d.	108.46	151.56	171.64 ± 19.03

6	1	12.52	1.08	3.51	4.49	0.83	1.83	n.d.	41.38	1.21	127.76	194.61	
	2	4.94	0.87	1.63	2.19	n.d.	n.d.	n.d.	20.45	n.d.	91.39	121.47	
	3	6.19	2.12	5.05	3.68	2.29	3.17	n.d.	36.24	n.d.	124.32	183.06	
	4	10.71	2.54	4.23	3.29	2.33	2.64	n.d.	39.61	n.d.	118.48	183.83	170.74 ± 33.27
7	1	8.34	1.56	2.85	3.70	1.59	2.58	0.11	38.22	1.46	95.11	155.51	
	2	19.62	3.83	6.49	7.06	4.13	6.28	5.33	35.95	16.48	109.19	214.37	
	3	6.14	2.29	4.18	6.14	2.55	3.73	n.d.	38.24	n.d.	90.18	153.45	
	4	5.30	3.31	4.05	5.04	3.84	5.26	1.39	35.82	3.34	89.28	156.61	169.98 ± 29.62
8	1	15.28	3.50	6.40	7.20	2.24	2.07	0.25	36.75	1.77	112.59	188.06	
	2	56.44	7.42	10.69	11.11	3.86	3.93	n.d.	21.53	n.d.	58.68	173.66	
	3	17.64	3.46	8.32	11.46	5.07	5.00	n.d.	39.20	3.30	98.45	191.89	
	4	13.54	5.02	6.91	8.10	5.69	7.31	n.d.	44.29	n.d.	111.29	202.14	188.94 ± 11.79
9	1	15.28	1.55	4.01	5.97	1.31	2.58	n.d.	46.26	1.78	127.81	206.54	
	2	7.62	n.d.	2.57	3.28	n.d.	1.13	n.d.	24.56	n.d.	67.76	106.92	
	3	6.36	n.d.	3.22	7.84	2.36	2.65	n.d.	30.50	3.98	96.42	153.33	
	4	14.17	7.81	18.39	8.10	n.d.	6.13	n.d.	34.04	n.d.	126.25	214.88	170.42 ± 50.35
10	1	13.76	0.92	4.42	4.61	1.30	2.42	n.d.	47.06	1.73	137.65	213.88	
	2	7.70	n.d.	1.66	4.88	n.d.	n.d.	n.d.	24.74	1.14	115.01	155.13	
	3	4.84	n.d.	4.39	3.41	3.04	3.48	3.02	38.84	3.38	112.83	177.22	
	4	5.71	2.43	3.06	n.d.	n.d.	3.31	n.d.	49.15	n.d.	132.34	196.00	185.56 ± 25.21
11	1	8.48	2.21	3.39	3.94	1.97	1.56	n.d.	31.99	0.89	95.61	150.06	
	2	9.30	2.48	4.20	6.18	2.48	3.26	n.d.	24.00	n.d.	70.66	122.55	
	3	3.98	n.d.	2.49	3.12	1.81	3.08	n.d.	29.63	2.77	144.15	191.03	
	4	2.72	4.78	7.02	6.42	6.16	9.61	8.94	35.97	12.33	130.15	224.10	171.94 ± 44.73
12	1	68.23	4.18	13.92	16.49	4.91	4.77	1.26	61.12	2.73	162.95	340.56	
	2	28.11	1.95	5.16	11.75	2.65	3.58	n.d.	58.42	n.d.	152.68	264.30	
	3	5.83	3.47	5.66	4.47	3.65	3.90	0.98	38.65	2.27	136.42	205.30	
	4	9.39	4.37	8.85	8.19	7.64	10.57	2.89	60.62	5.85	153.87	272.24	270.60 ± 55.38
13	1	5.52	1.50	2.20	1.92	0.93	1.02	0.68	9.45	1.52	24.88	49.61	
	2	67.34	16.75	35.16	41.55	15.18	17.83	n.d.	54.72	6.78	66.34	321.65	
	3	3.22	n.d.	1.54	1.20	0.94	0.80	n.d.	6.24	n.d.	11.97	25.93	
	4	1.13	n.d.	0.90	n.d.	1.55	n.d.	n.d.	10.58	n.d.	33.85	48.01	111.30 ± 140.65
14	1	8.17	2.04	2.83	6.16	1.83	3.43	0.12	53.09	1.98	138.77	218.42	
	2	45.07	3.96	6.09	6.51	1.03	3.17	n.d.	44.62	1.92	132.82	245.20	
	3	7.15	1.17	2.82	5.48	2.74	2.39	n.d.	45.79	n.d.	149.86	217.42	
	4	3.03	1.72	3.50	4.95	2.57	3.70	n.d.	34.47	n.d.	79.97	133.92	203.74 ± 48.29
15	1 <sup>a</sup>												
	2	19.73	4.91	3.76	8.40	2.09	5.28	n.d.	37.46	n.d.	103.80	185.43	
	3	4.74	1.71	3.10	3.55	2.08	3.76	2.14	32.76	3.36	110.35	167.54	

	4	4.20	4.21	3.71	6.10	5.10	6.61	3.46	36.16	5.51	93.54	168.59	173.86 ± 10.04
16	1	23.62	6.89	8.09	8.27	3.29	4.44	1.67	31.75	5.23	101.05	194.30	
	2	4.52	n.d.	1.59	n.d.	n.d.	1.33	n.d.	15.42	n.d.	47.05	69.91	
	3	4.19	2.13	2.86	2.47	1.53	2.41	n.d.	20.43	n.d.	108.60	144.63	
	4	1.73	n.d.	0.89	1.68	n.d.	2.48	n.d.	16.21	n.d.	49.77	72.75	120.40 ± 60.18
17	1	11.25	2.32	3.24	4.86	1.72	9.30	n.d.	531.01	6.72	3329.96	3900.39	
	2	9.63	n.d.	2.69	3.24	2.10	6.79	n.d.	259.04	3.89	2100.37	2387.75	
	3	17.10	2.55	5.76	7.20	3.59	8.25	n.d.	199.28	4.50	1484.24	1732.47	
	4	2.94	n.d.	n.d.	n.d.	2.52	8.52	n.d.	504.81	n.d.	3753.09	4271.88	3073.12 ± 1209.48
18	1	12.55	2.07	2.98	3.82	1.23	5.89	n.d.	122.81	2.38	822.74	976.47	
	2	10.59	0.78	2.68	4.30	n.d.	6.28	n.d.	52.57	1.67	302.67	381.54	
	3	11.95	3.37	5.79	14.74	7.92	14.83	5.47	267.61	33.28	2005.57	2370.53	
	4	3.53		2.70	1.84	1.44	8.07	n.d.	75.80	3.57	352.24	449.20	1044.44 ± 923.20
19	1	11.77	1.65	4.20	4.35	1.05	1.60	n.d.	63.51	1.44	226.68	316.25	
	2	8.49	0.72	2.63	4.78	0.55	2.20	n.d.	52.39	n.d.	197.44	269.18	
	3	3.08	1.02	2.44	2.43	1.92	2.28	n.d.	44.30	n.d.	149.20	206.69	
	4	2.80	n.d.	1.35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	40.94	n.d.	158.96	204.04	249.04 ± 53.98
20	1	10.24	2.76	2.74	4.21	1.94	1.52	n.d.	235.34	1.10	146.12	405.97	
	2	6.07	1.10	1.02	2.86	n.d.	2.03	n.d.	39.40	n.d.	185.94	238.42	
	3	9.12	0.90	2.95	3.83	2.03	3.06	n.d.	32.51	1.87	136.65	192.92	
	4	4.77	2.81	n.d.	3.20	1.55	4.92	n.d.	27.16	n.d.	78.20	122.61	239.98 ± 120.48
21	1	9.96	1.43	2.08	2.66	1.26	1.60	n.d.	24.06	n.d.	85.56	128.60	
	2	6.96	1.07	n.d.	3.73	1.32	1.14	n.d.	17.02	n.d.	60.22	91.46	
	3	18.25	5.12	6.63	10.76	6.27	7.01	6.96	29.30	9.91	99.43	199.62	
	4 <sup>a</sup>												139.89 ± 54.96
22	1	12.80	4.48	6.10	5.19	4.44	4.41	4.14	44.94	6.41	159.87	252.79	
	2	7.27	n.d.	n.d.	3.04	n.d.	n.d.	n.d.	21.97	1.46	72.60	106.34	
	3	2.39	n.d.	2.00	1.69	1.37	1.28	n.d.	21.64	n.d.	62.73	93.11	
	4	4.26	1.87	2.00	2.94	n.d.	2.88	n.d.	24.26	n.d.	74.04	112.26	141.12 ± 74.87
23	1	14.64	4.93	6.92	7.76	5.73	7.56	6.49	41.33	11.56	123.37	230.30	
	2	8.02	n.d.	1.86	3.37	1.48	1.28	n.d.	27.29	n.d.	57.03	100.32	
	3	3.98	5.01	6.03	7.04	7.68	9.83	10.72	28.83	14.80	87.79	181.70	
	4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	24.42	n.d.	88.39	112.81	156.28 ± 60.95
24	1	23.68	2.56	6.05	7.97	1.84	4.50	1.38	71.36	3.06	253.05	375.45	
	2	10.71	2.06	3.15	5.87	2.17	2.25	n.d.	24.44	n.d.	69.02	119.68	
	3	5.45	2.63	5.86	5.09	4.44	6.50	2.24	39.74	4.20	97.85	174.01	
	4	5.81	1.97	3.29	3.61	3.63	4.97	n.d.	59.55	n.d.	105.43	188.27	214.35 ± 111.39
25	1	13.18	2.81	2.80	4.84	1.25	1.16	n.d.	30.31	1.05	83.72	141.11	
	2	7.50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	19.34	n.d.	58.69	85.54	

	3	3.28	1.66	3.33	n.d.	1.87	1.83	n.d.	19.70	n.d.	56.76	88.43	
	4	1.22	n.d.	1.54	1.22	n.d.	n.d.	n.d.	16.15	n.d.	37.62	57.74	93.21 ± 34.80
26	1	5.98	1.55	1.90	2.16	0.60	0.67	0.14	12.99	0.83	32.08	58.90	
	2	5.49	n.d.	1.26	2.27	n.d.	n.d.	n.d.	10.85	n.d.	24.31	44.17	
	3	2.53	n.d.	n.d.	1.22	1.78	n.d.	n.d.	11.22	n.d.	19.89	36.65	
	4	4.52	1.98	2.09	1.48	1.13	n.d.	n.d.	11.34	n.d.	26.42	48.97	47.17 ± 9.32
27	1	14.02	3.00	5.83	6.39	2.13	2.78	0.22	82.06	2.30	202.02	320.76	
	2	6.80	n.d.	2.93	4.81	n.d.	2.33	n.d.	59.87	n.d.	193.33	270.07	
	3	5.63	2.08	2.44	3.04	2.35	2.33	n.d.	42.45	1.08	120.69	182.09	
	4	1.80	n.d.	1.52	n.d.	n.d.	1.59	3.02	21.46	n.d.	93.07	122.47	223.85 ± 88.60
28	1	8.54	1.51	1.86	2.52	0.89	1.11	0.31	21.61	1.09	59.85	99.28	
	2	9.69	2.28	3.31	6.60	2.63	n.d.	n.d.	18.89	1.85	35.05	80.30	
	3	3.35	1.43	2.09	1.65	1.41	1.69	n.d.	15.92	n.d.	46.64	74.18	
	4	6.20	2.33	3.73	3.90	2.66	4.39	1.81	23.67	n.d.	56.36	105.05	89.70 ± 14.79
29	1	11.27	1.09	5.04	11.10	5.54	3.99	0.44	62.23	5.28	168.02	274.01	
	2	13.93	3.13	3.77	6.57	2.28	1.88	n.d.	44.06	3.23	117.45	196.29	
	3	3.41	2.14	3.99	4.98	3.08	3.42	n.d.	43.79	n.d.	114.11	178.92	
	4	4.89	2.12	2.19	2.87	1.44	2.28	n.d.	36.65	n.d.	109.83	162.25	202.87 ± 49.42
30	1	7.91	1.31	2.93	3.37	1.53	2.33	n.d.	53.75	1.21	154.53	228.89	
	2	7.47	n.d.	2.02	3.54	n.d.	n.d.	n.d.	28.52	n.d.	86.09	127.64	
	3	4.81	1.29	2.52	2.04	2.13	2.71	n.d.	30.69	1.26	98.43	145.89	
	4 <sup>a</sup>												167.47 ± 53.97
31	1	10.31	3.17	3.34	3.60	1.81	1.75	n.d.	16.66	1.42	43.53	85.60	
	2	27.44	2.38	2.56	4.08	1.01	n.d.	n.d.	16.81	n.d.	62.53	116.81	
	3	33.52	17.68	53.01	78.35	13.58	23.64	12.77	55.54	20.23	129.74	438.06	
	4	2.09	0.71	4.38	3.77	1.49	2.77	n.d.	22.02	n.d.	78.09	115.32	188.95 ± 166.70

n.d. = non detected.

<sup>a</sup> Samples for sampling season 1 (WWTPs 5 and 15) and season 4 (WWTPs 21 and 30) were not analyzed.



## 4.2.- Niveles de concentración y fuentes del contaminante emergente decabromodifenil etano (DBDPE) en lodos de depuradoras

*De la Torre, A., Concejero, M.A., Martínez, M.A. (2010). Concentrations and sources of an emerging pollutant, decabromodiphenyl ethane (DBDPE), in sewage sludge for land application. Submitted.*

### Resumen

Los resultados obtenidos en el estudio anterior (4.1. Fuentes y comportamiento de polibromodifenil éteres (PBDE) y policlorodibenzodibenzo-p-dioxinas y furanos (PCDD/F) en lodos de depuradora Españoles) evidenciaron la utilización de mezclas de tipo DecaBDE en España. Sin embargo la utilización de estas mezclas está siendo cuestionada a nivel internacional y por tanto es de esperar que la industria esté utilizando nuevos retardantes capaces de satisfacer los estándares relativos a la prevención de incendios y sobre los que no existen políticas restrictivas. Con el fin de clarificar este hecho, la Unión Europea presentó un documento en el que se describen los posibles sustitutos para las mezclas DecaBDE y, así, entre los principales candidatos se incluye el decabromodifenil etano (DBDPE) (ECB, 2007).

En este trabajo se evaluó la presencia de DBDPE en lodos de EDAR españoles. Para ello se analizaron las muestras obtenidas entre abril y junio de 2006. Las concentraciones de este compuesto se compararon con aquéllas obtenidas para el BDE-209, principal congénere de las mezclas DecaBDE, con objeto de evaluar el grado de sustitución de las mismas.

Las etapas de extracción y purificación se realizaron de manera similar al trabajo anterior (4.1. Fuentes y comportamiento de polibromodifenil éteres (PBDE) y policlorodibenzodibenzo-p-dioxinas y furanos (PCDD/F) en lodos de depuradora Españoles): extracción mediante fluidos presurizados (ASE 100, Dionex, Sunnyvale, CA, USA) seguida de una primera etapa de purificación mediante digestión con ácido sulfúrico concentrado y un segundo paso de cromatografía de adsorción en columnas a presión. Este último se realizó en un equipo de purificación automatizada Power Prep™ System (FMS® Inc, USA), incluyendo columnas de sílice, alúmina y carbón. Se obtuvieron dos fracciones, eluyendo el DBDPE en la fracción de los no orto PCB. El análisis instrumental del DBDPE se realizó en un HRGC-LRMS/MS (Varian CP-3800 – Varian 320-MS-TQ) operando en ionización electrónica positiva, MS/MS. La cuantificación del DBDPE se realizó mediante dilución isotópica, utilizando patrones marcados con carbono trece (<sup>13</sup>C<sub>14</sub> DBDPE).

Se encontraron niveles de DBDPE en todas las muestras ( $47.0 \pm 29.7$  ng/g m.s.; media  $\pm$  desviación estándar) aunque en menor concentración que los obtenidos para BDE-209 ( $289.7 \pm 235.9$  ng/g m.s.; media  $\pm$  desviación estándar), lo que refleja el mayor uso de las mezclas DecaBDE.



**CONCENTRATIONS AND SOURCES OF AN EMERGING POLLUTANT,  
DECABROMODIPHENYL ETHANE (DBDPE), IN SEWAGE SLUDGE FOR LAND  
APPLICATION**

*De la Torre, A., Alonso, E., Concejero, M.A., Sanz, P., Martínez, M.A.*

Persistent Organic Pollutants Group. Environmental Department, CIEMAT, Avd Complutense 22,  
Madrid 28040 (Spain)

**Keywords:** DBDPE; PBDEs; BDE-209; Sewage sludge.

**Abstract**

The presence of an emerging brominated flame retardant, decabromodiphenyl ethane (DBDPE) has been confirmed in Spanish sewage sludge. In this study, thirty one samples from different urban Wastewater Treatment Plants (WWTPs) were analyzed for decabromodiphenyl ether (BDE-209) and its substitute DBDPE. DBDPE was positively identified and quantified in all samples at lower concentrations ( $47.0 \pm 29.7$  ng/g d.w.; mean  $\pm$  SD) than those obtained for BDE-209 ( $289.7 \pm 235.9$  ng/g d.w.; mean  $\pm$  SD), which is probably reflecting the higher usage of Deca-BDE technical mixture. Influence of the WWTPs characteristics in the pollutant levels was evaluated. No significant correlations could be obtained between pollutant concentrations and the population or sewage sludge production rate associated with the plants. Sources of DBDPE and BDE-209 in the sludge were also evaluated. Statistically significant correlation was obtained for DBDPE and BDE-209 concentrations, indicating a common origin for both compounds, which may be due to leaching during use and disposal of consumer products containing these chemicals. However, BDE-209 content results also influenced by industrial activities, reflecting the infusion of Deca-BDE commercial mixture as source of BDE-209 into the environment.

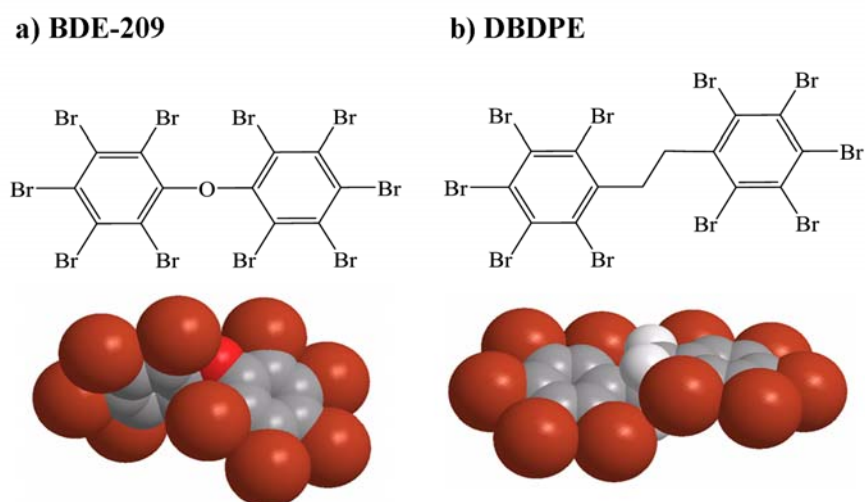
**Introduction**

The most recent estimates reported by the European Commission indicate that more than 11 million tonnes of sewage sludge were produced each year in the 27 EU Member States, of which approximately 48%, almost 5.4 millions tons, was recycled in the agriculture (data predicted for 2010; Milieu et al., 2010). This proportion varies widely between Member States, the highest was reported for Spain (around 65%) while in others like Finland, Belgium or Greece is less than 5%. Although the sludge is rich in nutrients like nitrogen and phosphorus, suggesting its use as fertilizer in agriculture, it also contains potential contaminants such as heavy metals, pathogens and organic compounds. The current European Sewage Sludge Directive 86/278/EEC, sets limit values for heavy metals (cadmium, chromium, mercury, zinc, lead, nickel, and copper) both in soil and sludge, and addressed pathogen reduction, however, sets no limits for organic contaminants. Some of these compounds have been included in the Working Document on Sludge 3<sup>RD</sup> Draft (EU, 2000) (dibenzo-p-dioxins and furans PCDD/Fs,

and polychlorinated biphenyls PCBs) but further research is required on emerging organic pollutants, like brominated flame retardants (BFRs), especially polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and its substitutes.

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are a family of synthetic chemicals widely used in industry to delay, inhibit or even suppress combustion processes (WHO/ICP, 1994, 1997). PBDEs have been produced in three commercial mixtures: Penta-BDE, Octa-BDE, and Deca-BDE, related to their different degrees of bromination (Aleee et al., 2003). Nevertheless, their production and use have been restricted when their persistence, bioaccumulation, and potential toxicity both in environmental and human samples (de Wit, 2002) was demonstrated. Penta- and Octa-BDE commercial mixtures were banned in Europe in 2003 (Directive 2003/11/CE), and have been recently included in the Stockholm Convention (COP 4, 2009). These facts, correlated well with results of our previous study, where we found that PBDEs content in sludge was mainly BDE-209, the major congener of Deca-BDE technical mixture (Martínez et al., 2006). However, Deca-BDE has been recently regulated (2008), banned for use in electronics and electrical applications in Europe (ECJ, 2008), so it should be expected that the market will move to unregulated compounds.

This study evaluates the presence of decabromodiphenyl ethane (DBDPE), which has been included in the list of potential flame retardant alternatives to DecaBDE (ECB, 2007), in sewage sludge. Once entering the WWTPs, both BDE-209 and DBDPE were almost completely sequestered into the sludge (up to 99 %; Ricklund et al., 2008b), and therefore study of this integrative matrix will be helpful to elucidate consumer patterns related to the substitution degree of Deca-BDE by DBDPE. The chemical structures of the two chemicals are similar (Fig. 1.), and hence DBDPE may also become an environmental contaminant of concern (Ricklund et al., 2008a).



**Fig. 1.** Chemical structures and Van der Waals surfaces of: a) BDE-209 and b) DBDPE.

DBDPE is a relatively new BFR with similar applications to DecaBDE as an additive flame retardant (Kierkegaard et al., 2004). DBDPE is available on the market since the mid-1980s, under trade name SAYTEX® 8010 (Albemarle Corp.) and Firemaster 2100 (Great Lakes Chemical Corp.). However, it was in the early 90s when DBDPE became commercially important as an alternative to the Deca-BDE formulation (Arias, 2001). Although it is not as widely used as DecaBDE due to its higher cost (Eljarrat et al., 2005), it is predicted that DBDPE will become one of the major BFR used by the thermoplastics industry (Konstantinov et al., 2006) following restricted policies focused in Deca-BDE and the fact that DBDPE meets the German Dioxin Ordenances not producing polybrominated dibenzo-p-dioxins and only minor quantities of 2,3,7,8-tetrabromodibenzo furan under pyrolysis conditions (Pettigrew, 1993). In fact, an increasing trend substitution of DecaBDE by DBDPE has been reported by Watanabe and Sakai (2003) in Japan.

First report on DBDPE was published in 2004 (Kierkegaard et al., 2004) and since then, several studies have reported the presence of DBDPE in the environment (Eljarrat et al., 2005; Gauthier et al., 2009; Harrad et al., 2008; Julander et al., 2005; Law et al., 2006; Luo et al., 2009; Qiu and Hites, 2008; Zhu and Hites, 2006). Also its presence in human plasma has been proved (Karlsson et al., 2007), demonstrating its wide dispersion in the environment and emphasizing the need of further research related to this emerging pollutant.

In a previous research (Eljarrat et al., 2005) we detected the presence of DBDPE in some sewage sludge extracts prepared for PBDEs analysis, and the need of developing a specific analytical method for its determination appeared. In this paper a method to analyse DBDPE using surrogate standards and based on high resolution gas chromatography (HRGC) coupled with mass spectrometry triple quadrupole operating in tandem mode (TQMS/MS), is developed and applied to 31 sewage sludge samples from Spain.

In order to evaluate the substitution degree of Deca-BDE by DBDPE, BDE-209 as the major congener of Deca-BDE commercial mixture (94 % by weight of the technical mixture; La Guardia et al., 2006) was also analysed. Influence of the WWTP characteristic and waste water treatment method with the DBDPE and BDE-209 concentrations were examined.

## **Materials and methods**

### **Standards and reagents**

Three analytical grade solutions:  $^{12}\text{C}_{14}$ -DBDPE (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , in toluene),  $^{13}\text{C}_{14}$ -DBDPE (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , in toluene), and  $^{13}\text{C}_{12}$ -BDE-138 (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , in nonane) were obtained from Wellington Laboratories, Ontario (Canada). A five points calibration curve was prepared; natives ranging from 5 to 2000 ng/ml and labelled at 100 ng/ml. Analyses were carried out with  $^{13}\text{C}_{14}$ -DBDPE as recovery, and  $^{13}\text{C}_{12}$ -BDE-138 as internal standards.

Other chemicals including: anhydrous sodium sulphate, copper fine powder, sulfuric acid (95-97%), and organic trace analysis grade solvents (hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and toluene) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

### **Sample Collection**

Sewage sludge samples were collected between April and June 2006, from thirty one urban Wastewater Treatment Plants (WWTPs) of different sizes and geographically distributed all over Spain (Fig. 2.). Samples were poured into sealed amber-glass flasks to protect them from light, humidity and other external factors which might change their chemical composition. Upon receiving in the laboratory, samples were dried at 40 °C until constant weight, grounded into a fine powder, and stored at -18 °C until analysis.

Complete details of the plant characteristics are listed in Table S1. Total population associated with the plants was 13.1 millions, representing around 19% of the total Spanish equivalent population and the corresponding sewage sludge production volume of 0.2 millions tonnes was commensurate with 33 % of total Spanish output in 2006 (Mileu et al., 2010). 65 % of the WWTPs evaluated (20 of 31) apply aerobic sewage treatment, whereas the rest (35 %; 11 of 31) are subjected to biological nitrogen (N) and phosphorous (P) elimination in three different digesters: anaerobic, followed by anoxic and finally aerobic. The sludge obtained were mesophilic anaerobically stabilized, subjected to chemical treatment, or no stabilized ( 84 %, 6% and 9 % of the samples analysed). Although all WWTPs evaluated in this study are classified as urban, 48% of them recognised an industrial effluent input. Analysis of PBDEs and concentrations obtained in the same samples have been previously reported (de la Torre, 2010).

### **Extraction and Clean-up**

An Accelerated Solvent Extraction system (ASE 100, Dionex, Sunnyvale, CA, USA) was used to perform the extraction with a mixture of Hexane:Dichloromethane (1:1 v/v) as solvent, 100°C, 1500 psi, 90% volume and three static cycles. Dried sewage sludge (0.5 g) was spiked with <sup>13</sup>C recovery standard (containing 2 ng of <sup>13</sup>C<sub>14</sub>-DBDPE) and mixed with 2.5 g of anhydrous sodium sulphate and 0.5 g of copper fine powder to remove sulphur interferences. This mixture was introduced into the cell previously loaded by inserting one cellulose filter, followed by 2.5 g of anhydrous sodium sulphate. The extract obtained was solvent exchanged into hexane and transferred into a separation funnel where was liquid-extracted with 50 ml of concentrated sulphuric acid.

Following clean-up and fractionation stage was performed in an automated purification Power Prep™ System (FMS Inc., USA) including acidic silica gel, basic alumina and carbon columns. This stage was optimized to analyze various analytes in two separate fractions: Fraction A, containing DBDPE, PCDD/Fs; Fraction B, containing PBDEs. Data for PCDD/Fs and the rest of PBDEs has also been published (de la Torre et al., 2010).

The fractions obtained were finally concentrated using a TurboVap® II evaporator (Vertex Technics, Madrid, Spain) under nitrogen to incipient dryness and re-dissolved in 20 µL of nonane spiked with the internal standard solution (containing 2 ng <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-BDE-138) before being analysed by HRGC-LRMS.

### Instrumental analysis

Complete details of the GC-MS/MS DBDPE analysis optimization are reported in the supplementary material. Analyses were carried out in a CP-3800 Gas Chromatograph (Varian, Walnut Creek, CA, USA) fitted with a 15 m J&W Scientific DB-5MS capillary column (0.25 mm i.d. x 0.10 µm film thickness) and connected to a Varian 320-MS-TQ Spectrometer. Pulsed splitless (30 p.s.i.) injections were performed on an injector set isothermally at 280 °C. The initial oven temperature was set at 140°C with a 1 min hold time, and ramped at 20 °C/min to 310 °C and held for 8 min. Transfer line, ion source and manifold temperatures were 280, 300 and 42 °C, respectively. Helium at a constant flow (1 ml/min) was used as carrier gas.

The selection of the masses to monitor was developed in order to avoid the overlap of the base peak related to the loss of 6 bromines of <sup>12</sup>C<sub>14</sub>-DBDPE fragment [<sup>12</sup>C<sub>14</sub>H<sub>4</sub>Br<sub>4</sub>]<sup>+</sup> and the pentabromobenzyl fragment [<sup>13</sup>C<sub>7</sub>H<sub>2</sub>Br<sub>5</sub>]<sup>+</sup> of <sup>13</sup>C<sub>14</sub>-DBDPE (Konstantinov et al., 2006) Taking into account this problem, a tandem MS/MS method was developed to analyze this compound. First of all, the molecular ions [M+10]<sup>+</sup> of <sup>12</sup>C<sub>14</sub>-DBDPE and <sup>13</sup>C<sub>14</sub>-DBDPE were isolated in the first quadrupole. Then, after optimizing the collision voltages in the second quadrupole, m/z 486.6/484.7 [<sup>12</sup>C<sub>7</sub>H<sub>2</sub>Br<sub>5</sub>]<sup>+</sup> and m/z 971.4 [<sup>12</sup>M+10]<sup>+</sup> for <sup>12</sup>C<sub>14</sub>-DBDPE and m/z 493.3/491.1 [<sup>13</sup>C<sub>7</sub>H<sub>2</sub>Br<sub>5</sub>]<sup>+</sup> and m/z 985.5 [<sup>13</sup>M+10]<sup>+</sup> for <sup>13</sup>C<sub>14</sub>-DBDPE were monitored in the third quadrupole. Analysis were performed at 20 eV electron energy. The lowest energy produced less fragmentation of the molecular ion in the source and consequently, more sensitivity was achieved in the second fragmentation, which means lastly, better limit of detection.

### Quality control

Three criteria were used to ensure the correct identification and quantification of BDE-209 and DBDPE. First, the retention time must be within ± 1 s between the analyte and its labelled standard. Second, the ratio of quantifier and qualifier ions must be within ± 15 % of the theoretical values. Third, the signal to noise ratio must be greater than 5. Instrumental blanks were injections of nonane run after every sample and were used to monitor contamination between GC injections. Procedural blanks were carried out and analysed under the same conditions than samples at a rate of one every ten samples on routine basis in the laboratory. Procedural blanks presented BDE-209 in concentration ranging from non detected to 0.003 ng/gd.w., three orders of magnitude lower than the lowest level found in the samples, whereas DBDPE was at undetectable level. Samples were blank corrected. Recoveries for <sup>13</sup>C<sub>14</sub>-DBDPE and <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-BDE-209 in this study were 63 ± 25% and 75 ± 13% (mean ± SD), respectively. Average limits of detection (LODs), defined as the concentration giving a signal to noise ratio greater than 3, were 0.3 pg/g d.w. and 0.01 ng/g d.w. for DBDPE and BDE-209. Good linearity

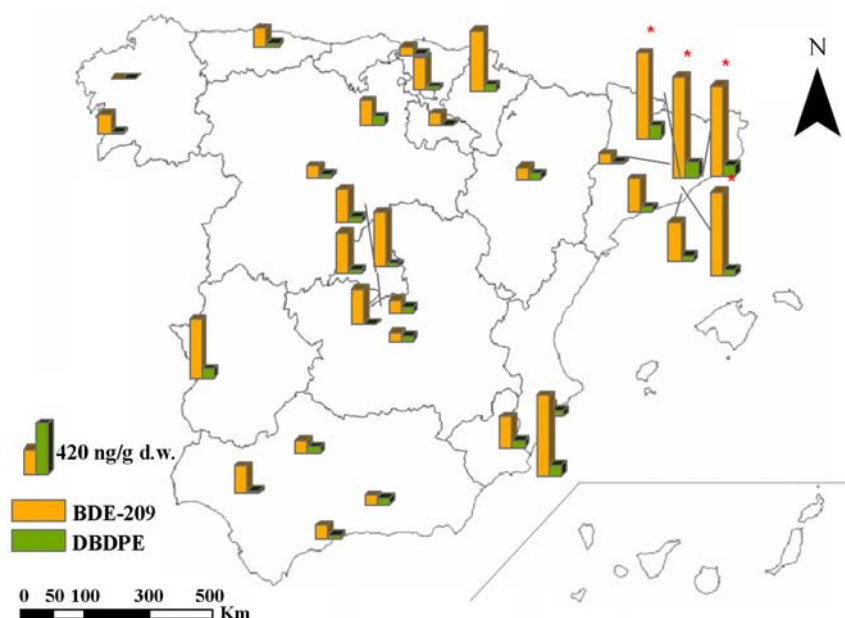
was achieved in the linear dynamic range (5 - 2000 pg) in both cases as the correlation coefficients were 0.998 and 0.995 for DBDPE and DecaBDE, respectively.

## Result and discussion

### DBDPE and BDE-209 in sewage sludges

Concentration levels of the samples analysed are illustrated in Fig. 2. and listed in Table S1. Both DBDPE and BDE-209 were detected in all samples. Concentrations of DBDPE were lower ( $47.0 \pm 29.7$  ng/g d.w.; mean  $\pm$  SD) than those obtained for BDE-209 ( $289.7 \pm 235.9$  ng/g d.w.; mean  $\pm$  SD). BDE-209 levels are similar to those reported previously in Spain. (de la Torre et al., 2007; Eljarrat et al., 2008; Martínez et al., 2006; Sanchez-Brunete et al., 2009) and reflect the higher use of Deca-BDE formulation compare to DBDPE.

DBDPE mean concentration in this study is around two times lower than the one obtained for Europe in an international survey conducted by Ricklund et al., (2008a) ( $81 \pm 62$  ng/g d.w; mean  $\pm$  SD). As commented by the authors, this mean is clearly influenced by relative high DBDPE levels found in samples from Germany and Switzerland (8 of the 18 European samples), and could be easily attributed to their commercial ties and the high imports of DBDPE in Germany (Arias, 2001). No samples from Spain were included in this study. On the other hand, results for DBDPE (ranging from 3.3 to 125.0 ng/g d.w.) are similar to those reported by Kierkegard et al. (2004) in Swedish samples (from non detected to 100 ng/g d.w.), and higher than the levels reported in Canadian sludge samples (from 6 to 32 ng/g d.w.) by Konstantinov et al. (2006) where Deca-BDE technical mixture is widely used.



**Fig. 2.** Concentrations of DBDPE and BDE-209 in ng/g d.w. Samples labelled with an asterisk corresponded to WWTP with input of textile industrial effluents.



**Effect of WWTP characteristics in DBDPE and BDE-209 levels**

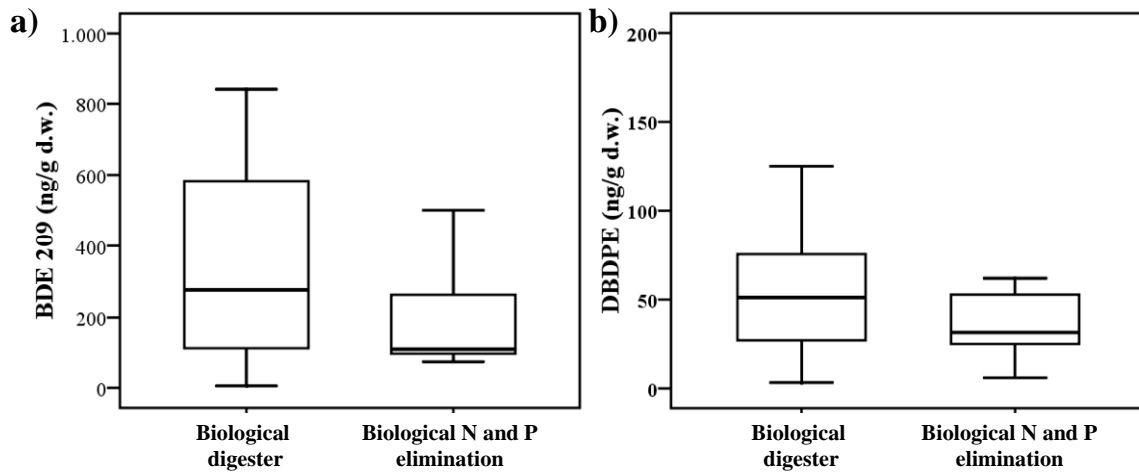
Correlations between DBDPE, BDE-209 levels, and the WWTP characteristics were evaluated by a Pearson’s test, as shown in Table 1.

<b>Table 1.</b> Pearson correlation matrix for WWTPs characteristics and BDE-209 and DBDPE concentrations.						
	Equivalent Population	Rate (t/year)	Influent (% Ind)	BDE-209 (ng/g d.w.)	DBDPE (ng/g d.w.)	DBDPE/BDE-209 ratio
Equivalent Population	1					
Rate (t/year)	0.341	1				
Influent (% Ind)	-0.263	-0.341	1			
BDE-209 (ng/g d.w.)	0.007	-0.288	0.455(*)	1		
DBDPE (ng/g d.w.)	-0.247	-0.169	0.251	0.704 (**)	1	
DBDPE/BDE-209 ratio	-0.239	0.111	-0.467	-0.567 (**)	0.029	1

\*\* significant correlation ( $p < 0.01$ )

\* significant correlation ( $p < 0.05$ )

In agreement with Kierkegaard et al., (2004) and Ricklund et al., (2008a) no significant correlations could be obtained with DBDPE or BDE-209 levels and the WWTPs characteristics: population and sewage sludge production associated with the plants. Nevertheless, the type of wastewater treatment method appears to be an important factor influencing both DBDPE and BDE-209 levels, as shown in Fig. 3.



**Fig 3.** Box and whisker diagram representing distribution of (a) BDE-209 and (b) DBDPE, in sewage sludge samples related to the water treatment process. Biological (aerobic) digester, and biological N and P elimination (anaerobic followed by anoxic and aerobic digester). Upper edge of the box, line within the box, and lower edge of the box, represent the 75<sup>th</sup>, 50<sup>th</sup>, and 25<sup>th</sup> percentiles. Vertical line extends from the minimum to the maximum value.

As can be shown in Fig 3 lower BDE-209 and DBDPE levels were obtained in plants biological N and P elimination wastewater treatment than those from conventional biological digester. Nevertheless this difference is not statistically significant ( $p < 0.05$ ). Biological N and P elimination occurs in three different digesters: anaerobic, followed by anoxic and then aerobic. Phosphate Accumulating Organisms (PAOs) acting in an anaerobic-aerobic cycle have been

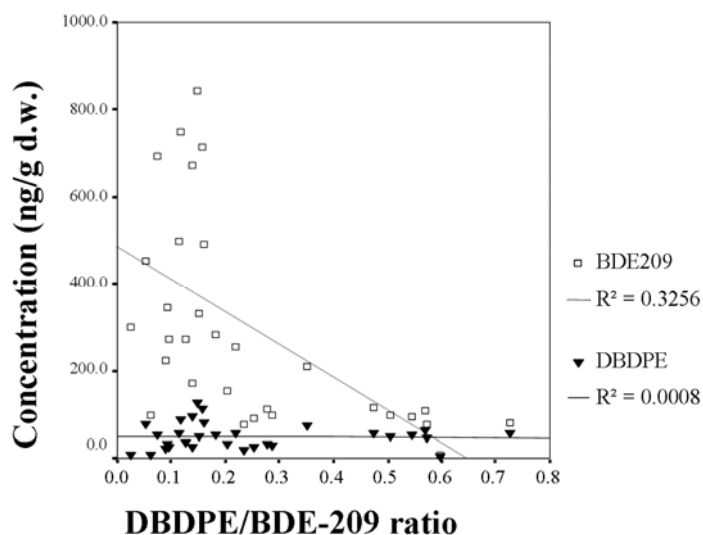
reported to use organic compounds as energy/carbon source (Lee and Choi 1999; Majed et al., 2009). Therefore it is plausible that these microorganisms may degrade DBDPE and BDE-209.

### Sources of DBDPE and BDE-209 in the sludge

DBDPE and BDE-209 concentrations found in sewage sludge samples could be the result of two leaching processes: i) from products containing these chemicals during their use and disposal, and ii) industrial activities related to the infusion of DBDPE and Deca-BDE technical mixtures in consumer products.

As observed in Table 1, DBDPE and BDE-209 concentrations correlated well ( $p < 0.01$ ;  $r = 0.704$ ) indicating a common origin for DBDPE and BDE-209. Interestingly, a more weakly correlation ( $p < 0.05$ ;  $r = 0.455$ ) was obtained with the recognised industrial percentage in the WWTP influent and the BDE-209 levels, while no relation was obtained with DBDPE concentrations. Results indicate that in the case of BDE-209, industrial activities could represent an important source of this pollutant in the sludge, and is reflecting the higher use of Deca-BDE formulation in comparison to DBDPE in Spain. In fact, highest values for BDE-209 were found in samples located in Catalonia region, a zone with presence of important textile industries. These samples are labelled with an asterisk in Fig. 2.

Influence of industrial activities in BDE-209 sludge levels was also demonstrated by the good correlation obtained between DBDPE/ BDE-209 ratios and BDE-209 levels ( $p < 0.01$ ;  $r = -0.567$ ). DBDPE / BDE 209 ratios increased with decreasing BDE-209 concentrations ( $R^2 = 0.3256$ ), as shown in Fig. 4. Similar fact has been reported by Ricklund et al., (2008a), but in our study DBDPE levels remained almost constant ( $R^2 = 0.0008$ ) with ratio changes, demonstrating that the use of DBDPE in Spain is still low compared to Deca-BDE formulation.



**Fig 4.** Diagrams of dispersion of BDE-209 and DBDPE concentrations versus DBDPE/BDE-209 ratio for the samples evaluated.

## Conclusions

DBDPE and BDE-209 were positively detected in thirty one sewage sludge samples from different urban WWTPs. Use and disposal of consumer products resulted the major source for DBDPE in the sludge. However, BDE-209 levels appeared to be also related to the use of Deca-BDE formulation in the industry. Wastewater treatment methods evaluation showed that plants using aerobic treatment presented higher DBDPE and BDE-209 levels compared to those applying biological N and P elimination. This suggests that biological degradation of DBDPE and BDE-209 could occur in the latter treatment.

Considering that Eljarrat et al., (2008) have reported evidence of the cumulative effects of PBDEs in soils amended with sewage sludge, in combination with the fact that 48% of total sewage sludge production is recycled as fertilizer in Europe (65% in Spain; Milieu et al., 2010) DBDPE and BDE-209 content in sewage sludge could lead to increase their concentrations in soils and therefore in the terrestrial food web.

It is hoped that as consumption patterns change new pollutants appear on the sludge. For this reason, studies reporting the presence of emerging pollutants in this matrix, should be taken into account when guidelines governing sewage sludge land application are revised.

## Acknowledgements

This work has been supported by the Spanish Minister of Science and Innovation through the Characterization of the Atmospheric Pollution and POP Unit, Environment Department, CIEMAT, Spain, and by the Center of Civil Engineering Research (CEDEX) through the 44-403-1-096 project (Research on sludge from wastewater treatment. Directive 86/278/CEE) signed with the Ministry of Environment.

## References

- Alaee, M., Arias, P., Sjödin, A., Bergman, A., 2003. An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. *Environ. Int.* 29, 683 - 689.
- Arias, P.A., 2001. Brominated Flame Retardants - an overview. The Second International Workshop on Brominated Flame Retardants BFR 2001. Stockholm, Sweden.
- COP 4, Fourth Meeting of the Conference of the Parties to the Stockholm Convention, 2009. International Institute for Sustainable Development (IISD) Earth Negotiations Bulletin, 15.
- Directive 86/278/EEC on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture.
- de Wit, C.A., 2002. An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere* 46, 583 - 624

- de la Torre, A., Martínez, M.A., Sanz, P., Concejero, M.A., 2007. NCI-MS vs EI-MS for PBDEs analysis in Spanish sewage sludges. Fourth International Workshop on Brominated Flame Retardants BFR 2007. Amsterdam, Netherlands.
- de la Torre, A., Alonso, E., Concejero, M.A., Sanz, P., Martínez, M.A., 2010. Sources and behaviour of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDD/Fs) in Spanish sewage sludge. Submitted for publication to Waste Management 03 August 2010.
- Eljarrat, E., Labandeira, A., Martínez, M.A., Fabrellas, B., Barceló, D., 2005. Occurrence of the "new" brominated flame retardant, decabromodiphenyl ethane, in sewage sludge from Spain. *Organohalogen Compd.* 67, 459 - 461.
- Eljarrat E., Marsh, G., Labandeira, A., Barceló, D., 2008. Effect of sewage sludges contaminated with polybrominated diphenylethers on agricultural soils. *Chemosphere* 71, 1079 - 1086.
- ECB, European Chemicals Bureau, 2007. Review on production processes of decabromodiphenyl ether (DecaBDE) used in polymeric applications in electrical and electronic equipment, and assessment of the availability of potential alternatives to DecaBDE. Institute of Health and Consumer Protection, Joint Research Centre,. EUR 22693 EN.  
<[http://ecb.jrc.it/documents/Existing\\_Chemicals/Review\\_on\\_production\\_process\\_of\\_decaBDE.pdf](http://ecb.jrc.it/documents/Existing_Chemicals/Review_on_production_process_of_decaBDE.pdf)> (Accessed July 2010).
- ECJ, European Court of Justice, 2008. Judgement of 1 April 2008 on joined cases ECJ C-14/06 and C-295/06. *OJ C*, 116. 2008, 51.
- EU, 2000. Working document on sludge, 3rd draft. Brussels.  
<[http://europa.eu.int/comm/environment/waste/sludge/sludge\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/environment/waste/sludge/sludge_en.pdf)> (Accessed July 2010).
- Gauthier, L.T., Potter, D., Hebert, C.E., Letcher, R.J., 2009. Temporal trends and spatial distribution of non-polybrominated diphenyl ether flame retardants in the eggs of colonial populations of Great Lakes herring gulls. *Environ. Sci. Technol.* 43, 312 - 317.
- Harrad, S., Ibarra, C., Diamond, M., Melymuk, L., Robson, M., Douwes, J., Roosens, L., Dirtu, A.C., Covaci, A., 2008. Polybrominated diphenyl ethers in domestic indoor dust from Canada, New Zealand, United Kingdom and United States. *Environ. Int.* 34, 232 - 238.
- INE, National Spanish Statistics Institute 2010. Population Figures of Spain referring to 1/01/2005. Royal Decree 1358/2005, of 18 November; <<http://www.ine.es/>> (Accessed July 2010).
- Julander, A., Westberg, H., Engwall, M., van Bavel, B., 2005. Distribution of brominated flame retardants in different dust fractions in air from an electronics recycling facility. *Sci. Total Environ.* 350, 151 - 160.
- Karlsson, M., Julander, A., van Bavel, B., Hardell, L., 2007. Levels of brominated flame retardants in blood in relation to levels in household air and dust. *Environ. Int.* 33, 62 - 69.
- Kierkegaard, A., Bjorklund, J., Friden, U., 2004. Identification of the flame retardant decabromodiphenyl ethane in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 38, 3247 - 3253.
- Konstantinov, A., Arsenault, G., Chittim, B., Kolic, T., Mac Pherson, K., Mc Alees, A., Mc Crindle, R., Potter, D., Reiner, E., Tashiro, C., Yeo, B., 2006. Characterization of mass-labeled [<sup>13</sup>C<sup>14</sup>]-decabromodiphenylethane and its use as a surrogate standard in the analysis of sewage sludge samples. *Chemosphere* 64, 245 - 249.

- La Guardia, M.J., Hale, R.C., Harvey, E., 2006. Detailed polybrominated diphenyl ether (PBDE) congener composition of the widely used Penta-, Octa-, and Deca-PBDE technical flame-retardant mixtures. *Environ. Sci. Technol.* 40, 6247 - 6254.
- Law, K., Halldorson, T., Danell, R., Stern, G., Gewurtz, S., Alaei, M., Marvin, C., Whittle, M., Tomy, G., 2006. Bioaccumulation and trophic transfer of some brominated flame retardants in a Lake Winnipeg (Canada) food web. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2177 - 2186.
- Lee, S.Y., Choi, J., 1999. Production and degradation of polyhydroxyalkanoates in waste environment. *Waste Management*, 19, 133 - 139.
- Luo, X.J., Zhang, X.L., Liu, J., Wu, J.P., Luo, Y., Chen, S.J., Mai, B.X., Yang, Z.Y., 2009. Persistent halogenated compounds in waterbirds from an e-waste recycling region in South China. *Environ. Sci. Technol.* 43, 306 - 311.
- Majed, N., Matthaus, C., Diem, M., Gu, A.Z., 2009. Evaluation of intracellular polyphosphate dynamics in enhanced biological phosphorus removal process using Raman microscopy. *Environ. Sci. Technol.* 43, 5436 - 5442.
- Martínez, M.A., de la Torre, A., Sanz, P., Navarro, I., Concejero, M.A., 2006. Occurrence of brominated flame retardants in sewage sludges from Spain: Higher brominated diphenyl ethers contribution. *Organohalogen Compd.* 68, 1804 - 1807.
- Milieu Ltd, WRc and RPA for the European Commission, 2010. Environmental, economic and social impacts of the use of sewage sludge on land. <[http://ec.europa.eu/environment/waste/sludge/pdf/part\\_iii\\_report.pdf](http://ec.europa.eu/environment/waste/sludge/pdf/part_iii_report.pdf)> (Accessed July 2010).
- Pettigrew, A., 1993. Halogenated flame retardants. *Encyclopedia of Chemical Technology* 10, 954 - 976.
- Qiu, X., Hites, R., 2008. Dechlorane plus and other flame retardants in tree bark from the northeastern United States. *Environ. Sci. Technol.* 42, 31 - 36.
- Ricklund, N., Kierkegaard, A., McLachlan, M., 2008a. An international survey of decabromodiphenyl ethane (deBDEthane) and decabromodiphenyl ether (decaBDE) in sewage sludge samples. *Chemosphere* 73, 1799 - 1804.
- Ricklund, N., Kierkegaard, A., McLachlan, M., Wahlberg, C., 2008b. Mass balance of decabromodiphenyl ethane and decabromodiphenyl ether in WWTP. *Chemosphere* 74, 389 - 394.
- Sanchez-Brunete, C., Miguel, E., Tadeo, J.L., 2009. Analysis of polybrominated diphenyl ethers in sewage sludge by matrix solid-phase dispersion and isotope dilution GC-MS. *J. Sep. Sci.* 32, 109 - 117.
- Watanabe, I., Sakai, S., 2003. Environmental release and behaviour of brominated flame retardants. *Environ. Int.* 29, 665 - 689.
- WHO/ICP, 1994. Environment Health Criteria 162. Brominated Diphenyl Ethers. World Health Organization, Geneva.
- WHO/ICP, 1997. Environment Health Criteria 192. Flame retardants: a general introduction. World Health Organization, Geneva.
- Zhu, L., R. Hites, R., 2006. Brominated flame retardants in tree bark from North America. *Environ. Sci. Technol.* 40, 3711 - 3716.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

### CONCENTRATIONS AND SOURCES OF AN EMERGING POLLUTANT, DECABROMODIPHENYL ETHANE (DBDPE), IN SEWAGE SLUDGE FOR LAND APPLICATION

*De la Torre, A.\*, Concejero, M.A., Martínez, M.A.*

#### **Instrumental Analysis**

DBDPE analysis were carried out in a Varian 320-MS-TQ Spectrometer equipped with Varian CP-8400 Autosampler and connected to a CP-3800 Gas Chromatograph (Varian, Walnut Creek, CA, USA).

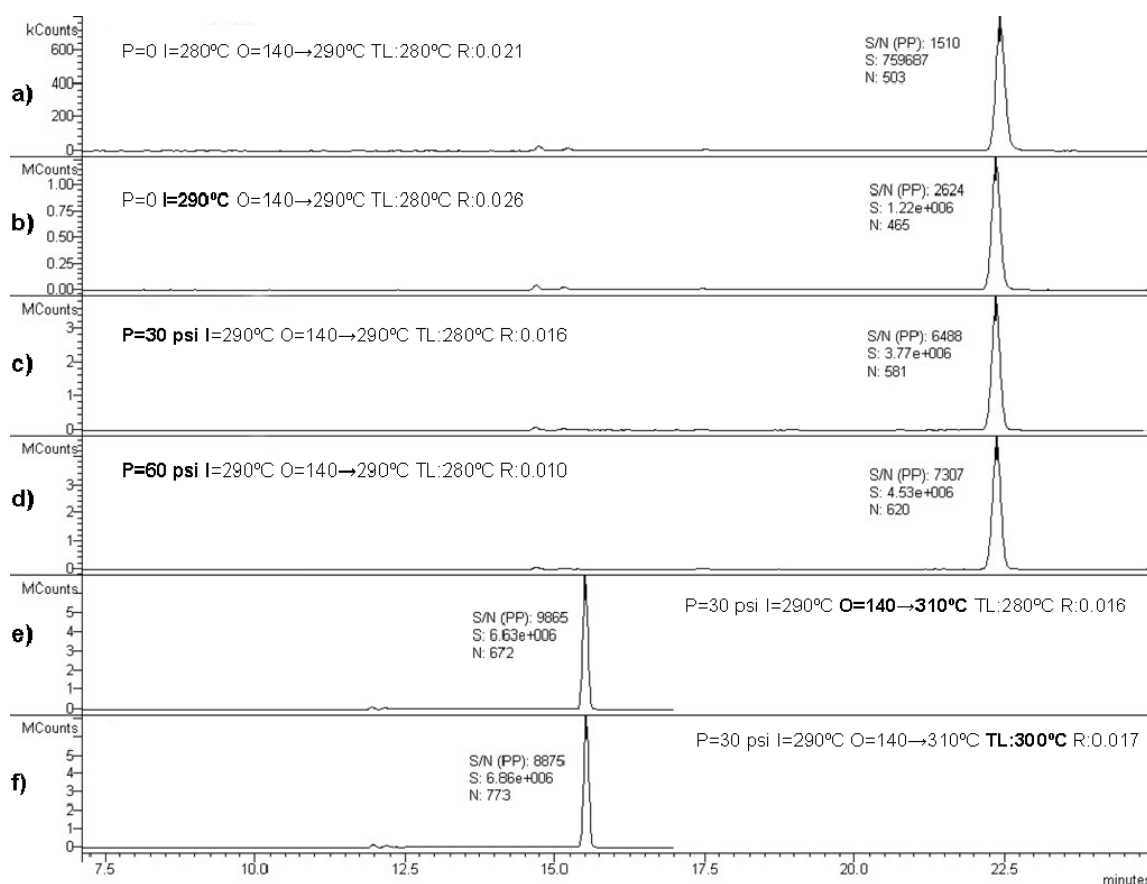
The optimization of the chromatographic program was performed considering structural similarities between DBDPE and DecaBDE. For this reason, the same short and narrow column was selected for its determination; a J&W Scientific DB-5MS (15 m x 0.25 mm x 0.10  $\mu\text{m}$  film thickness). Gas chromatographic (GC) method optimization were carried out in order to achieve the highest sensitivity. Fig S1 shows more representative chromatograms obtained during GC optimization. All the experiments were performed with an initial oven temperature of 140°C (1 min hold time) and ramped at 20 °C/min to final temperature. Influence of: injector temperature (chromatograms a and b), injector pulse pressure (chromatograms c and d), final oven temperature (chromatogram e) and transfer line temperature (chromatogram f) were evaluated. The most suitable chromatographic conditions, with the highest signal to noise ratio, were similar to those used for BDE-209 analyses (de la Torre et al., 2007). Injector sets isothermally at 280 °C and working in pulsed splitless (30 p.s.i. pulsed pressure). Initial oven temperature 140°C (hold for 1 min.) and ramped at 20 °C to 310 °C (hold for 8 min.). Transfer line, ion source and manifold temperatures were 280, 300, and 42 °C, respectively. The system was optimized using helium at a constant flow of 1 ml/min.

By comparing the S/N ratios shown in Fig. S1, it can be proven that the use of a pressure pulse achieves an important improvement in sensitivity, demonstrating that the elution of the DBDPE from the injector to the column is a critical parameter. The same effect had been reported for DecaBDE by other authors (Bjorklund et al., 2004; de Boer et al., 2006)

As shown in Fig. S1, all chromatograms have three small peaks eluting before DBDPE. To elucidate their structures, a full scan injection was done ranging from  $m/z$  400 to  $m/z$  1000. The three major clusters corresponded to the molecular ions  $[M+10]^+$  and consecutive losses of one and two bromine ions from Nona-BDPE. The possible degradation of DBDPE in the GC was assessed in all experiments comparing Area Nona-BDPE / Area DBDPE ratios, Fig. S1. Data evidenced that the degradation decreased when the injector pulsed was used, experiments b and c. The method developed presents an acceptable degradation of DBDPE ( $\cong 1\%$ ), which could be explained by: i) chromatographic conditions, ii) purity of the standard, and iii) possible degradation of standard during storage in the laboratory.

## References

- Bjorklund, J., Tollback, P., Hiarne, C., Dyremark, E., Ostman, C. J., 2004. Application of mass spectrometry in the analysis of polybrominated diphenyl ethers. *J. Chromatogr. A*, 2004. 1041, 201-210.
- de la Torre, A., Martínez, M.A., Sanz, P., Concejero, M.A., 2007. NCI-MS vs EI-MS for PBDEs analysis in Spanish sewage sludges. Fourth International Workshop on Brominated Flame Retardants BFR 2007, Amsterdam, Netherlands.
- de Boer, J., Well, D.E., 2006. Pitfalls in the analysis of brominated flame retardants in environmental, human and food samples –including results of three international interlaboratory studies. *Trends Analyt. Chem.* 25, 364-372.



**Fig. S1.** Consecutive chromatograms obtained during GC optimization for DBDPE: P, pulse (p.s.i.); I, Injector temperature (°C); O, Oven temperature, initial→final, (°C); TL, Transfer Line temperature (°C) and R degradation of DBDPE (Area Nona-BDPE /Area DBDPE in %). In Bold, the parameter changed in regard to the experiment that precedes.

**Table S1.** Characteristics of the WWTPs and levels of BDE-209 and DBDPE obtained in the samples analysed.

Sample	WWTP			Treatment	BDE-209 (ng/g d.w.)	DBDPE (ng/g d.w.)	DBDPE/ BDE-209
	Equivalent population	Rate (t/year)	Influent (% Ind.)				
1	188610	4149	n.r.	A	5.5	3.3	0.60
2	195000	3000	n.r.	A	330.9	49.6	0.15
3	400000	4500	n.r.	A	169.0	23.3	0.14
4	280000	2569	n.r.	A	674.2	92.6	0.14
5	143324	3838	n.r.	A	491.4	78.8	0.16
6	288000	50512	n.r.	A	114.1	54.0	0.47
7	620000	18300	n.r.	A	224.5	19.8	0.09
8	575000	47450	n.r.	A	110.8	30.8	0.28
9	562500	7686	n.r.	A	94.6	51.6	0.55
10	950000	12867	n.r.	A	282.6	50.9	0.18
11	1000000	17949	n.r.	A	300.1	6.9	0.02
12	1314831	12960	n.r.	A	693.6	51.5	0.07
13	105851	3910	n.r.	A	79.2	57.5	0.73
14	116000	3709	15	A	271.3	33.9	0.12
15	80000	2510	16	A	92.0	23.3	0.25
16	622673	8708	20	A	207.4	72.5	0.35
17	228000	4216	20	A	748.7	87.0	0.12
18	225000	2500	20	A	714.6	112.0	0.16
19	320000	3147	35	A	345.6	32.3	0.09
20	165000	2800	40	A	843.0	125.0	0.15
21	700000	16719	n.r.	B	98.4	49.6	0.42
22	570000	8166	n.r.	B	96.2	27.6	0.29
23	590000	32872	n.r.	B	254.8	56.0	0.22
24	852961	24005	4	B	75.2	17.5	0.23
25	259125	17184	8	B	154.9	31.5	0.20
26	195323	1560	10	B	76.2	43.7	0.54
27	466560	2680	10	B	99.0	6.0	0.06
28	382249	12184	10	B	109.0	62.1	0.23
29	350000	6600	20	B	271.5	26.0	0.05
30	650000	8000	25	B	499.7	56.4	0.11
31	456304	8639	51	B	451.9	24.1	0.17
				average	289.7	47.0	0.25
				range	5.5 – 843.0	3.3 – 125.0	0.02 – 0.73

n.r. no recognised input of industrial effluents.

<sup>a</sup> type of treatment: A) Conventional biological (aerobic digester), and B) Biological elimination of N and P (anaerobic + anoxic + aerobic digester).



### 4.3. Concentraciones y fuentes de Declorane Plus en lodos de depuradora

*De la Torre, A., Sverko, E., Alae, M., Martínez, M.A. (2010). Concentrations and Sources of Dechlorane Plus in Sewage Sludge. Accepted in Chemosphere 01/11/2010.*

#### Resumen

El Declorane Plus (DP) o Declorane 605, es un retardante de llama clorado de tipo aditivo que se ha utilizado desde mediados de los años sesenta (Hoh et al., 2006), aunque su producción no despegó totalmente hasta que se empleó como sustituto del Mirex o Declorane, cuando la utilización de éste se prohibió en 1978 (WHO, 1984). Aunque se ha usado durante casi 50 años, hasta el año 2006 no se detectó en el medio ambiente (Hoh et al., 2006), y desde entonces se han publicado estudios que demuestran su presencia en muestras abióticas y bióticas (Gauthier et al., 2007, Hoh et al., 2006; Qiu et al., 2007a, 2008; Sverko et al., 2008; Tomy et al., 2007). Sin embargo, hasta donde el autor conoce, éste es el primer trabajo que presenta niveles de DP en lodos de depuradora.

Para poder comparar los niveles de DP en lodos de EDAR con los previamente obtenidos para DBDPE y PBDE, se analizaron las mismas muestras, es decir, las recogidas entre abril y julio de 2006. La etapa de extracción se realizó mediante fluidos presurizados (ASE 100, Dionex, Sunnyvale, CA, USA). La purificación se llevó a cabo de manera secuencial en dos etapas: la primera consistió en una digestión con ácido sulfúrico concentrado y la segunda se realizó en columna multicapa (sílice neutra y ácida) eluída a presión atmosférica. El análisis instrumental se realizó en un HRGC-LRMS (Agilent 6890N – Agilent 5973MSD) operando en ionización química por captura electrónica (ECNI) y usando metano como gas moderador. En el momento de la realización de este trabajo no existían patrones marcados isotópicamente para ninguno de los dos isómeros de DP (*syn*-DP y *anti*-DP) y por este motivo la cuantificación se realizó por patrón externo, con una recta preparada a partir de patrones  $^{12}\text{C}_{18}$ -DP de los dos isómeros.

Se encontraron niveles de *syn*-DP (0.903 – 19.1 ng/g m.s.; min - max) y *anti*-DP (1.55 – 75.1 ng/g m.s.; min - max) en todas las muestras analizadas, obteniéndose un  $f_{syn}$  medio entre 0.20 y 0.42 (min - max). Estos niveles son más bajos que los cuantificados para PBDE (punto 4.1) y DBDPE (punto 4.2) en las mismas muestras, lo que significa que la utilización del DP es menor en España, comparada con la de las mezclas DecaBDE y el DBDPE.





Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chemosphere](http://www.elsevier.com/locate/chemosphere)

## Concentrations and sources of Dechlorane Plus in sewage sludge

Adrián de la Torre<sup>a,\*</sup>, Ed Sverko<sup>b</sup>, Mehran Alaei<sup>b</sup>, María Ángeles Martínez<sup>a</sup><sup>a</sup>Persistent Organic Pollutants Group, Environment Department, CIEMAT, Avd. Complutense 22, Madrid 28040, Spain<sup>b</sup>Water Science and Technology Directorate, Environment Canada, 867 Lakeshore Road, Burlington, ON, Canada L7R 4A6

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 June 2010

Received in revised form 26 October 2010

Accepted 31 October 2010

Available online xxxx

#### Keywords:

Dechlorane Plus

Sewage sludge

Flame retardant

### ABSTRACT

Sewage sludge from 31 urban Spanish wastewater treatment plants (WWTP) was analyzed for the emerging halogenated flame retardant Dechlorane Plus (DP). Concentrations of the two major isomers in the technical mixture, *syn* and *anti*, ranged between 0.903–19.2 and 1.55–75.1 ng g<sup>-1</sup> dry weight, respectively. Overall, concentrations of DP were lower than those of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) (9.10–995 ng g<sup>-1</sup> dry weight) and this is likely related to the higher usage of brominated flame retardants. The average ratio of the *syn* isomer to total DP ( $f_{syn}$ ) was  $0.28 \pm 0.05$ , which is similar to that of the commercial mixture. Comparing different wastewater treatment methods, we found lower concentrations in those using biological nitrogen and phosphorous elimination, suggesting that DP is susceptible to microbial degradation and that *anti*-DP is more so, given the enrichment of *syn*-DP in the sewage sludge. Principal components analysis revealed significant positive correlation ( $r = 0.619$ ,  $p < 0.05$ ) between total DP concentrations with the contribution of industrial input to waste streams. This implies release of DP is related to industrial activity, likely stemming from the use of the technical product during manufacture of consumer goods. However, use and disposal of products containing DP could not be dismissed. According to our knowledge, this is the first report on DP in WWTP sludge.

© 2010 Published by Elsevier Ltd.

### 1. Introduction

In the past several decades most attention related to persistent organic pollutant (POP) monitoring has focused on the release of these chemicals through production, use and environmental occurrence. Contemporary studies have shown that wastewater treatment plants (WWTPs), treating waste largely from domestic and industrial inputs, are sources of POPs and require further investigation with regards to their overall contribution of the contaminant burden to the environment (Moon et al., 2008). Widely available consumer products containing these compounds can end up becoming a source of these contaminants. This is the case for flame retardants (FRs) which are chemicals added to an extensive variety of manufactured items to inhibit or delay combustion processes (WHO, 1997). While the use of FRs may spare lives and reduce material damage costs incurred during fires, these compounds are able to leach out of products and find their way into the environment, in particular via WWTPs. Being largely lipophilic, organic FRs are predisposed to binding to the lipid rich sewage sludge once in the WWTP stream. Mass balance calculations of the widely-used flame retardant polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) concluded that 96% are sorbed to sewage sludge (North, 2008). Considering this statistic in combination with the fact that

around 65% of total sewage sludge production in Spain (approximately 0.7 million tonnes in 2005) is used as fertilizer (WNIPS, 2008), the presence of pollutants in this matrix should be considered before its agricultural application. Although several studies have reported concentrations of PBDEs in sewage sludge (Martínez et al., 2006; De la Torre et al., 2007) and the fate of these chemicals after agricultural application (Eljarrat et al., 2008), sewage sludge may also contain new pollutants yet to be evaluated. This is the case for Dechlorane Plus (DP).

DP (CAS #13560-89-9; C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>) is a chlorinated FR additive introduced as a replacement for Dechlorane, or Mirex (C<sub>10</sub>Cl<sub>12</sub>), when production and use of the latter was banned and later included in the Stockholm Convention (UNEP, 2010). DP has been produced by Hooker Chemicals (now Occidental Chemical Company, OxyChem) since the mid 1960s (Hoh et al., 2006). In the United States, DP is a high production volume (HPV) chemical and therefore subject to the United States Environmental Protection Agency's HPV challenge (Tomy et al., 2007). As a result, OxyChem voluntarily committed to the development of a test plan for DP (USEPA, 2004), results of which showed that DP presented characteristics typical of a POP, namely high lipophilicity ( $\log -K_{ow} = 9.3$ ), low photodegradation (>24 years), bioaccumulation in fish, and lack of biodegradation. However, controversy exists related to the latter property since DP is reported to biodegrade under aerobic conditions (Oxychem, 2010a), indicating that more research in needed to clarify this behavior. The three commercial

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 346 6022; fax: +34 91 346 6469.

E-mail address: [adrian.delatorre@ciemat.es](mailto:adrian.delatorre@ciemat.es) (A. de la Torre).

85 mixtures available on the market (DP-515, -25, and -35) differ only  
86 in particle size, ranging from 1 to 25, 1 to 10 and 0.5 to 5  $\mu\text{m}$ ,  
87 respectively. FR performance characteristics of DP allow its use in  
88 electrical and electronic applications such as: wires, cables, elec-  
89 tronic circuits, as well as plastic roofing materials (OxyChem,  
90 2010a). In addition, DP has a relatively low density of 1.8 g mL<sup>-1</sup>,  
91 giving it a cost advantage over comparable brominated FRs that  
92 range between 2.2 and 3.5 g mL<sup>-1</sup> (OxyChem, 2010a).

93 Although DP has been used for nearly 50 years, its presence in  
94 the environment was only reported in 2006 (Hoh et al., 2006)  
95 and thus far only limited toxicological data are available. DP exists  
96 as two stereoisomers, *syn*- and *anti*-, both having structural fea-  
97 tures, such as the chlorinated norbornene moiety, similar to a  
98 number of POPs included in the Stockholm Convention like Aldrin,  
99 Chlordane, Dieldrin, Endrin, Heptachlor and Mirex (UNEP, 2010).  
100 Its large molecular size was previously thought to hinder bioavail-  
101 ability, however the bioaccumulation of both stereoisomers has  
102 been demonstrated in fish (Tomy et al., 2008; Shen et al., 2010),  
103 herring gull (Gauthier et al., 2007) and humans (Ren et al., 2009).

104 Until recently, it was thought that DP was only produced in the  
105 Niagara Falls, NY OxyChem manufacturing plant (OxyChem,  
106 2010b), with an estimated annual production ranging between  
107 453 and 4536 tonnes (USEPA, 2010). As a result, initial publications  
108 on the presence of this compound in both biotic (Hoh et al., 2006;  
109 Gauthier et al., 2007; Tomy et al., 2007) and abiotic (Hoh et al.,  
110 2006; Qiu et al., 2007; Tomy et al., 2007; Qiu and Hites, 2008;  
111 Sverko et al., 2008) environments focused on the Great Lakes, a  
112 region close to the manufacturing site. However, DP has been  
113 reported to be also produced in China (Wang et al., 2010) and is  
114 sold worldwide, including in Europe and the Far East (Ren et al.,  
115 2008) with annual use in Western Europe reported to be approxi-  
116 mately 800 tonnes (ECJRC, 2009). To date, reports on the occur-  
117 rence of this compound have been largely associated within the  
118 area of its production sites. Nevertheless, reported levels of DP in  
119 house dust (Zhu et al., 2007) and ambient air in Asia (Ren et al.,  
120 2008; Ma et al., 2009) and Europe (Qiu et al., 2008) suggest the  
121 occurrence of DP is not a local phenomenon related to  
122 manufacturing.

123 The aim of this study is to assess the occurrence of DP in sewage  
124 sludge and compare its concentration to that of the well studied  
125 high production flame retardant PBDEs. Both are commercially ap-  
126 plied to consumer products and therefore present a representative  
127 comparison.

## 128 2. Materials and methods

### 129 2.1. Chemicals

130 DP concentrations were calculated using individual analytical  
131 grade solutions of DP stereoisomers (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , in toluene, purity  
132 99%) acquired from Wellington Laboratories (Guelph, Canada). Indi-  
133 vidual analytical grade solutions of DP stereoisomers (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ,  
134 in nonane, purity 99%) were also acquired from Cambridge Isotopes  
135 Laboratories, LGC Standards (Barcelona, Spain).

136 Two <sup>13</sup>C labeled compound solutions, one containing <sup>13</sup>C<sub>12</sub> BDE-  
137 28, 47, 99, 153, 154, 183, 197, 207, 209, (100–500 ng mL<sup>-1</sup>, in tol-  
138 uene) as recovery standard, and another containing <sup>13</sup>C<sub>12</sub> BDE-138  
139 (200 ng mL<sup>-1</sup>, in toluene) as an internal standard, were obtained  
140 from Wellington Laboratories (Guelph, Canada).

### 141 2.2. Sample collection

142 Sewage sludge samples were collected from 31 differently sized  
143 urban wastewater treatment plants located across Spain from April  
144 to June 2006. Details of WWTPs are shown in Table 1. The total

145 population associated with the 31 plants was approximately 13.1  
146 million, representing 30% of the Spanish population (INE, 2005);  
147 the corresponding sewage sludge production volume of 0.35 mil-  
148 lions tonnes was commensurate with 31% of total Spanish output  
149 in 2005 (WNIPS, 2008). Despite all WWTPs evaluated in this study  
150 treated urban waste waters, plants 14–20 and 24–31, included an  
151 industrial effluent input (Table 1). Samples 1–20 (Table 1) applied  
152 aerobic water treatment, whereas samples 21–31 were subject to  
153 biological nitrogen (N) and phosphorous (P) compound elimination  
154 in three different digesters: anaerobic followed by anoxic and fi-  
155 nally aerobic. Sewage sludge were subjected to chemical treatment  
156 (samples 13 and 31), not stabilized (samples 21, 25 and 28), or  
157 anaerobically stabilized (all others). Samples evaluated in our  
158 study were the product of consecutive water treatment and sew-  
159 age stabilization.

160 Homogenized samples, collected in amber jars, were dried at  
161 40 °C to a constant weight and stored at -18 °C until analysis.  
162 Therefore, all concentrations are reported on a dry weight (d.w.)  
163 basis. Samples were protected from light during extraction,  
164 clean-up and GC-MS analysis.

### 165 2.3. Sample extraction and clean-up

166 Prior to extraction using pressurized fluid extraction (ASE 100,  
167 Dionex, Sunnyvale, CA, USA), 0.5 g dried sewage sludge was spiked  
168 with 5  $\mu\text{L}$  of the recovery standard solution. A mixture of hex-  
169 ane:dichloromethane (1:1 v/v) was used as the solvent at 100 °C,  
170 10.34 MPa, 90% flush volume and three static cycles (10 min time  
171 each). The sample was mixed and homogenized with 2.5 g of anhy-  
172 drous sodium sulphate and 0.5 g finely powdered copper to re-  
173 move elemental sulphur. This mixture was introduced into each  
174 cell previously loaded with one cellulose filter, followed by 2.5 g  
175 of anhydrous sodium sulphate.

176 The resultant extract was solvent exchanged with hexane and  
177 digested with 50 ml of concentrated sulphuric acid. Fractionation  
178 was accomplished using a multilayer silica column (2 g neutral sil-  
179 ica fired 12 h at 140 °C, 2 g silica:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 44% w/w, 1 g anhydrous so-  
180 dium sulphate) pre-washed with 10 mL of hexane. A further 5 mL  
181 of hexane was eluted and discarded prior to the collection of DP  
182 using 90 mL of hexane and subsequent evaporation under nitrogen  
183 to incipient dryness using a TurboVap II evaporator (Vertex Tech-  
184 nics, Madrid, Spain). Samples were reconstituted, adding 5  $\mu\text{L}$  of  
185 the internal standard and 10  $\mu\text{L}$  of nonane prior to GC-MS analysis.

### 186 2.4. Gas chromatography/mass spectrometry analysis

187 Extracts were analyzed for DP and PBDEs. DP method is  
188 described in detail elsewhere (Sverko et al., 2008). Briefly, chro-  
189 matographic separation of DP stereoisomers was carried out using  
190 an Agilent 6890 Gas Chromatograph fitted with a 15 m DB 5 capil-  
191 lary column (0.25 mm i.d.  $\times$  0.10  $\mu\text{m}$  film thickness; J&W Scien-  
192 tific, Folson CA) connected to an Agilent 5973 MSD (Agilent  
193 Technologies España, Madrid, Spain). The gas chromatograph was  
194 equipped with a split-splitless injector held constant at 265 °C.  
195 The initial oven temperature was set at 90 °C with a 1 min hold  
196 time, ramped at 20 °C min<sup>-1</sup> to 300 °C and held for 3 min. DP  
197 determinations were carried out using methane as the moderating  
198 gas. The base peak of the molecular ion cluster for *syn*- and *anti*-DP  
199 isomers ( $m/z$  651.8) was used for quantification and the second  
200 most abundant peak ( $m/z$  653.8) for confirmation. Transfer line,  
201 source and quadrupole temperatures were set at 300, 150 and  
202 150 °C, respectively. Analysis of PBDEs were carried out in the  
203 same instrument but in electron ionization (EI) mode. Completed  
204 details of GC-EI-MS method were previously reported (De la Torre  
205 et al., 2007).

**Table 1**  
Characteristics of WWTPs, water treatment, sewage stabilization, and analyte concentrations obtained in samples analysis.

Sample	WWTP			Water treatment <sup>b</sup>	Sewage stabilization <sup>c</sup>		syn-DP <sup>d</sup> (ng g <sup>-1</sup> d.w.)	anti-DP <sup>d</sup> (ng g <sup>-1</sup> d.w.)	∑ DP (ng g <sup>-1</sup> d.w.)	f <sub>syn</sub> toluene <sup>e</sup>	PBDEs (ng g <sup>-1</sup> d.w.)
	Equivalent population	Sludge production rate (t y <sup>-1</sup> )	Influent <sup>a</sup> (% Ind.)		Time (day)	Temp (°C)					
1	188 610	4149	n.a.	A	20	35	0.903	2.29	3.19	0.28	9.10
2	195 000	3000	n.a.	A	20	36	13.8	43.9	57.7	0.24	408
3	400 000	4500	n.a.	A	26	36	6.90	19.7	26.6	0.26	251
4	280 000	2569	n.a.	A	13	38	16.3	47.8	64.1	0.25	799
5	143 324	3838	n.a.	A	30	35	12.4	33.6	46.0	0.27	613
6	288 000	50 512	n.a.	A	15	35	5.31	14.8	20.1	0.26	170
7	620 000	18 300	n.a.	A	35	37	6.17	16.4	22.6	0.27	300
8	575 000	47 450	n.a.	A	27	37	7.82	18.2	26.0	0.30	122
9	562 500	7686	n.a.	A	14	33	10.3	31.1	41.4	0.25	205
10	950 000	12 867	n.a.	A	22	37	3.27	6.16	9.43	0.35	359
11	1 000 000	17 949	n.a.	A	20	35	2.95	7.95	10.9	0.27	372
12	1 314 831	12 960	n.a.	A	22	35	12.7	43.0	55.6	0.23	820
13	105 851	3910	n.a.	A	Chemical stabilization		4.24	11.7	16.0	0.27	113
14	116 000	3709	15	A	21	36	8.9	26.7	35.7	0.25	362
15	80 000	2510	16	A	28	36	9.68	25.7	35.4	0.27	137
16	622 673	8108	20	A	20	37	11.1	23.9	35.0	0.32	275
17	228 000	4216	20	A	22	35	14.6	59.1	73.7	0.20	841
18	225 000	2500	20	A	35	38	18.7	75.1	93.8	0.20	897
19	320 000	3147	35	A	23	35	5.67	14.7	20.4	0.28	420
20	165 000	2800	40	A	20	35	19.2	61.9	81.2	0.24	995
21	700 000	16 719	n.a.	B	No stabilization		1.96	4.96	6.92	0.28	123
22	570 000	8166	n.a.	B	24	36	2.31	3.40	5.70	0.40	159
23	590 000	32 872	n.a.	B	27	35	12.0	40.1	52.1	0.23	345
24	852 961	24 005	4	B	25	35	1.27	3.16	4.43	0.29	107
25	259 125	17 184	8	B	No stabilization		0.90	1.55	2.45	0.37	186
26	195 323	1560	10	B	19	37	3.69	10.58	14.3	0.26	100
27	466 560	2680	10	B	21	35	4.06	5.57	9.63	0.42	151
28	382 249	12 184	10	B	No stabilization		4.62	13.8	18.4	0.25	179
29	350 000	6600	20	B	21	35	2.77	5.98	8.74	0.32	335
30	650 000	8000	25	B	20	36	14.5	34.39	48.9	0.30	616
31	456 304	8639	51	B	Chemical stabilization		15.3	46.2	61.6	0.25	570
Average							8.20	24.3	32.5	0.28	366
Range							0.903–19.2	1.55–75.1	2.45–93.8	0.20–0.42	9.10–995

<sup>a</sup> n.a. Data not available.

<sup>b</sup> Water treatment processes: (A) Conventional biological (aerobic digester), (B) Biological elimination of N and P (anaerobic + anoxic + aerobic digesters).

<sup>c</sup> Sewage stabilization. All the samples presented anaerobic stabilization except samples 13 and 31 that presented chemical treatment, and samples 21, 25 and 28 that did not have stabilization.

<sup>d</sup> Quantification of syn- and anti-DP isomers were performed with standards in toluene.

<sup>e</sup> f<sub>syn</sub> toluene = [syn-DP]/([anti-DP] + [syn-DP]).

## 2.5. Quality control

Three criteria were used to ensure the correct identification and quantification of analytes: (a) the ratio of quantifier and qualifier ions must be within  $\pm 15\%$  of the theoretical values (b) signal to noise ratio must be greater than 5 and, (c) the retention times of the analyte and its standard must be within  $\pm 1$  s. Instrumental blanks consisted of nonane injections run after every sample and were used to monitor contamination between GC injections. Procedural blanks consist of siliceous earth (Scharlab, Barcelona, Spain) were added at a rate of one for every ten samples in the laboratory. Concentrations of DP in the blanks were not detected, and therefore no sample background correction was required. Method detection limits (MDLs) for DP stereoisomers were estimated by conducting a replicate spike study ( $n = 3$ ) at a low and high DP concentration for both stereoisomers. Replicate blank samples were spiked with DP stereoisomers at 0.05 and 1.00 ng each. The calculated standard deviation was applied for MDL determinations using a one-sided student's  $t$ -test at 95% confidence, which gave rise to 15 and 25  $\text{pg g}^{-1}$  d.w. for *syn*- and *anti*-DP, respectively. The linear dynamic range of the instrument was 1–2000  $\text{pg}$  ( $r^2 > 0.992$ ) for PBDEs and 10–2500  $\text{pg}$  ( $r^2 > 0.995$ ) for DP isomers. The average recovery ranges between  $75 \pm 13\%$  for  $^{13}\text{C}$  BDE-209 and  $87 \pm 26\%$  for  $^{13}\text{C}$  BDE 47. Concentrations of DP have not been recovery corrected.

## 3. Results and discussion

## 3.1. DP concentrations in sewage sludge

Concentrations of *syn*- and *anti*-DP along with PBDE concentrations are summarized in Table 1. Both DP isomers were detected in all samples analyzed. Concentrations of *syn*- and *anti*-DP isomers ranged from 0.903 to 19.2  $\text{ng g}^{-1}$  d.w. and from 1.55 to 75.1  $\text{ng g}^{-1}$  d.w., respectively, compared to PBDE concentrations which ranged between 9.10 and 995  $\text{ng g}^{-1}$  d.w. Concentrations (mean and median) of total DP (32.5, 26.0  $\text{ng g}^{-1}$  d.w.) were lower than those of PBDEs (366, 300  $\text{ng g}^{-1}$  d.w.). This is probably a reflection of the higher historical and/or current usage of PBDEs. However, a similar relation between DP and PBDEs levels have been reported in indoor dust samples from Ottawa, Canada (Zhu et al., 2007) and sediments and fishes from the Great Lakes (Tomy et al., 2007).

There appears to be only one report on DP in sewage sludge (Kolic et al., 2009), for which DP level was presented semi-quantitatively ( $\sim 119$   $\text{ng g}^{-1}$  total DP) from a single WWTP site collected in Toronto, Canada. This concentration was slightly higher than the range obtained in our samples (from 2.45 to 93.8  $\text{ng g}^{-1}$ ;  $n = 31$ ), suggesting that DP concentration in this WWTP is likely related to consumer and/or local industrial inputs rather than the manufacturing plant located nearby in Niagara Falls, NY, the only known manufacturer of DP (Oxychem, 2010b).

## 3.2. Isomeric DP profiles

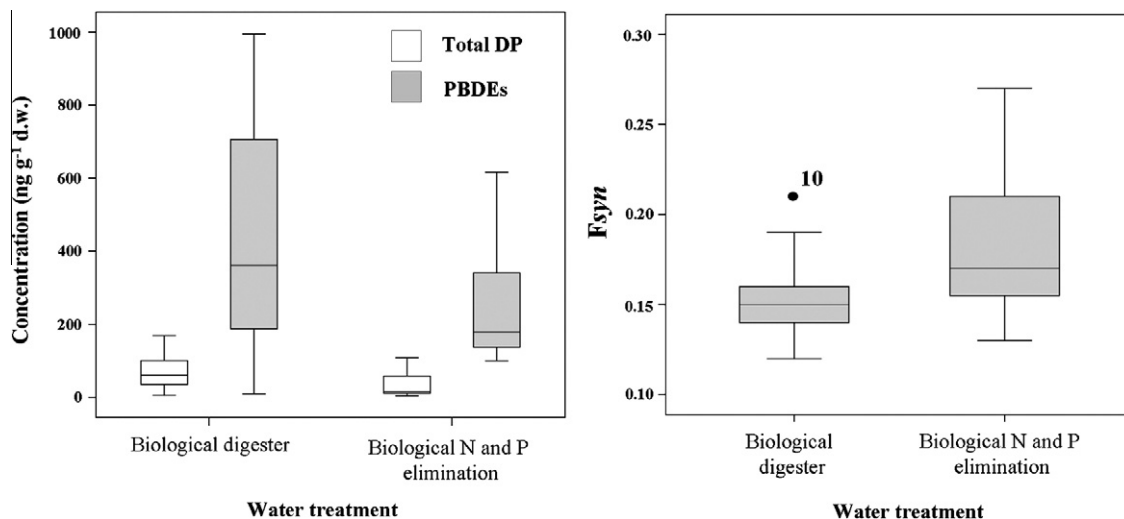
Fractional *syn*-DP ( $f_{\text{syn}}$ ) abundances were calculated as the ratio of *syn* to total DP (Table 1). The average  $f_{\text{syn}}$  in this study ( $0.28 \pm 0.05$ ) was similar to that of the average obtained ( $f_{\text{syn}} = 0.31 \pm 0.05$ ) considering  $f_{\text{syn}}$  reported in several studies (Qiu et al., 2007; Tomy et al., 2007; Sverko et al., 2008; Shen et al., 2010) for DP commercial mixture.

As a corollary to our work, we noticed a twofold difference in response for *anti*-DP at the same concentration provided by two different suppliers (Fig. 1S. in supplementary material); one in nonane the other in toluene. Both stock standards were stored at 4 °C, however the recommended storage condition for the DP stan-

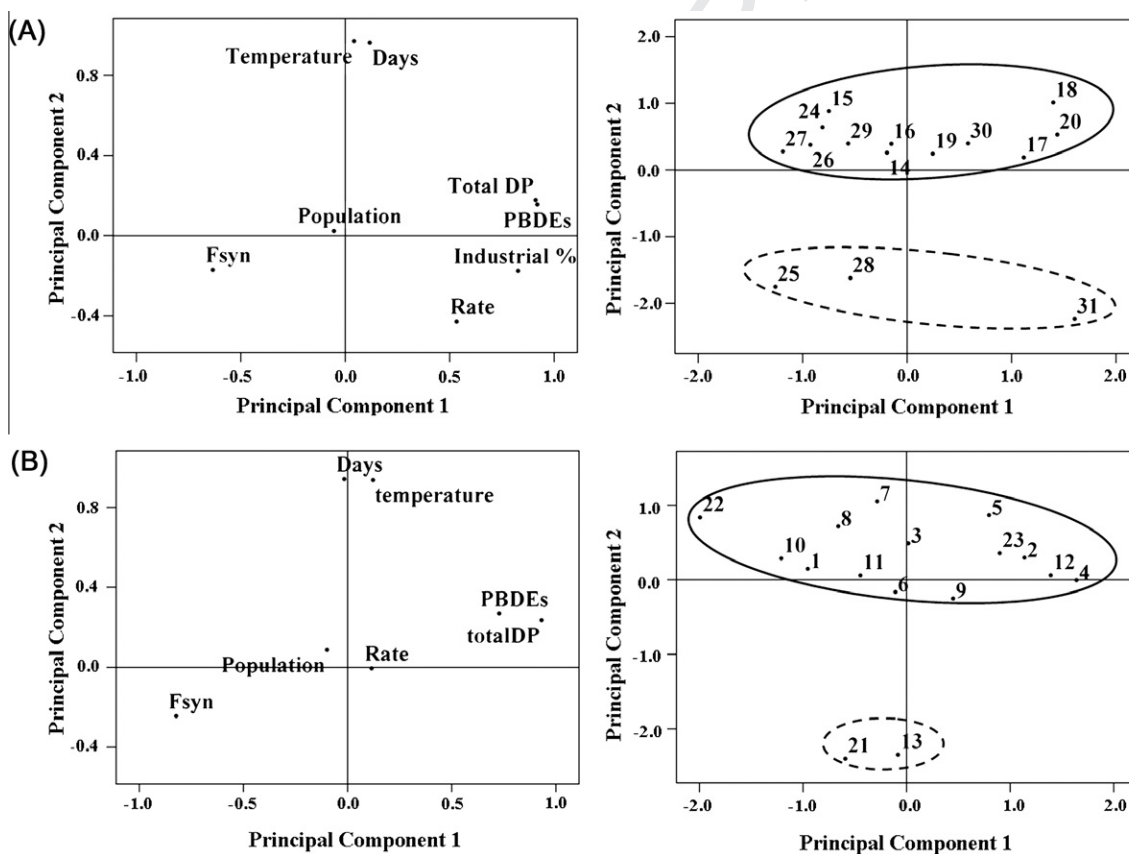
dard in nonane is room temperature. It is suspected that the anti-DP is precipitating out of solution. This has obvious implications in the ability to properly measure  $f_{\text{syn}}$  values and related fate analysis of the DP isomers when storing the nonane solution at 4 °C (Table 1). It is imperative that manufacturer's instructions are followed. In this study, all DP concentrations were quantitated against the standard solution in toluene.

Concentrations of DP and PBDEs related to the different waste water treatment methods were compared using a  $t$ -test and are shown in Fig. 1. A statistically significant ( $p < 0.05$ ) decrease in DP concentrations is observed when the biological elimination of N and P is used to compare to conventional biological water treatment. Comparing  $f_{\text{syn}}$  values obtained in the different water treatment processes presents a significant ( $p < 0.05$ ) *syn*-DP enrichment when the biological elimination of N and P is used (Fig. 1B). Biological nutrient elimination is carried out in three different digesters; anaerobic followed by anoxic, then aerobic. In the aerobic digester, *Nitrosomonas* bacteria oxidise ammonia into nitrite which is then oxidised to nitrate by *Nitrobacter* bacteria. The resultant liquid is then moved to the anoxic digester where nitrate is facultatively transformed to nitrogen. Phosphorous elimination involves Phosphate Accumulating Organisms (PAOs) like *Acanitobacter* bacteria (Majed et al., 2009). These bacteria present a "luxury uptake of phosphorous" when both anaerobic and aerobic digesters are combined. Since PAOs are known to use organic carbon as an energy source (Jiang et al., 2004; Majed et al., 2009), it is plausible that they may degrade PBDEs or DP isomers. In the same manner, enrichment of the *syn*-DP isomer and the resultant increase in  $f_{\text{syn}}$  can be expected since microbial activity included in the N and P elimination could preferentially use the *anti*-stereoisomer. The *anti*-DP stereoisomer may be more susceptible to biological degradation because the four interior carbons of its cyclooctane moiety are less protected by chlorines than those of *syn*-DP (Hoh et al., 2006).

Principal Component Analysis (PCA) was used to investigate patterns in the data obtained. Samples were analyzed in two groups, namely those with (A) a known and (B) an unknown percentage of industrial contribution in their influents. Scores and loading plots are shown in Fig. 2. Similar results were obtained for both groups. Models explain in two principal components, 50.2–16.9% (first–second component; known group) and 37.5–25.2% (first–second component; unknown group) of the variance. The first component included DP and PBDEs concentrations. The second is clearly influenced by the type of sewage process carried out in the WWTP. The loading plot in Fig. 2A (left) shows that total DP and PBDEs concentrations in sewage sludge are closely correlated. In fact the Pearson correlation coefficient ( $p < 0.01$ ) obtained for this relationship in all samples ( $n = 31$ ) was  $r = 0.855$ . In addition, total concentrations of DP and PBDEs are well correlated with known percentage input of industrial origin ( $r = 0.619$ ,  $p < 0.05$  for total DP; and  $r = 0.671$ ,  $p < 0.01$  for PBDEs;  $n = 15$ ). Results indicate (i) DP and PBDEs could be originating from the same sources, (ii) infusion of technical DP and PBDEs mixtures into manufactured items as an important source of these compounds for WWTP influents. The type of industry related to this percentage is also important. Sewage sludge from known industrial discharges and having the highest DP and PBDEs levels (samples 31, 20, 18, and 17) was related to industries potentially involving flame retardant use, such as textiles, surface treatments, galvanic processes and others. Sample 18 presented one of the highest total DP levels with a relatively low percentage of industrial discharge in its effluents (20%), however notably, part of this percentage involved the treatment of printed circuits, which is one of the major uses of DP. According to component 2, samples are separated into two groups, those subject to anaerobic stabilization (positive side of component 2; solid line in Fig. 2) and those undergoing either chemical or no stabilization



**Fig. 1.** Box and whisker diagrams for: (A) Total DP and PBDEs concentrations, and (B)  $f_{syn}$  as related to water treatment process type. Upper edge of the box, line within the box, and lower edge of the box, represent the 75th, 50th, and 25th percentiles. Vertical line extends from the minimum to the maximum value, excluding outlier ( $f_{syn}$  obtained for sample 10) which is displayed as separate point.



**Fig. 2.** Graphs resulting from Principal Components Analysis (PCA) of WWTP which, A) known and B) unknown percentage of industrial contribution in their influents. Loading plots (left) contributions of each variable to each component (component 1, and 2); Scores plots (right) of all samples on each component (component 1, and 2). Samples are labeled according to sample number. Large circles group together samples subjected to anaerobic stabilization (solid line) and those undergoing either chemical and/or no stabilization (broken line).

331 (negative side of component 2; broken line in Fig. 2). But no groups  
332 were observed in component 1, indicating that sewage process  
333 does not influence total concentrations of DP or PBDEs. This result  
334 does not follow for the water processes, where as mentioned  
335 previously, concentrations decreased when biological N and P

elimination were used. WWTP sewage sludge production rate (tonnes per year) is also influenced by the type of sewage process carried out in the WWTP (component 2), as shown in Fig. 2. This can be explained by the fact that anaerobic sewage sludge stabilization contributed to the decrease in the amount of sewage produced

336  
337  
338  
339  
340

compared to no stabilization and chemical stabilization. In fact, reagent chemicals added during the latter force precipitation and therefore enhance production rate.

#### 4. Conclusions

Both water and sewage treatment methods have been evaluated and results indicate that using the biological N and P elimination treatment method can contribute to the decrease of DP and PBDEs concentrations in sludge. PBDEs and DP concentrations correlate to the contribution of industrial input to waste stream. This implies release of these compounds is related to industrial activity, likely stemming from the use of the technical product during manufacture of consumer goods. However, use and disposal of products containing DP and PBDEs could no be dismissed. Considering the concentrations of DP and PBDEs obtained in combination with the fact that 65% of total sewage sludge production in 2005 was used as fertilizer in Spain (WNIPS, 2008), it is plausible that DP in sewage sludge contributes to increased flame retardant content of soils and entry into terrestrial and aquatic food webs, as is the case for PBDEs.

#### Acknowledgements

We thank the editorial efforts by Lindsay A.P. Smith. This work has been supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation through the Environment Department of Research Center for Energy, Environment and Technology (CIEMAT) and by the Center of Civil Engineering Research (CEDEX), Madrid Institute for Rural, Food and Agricultural Research and Development (IMIDRA), through the 44-403-1-096 Project (Research on sludge from wastewater treatment. Directive 86/278/CEE) signed with the Ministry of Environment.

#### Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.chemosphere.2010.10.097.

#### References

- De la Torre, A., Martínez, M.A., Sanz, P., Concejero, M.A., 2007. NCI-MS vs EI-MS for PBDEs analysis in Spanish sewage sludges. In: Fourth International Workshop on Brominated Flame Retardants BFR. <<http://bfr2010.com/abstract-download/2007/P003.pdf>> (accessed 14.06.10).
- European Commission Joint Research Centre (ECJRC), 2009. European Union Risk Assessment Report Hexachlorocyclopentadiene (HCCP). <[http://ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/Existing-Chemicals/RISK\\_ASSESSMENT/DRAFT/R401\\_0512\\_env.pdf](http://ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/Existing-Chemicals/RISK_ASSESSMENT/DRAFT/R401_0512_env.pdf)> (accessed 14.06.10).
- Eljarrat, E., Marsh, G., Labandeira, A., Barcelo, D., 2008. Effect of sewage sludges contaminated with polybrominated diphenylethers on agricultural soils. *Chemosphere* 71, 1079–1086.
- Gauthier, L.T., Hebert, C.E., Weseloh, D.V., Letcher, R.J., 2007. Current-use flame retardants in the eggs of herring gulls (*Larus argentatus*) from the Laurentian Great Lakes. *Environ. Sci. Technol.* 41, 4561–4567.
- Hoh, E., Zhu, L., Hites, R.A., 2006. Dechlorane plus, a chlorinated flame retardant, in the Great Lakes. *Environ. Sci. Technol.* 40, 1184–1189.
- Instituto Nacional de Estadística (INE), 2005. Population Figures of Spain Referring to 1/01/2005. Royal Decree 1358/2005, of 18 November. <<http://www.ine.es/>> (accessed 14.06.10).
- Jiang, F., Beck, M.B., Cummings, R.G., Rowless, K., Russel, D., 2004. Estimation of costs of phosphorus removal in wastewater treatment facilities: construction de novo. Water Policy Working Paper #2004-010. <[http://www.h2opolicycenter.org/pdf\\_documents/water\\_workingpapers/2004-010.pdf](http://www.h2opolicycenter.org/pdf_documents/water_workingpapers/2004-010.pdf)> (accessed 14.06.10).
- Kolic, T.M., Shen, L., Macpherson, K., Favez, L., Gobran, T., Helm, P.A., Marvin, C.H., Arsenault, G., Reiner, E.J., 2009. The analysis of halogenated flame retardants by GC–HRMS in environmental samples. *J. Chromatogr. Sci.* 47, 83–91.
- Ma, W., Li, Y., Qi, H., Sun, D., Liu, L., 2009. Particle-bound Dechlorane Plus in the atmosphere of Harbin, China. *Organohalogen Compounds* 71, 196–199.
- Majed, N., Matthaus, C., Diem, M., Gu, A.Z., 2009. Evaluation of intracellular polyphosphate dynamics in enhanced biological phosphorus removal process using Raman microscopy. *Environ. Sci. Technol.* 43, 5436–5442.
- Martínez, M.A., De la Torre, A., Concejero, M.A., Sanz, P., 2006. Occurrence of brominated flame retardants in sewage sludge from Spain: higher brominated diphenyls ethers contribution. *Organohalogen Compounds* 68, 1804–1807.
- Moon, H.B., Yoon, S.P., Jung, R.H., Choi, M., 2008. Wastewater treatment plants (WWTPs) as a source of sediment contamination by toxic organic pollutants and fecal sterols in a semi-enclosed bay in Korea. *Chemosphere* 73, 880–889.
- North, K., 2008. Tracking polybrominated diphenyl ethers releases in wastewater treatment plant effluent, Palo Alto, California. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4484–4488.
- OxyChem, 2010a. Dechlorane Plus Manual. <[http://www.oxy.com/Our\\_Businesses/chemicals/Documents/dechlorane\\_plus/dechlorane\\_plus.pdf](http://www.oxy.com/Our_Businesses/chemicals/Documents/dechlorane_plus/dechlorane_plus.pdf)> (accessed 14.06.10).
- OxyChem, 2010b. OxyChem Manufacturing Sites. <[http://www.oxy.com/Our\\_Businesses/chemicals/Pages/chem\\_manufacturing.aspx](http://www.oxy.com/Our_Businesses/chemicals/Pages/chem_manufacturing.aspx)> (accessed 14.06.10).
- Qiu, X., Hites, R.A., 2008. Dechlorane plus and other flame retardants in tree bark from the northeastern United States. *Environ. Sci. Technol.* 42, 31–36.
- Qiu, X., Marvin, C.H., Hites, R.A., 2007. Dechlorane plus and other flame retardants in a sediment core from Lake Ontario. *Environ. Sci. Technol.* 41, 6014–6019.
- Qiu, X., Venier, M., Hites, R.A., 2008. Dechlorane plus: a review with new data. *Organohalogen Compd.* 70, 216–219.
- Ren, N., Sverko, E., Li, Y.F., Zhang, Z., Harner, T., Wang, D., Wan, X., McCarry, B.E., 2008. Levels and isomer profiles of Dechlorane Plus in Chinese air. *Environ. Sci. Technol.* 42, 6476–6480.
- Ren, G., Yu, Z., Ma, S., Li, H., Peng, P., Sheng, G., Fu, J., 2009. Determination of dechlorane plus in serum from electronic dismantling workers in south China. *Environ. Sci. Technol.* 43, 9453–9457.
- Shen, L., Reiner, E.J., Macpherson, K.A., Kolic, T.M., Sverko, E., Helm, P.A., Bhavsar, S.P., Brindle, I.D., Marvin, C.H., 2010. Identification and screening analysis of halogenated norbornene flame retardants in the Laurentian Great Lakes: Dechloranes 602, 603, and 604. *Environ. Sci. Technol.* 44, 760–766.
- Sverko, E., Tomy, G.T., Marvin, C.H., Zaruk, D., Reiner, E.J., Helm, P.A., Hill, B., McCarry, B.E., 2008. Dechlorane plus levels in sediment of the lower Great Lakes. *Environ. Sci. Technol.* 42, 361–366.
- Tomy, G.T., Pleskach, K., Ismail, N., Whittle, D.M., Helm, P.A., Sverko, E., Zaruk, D., Marvin, C.H., 2007. Isomers of Dechlorane Plus in Lake Winnipeg and Lake Ontario food webs. *Environ. Sci. Technol.* 41, 2249–2254.
- Tomy, G.T., Thomas, C.R., Zidane, T.M., Murison, K.E., Pleskach, K., Hare, J., Arsenault, G., Marvin, C.H., Sverko, E., 2008. Examination of isomer specific bioaccumulation parameters and potential in vivo hepatic metabolites of syn and anti-Dechlorane Plus isomers in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Sci. Technol.* 42, 5562–5567.
- United Nations Environmental Programme (UNEP), 2010. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. <<http://chm.pops.int/>> (accessed 14.06.10).
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2004. Robust Summaries and Test Plans: Dechlorane Plus CAS NO. 13560-89-9. <<http://www.epa.gov/hpv/pubs/summaries/dechlorp/c15635tp.pdf>> (accessed 14.06.10).
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2010. Toxic Substances Control Act (TSCA). <<http://www.epa.gov/oppt/iur/tools/data/2002-vol.html>> (accessed 14.06.10).
- Wang, D.G., Yang, M., Qi, H., Sverko, E., Ma, W.L., Li, Y.F., Alaea, M., Reiner, E.J., Shen, L., 2010. An Asia-specific source of Dechlorane Plus: Concentrations, isomers profiles, and other related compounds. *Environ. Sci. Technol.* 44, 6608–6613.
- World Health Organization (WHO), 1997. Flame Retardants: A General Introduction Environmental Health Criteria (EHC) 192. World Health Organization, Geneva.
- Waste National Integrated Plan of Spain (WNIPS, 2008). <[http://www.mma.es/secciones/calidad\\_contaminacion/pdf/PNIR\\_22\\_12\\_2008\\_\(con\\_tablas\\_y\\_planes\).pdf](http://www.mma.es/secciones/calidad_contaminacion/pdf/PNIR_22_12_2008_(con_tablas_y_planes).pdf)> (accessed 14.06.10).
- Zhu, J., Feng, Y.L., Shoenib, M., 2007. Detection of Dechlorane plus in residential indoor dust in the city of Ottawa, Canada. *Environ. Sci. Technol.* 41, 7694–7698.

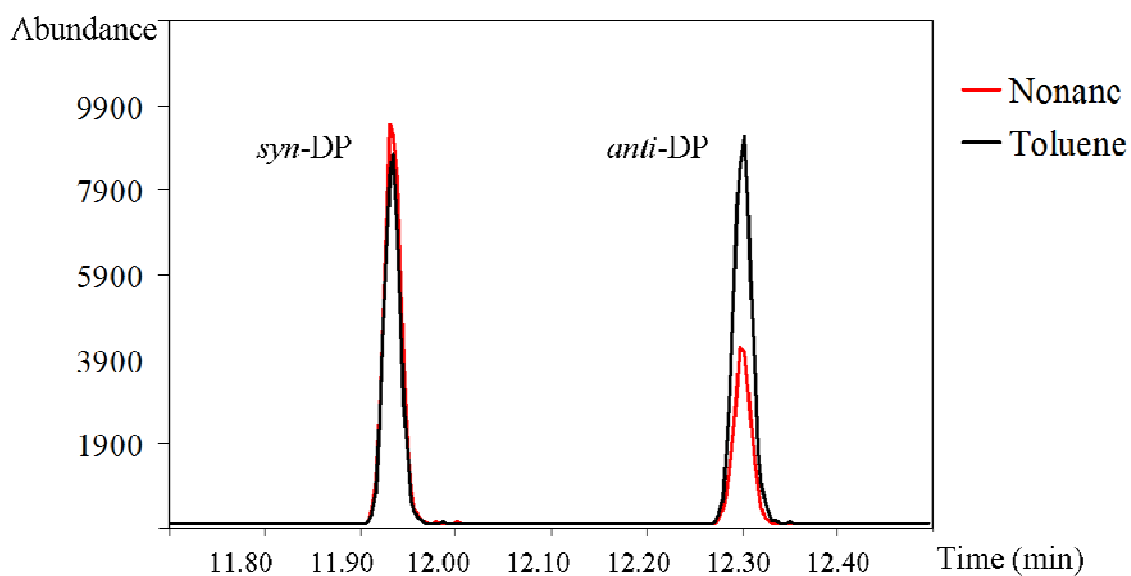


## SUPPLEMENTARY MATERIAL

CONCENTRATIONS AND SOURCES OF DECHLORANE PLUS IN SEWAGE  
SLUDGE

Adrián de la Torre,<sup>1,\*</sup> Ed Sverko,<sup>2</sup> Mehran Alaei,<sup>2</sup> and María Ángeles Martínez.<sup>1</sup>

- 1) Persistent Organic Pollutants Group, Environment Department. CIEMAT, Avd. Complutense 22 Madrid 28040, Spain.
- 2) Water Science and Technology Directorate , Environment Canada, 867 Lakeshore Road, Burlington, ON, L7R 4A6, Canada.



**Figure S1.** Chromatograms obtained with standards in nonane and toluene. Syn- and anti-DP concentrations for both standards are 250 pg/ $\mu$ l.



#### 4.4.- Nuevos retardantes de llama, norborneno halogenados, en lodos de depuradora españolas

*De la Torre, A., Shen, L., Reiner, E., Alae, M., Martínez, M.A., (2010). New halogenated norbornene flame retardants in sewage sludge from Spain. Organohalogen Compounds, 72.*

##### Resumen

Siguiendo con la línea experimental de los trabajos anteriores (puntos 4.2 y 4.3), en este estudio se evaluó la presencia de Mirex, Decloranes 602, 603, 604, 1,5-monoaducto de declorane (1,5-DPMA) y Clordano plus (CP) en lodos de EDAR previamente analizados para PBDE, DBDPE y DP. Los Decloranes 602, 603 y 604 son, al igual que el DP o Declorane 605, retardantes de llama clorados que se empezaron a utilizar con carácter aditivo como sustitutos del Mirex (WHO, 1984). El CP es otro retardante de llama clorado patentado por OxyChem (antigua Hookers Chemicals Corp.) (Hindersinn y Marciniak, 1968; Ilardo y Scharf, 1983) y el 1,5-DPMA es una impureza recientemente relacionada con el DP (Sverko et al., 2010).

La primera aproximación al análisis de estos compuestos se realizó sobre los extractos previamente preparados para la determinación de DP (punto 4.2). Sin embargo, el proceso de purificación de éstos resultó insuficiente para el análisis por HRMS. Por este motivo se repitió la extracción (mediante fluidos presurizados; ASE 100, Dionex, Sunnyvale, CA, USA) de las muestras y se realizaron dos etapas de purificación. La primera etapa consistió en una digestión con ácido sulfúrico concentrado y la segunda (cromatografía de adsorción en columnas a presión) se realizó en un equipo de purificación automatizada Power Prep™ System (FMS® Inc, USA). El método utilizado fue, en este caso, el mismo que se optimizó para el análisis de PBDE (punto 4.1), obteniéndose dos fracciones. Los Decloranes eluyeron en la fracción B, con los PBDE. Esta fracción se analizó instrumentalmente en un HRGC-HRMS (Agilent 6890GC - Micromass Autospec Ultima) operando en ionización electrónica positiva a una resolución mayor de 10000 (10 % valle). Actualmente no existen patrones marcados isotópicamente para ninguno de los analitos evaluados en este trabajo (Dec 602, 603, 604, 1,5-DPMA y CP), por este motivo y dado que los Decloranes eluyeron en la misma fracción que los PBDE, se utilizaron soluciones de congéneres <sup>13</sup>C<sub>12</sub> PBDE como patrones de extracción e inyección para la cuantificación y cálculo de las recuperaciones analíticas del método.

Se encontraron niveles de Declorane 603 (2.0 – 97.4 pg/g m.s.; min - max), 602 (1.0 – 12.5 pg/g m.s.; min - max), Mirex (n.d. – 19.2 pg/g m.s.; min - max) y CP (n.d. - 5.4 pg/g m.s.; min - max). Por el contrario no se detectaron 1,5-DPMA ni Declorane 604 en ninguna de las muestras evaluadas. Estos niveles son muy inferiores a los obtenidos para PBDE (punto 4.1), DBDPE (punto 4.2) y DP (punto 4.3) en las mismas muestras, lo que significa que la utilización de los Decloranes 602, 603 y CP es menor comparada con las mezclas DecaBDE, DBDPE y DP en España.



## NEW HALOGENATED NORBORNENE FLAME RETARDANTS IN SEWAGE SLUDGE FROM SPAIN

*De la Torre, A.<sup>1</sup>, Shen, L.<sup>2,3</sup>, Reiner, E.J.<sup>3</sup>, Alae, M.<sup>4</sup>, Martínez, M.A.<sup>1</sup>*

- 1) Persistent Organic Pollutant Group, Environment Department. CIEMAT, Avd. Complutense 22 Madrid, Spain.
- 2) Department of Chemistry, Brock University, 500 Glenridge Avenue, St. Catharines, Ontario, Canada L2S 3A1.
- 3) Ontario Ministry of the Environment, 125 Resources Road, Toronto, Ontario, Canada M9P 3V6.
- 4) Aquatic Ecosystem Protection Research Division, Environment Canada, 867 Lakeshore Road, Burlington, ON, L7R 4A6, Canada.

### Introduction

Sewage sludge has been routinely evaluated for persistent organics pollutants, including PCDD/Fs, PCBs and more recently PBDEs. This concern is especially important in countries like Spain where sludge is used as a fertilizer, which led to the agricultural application of around 0.7 million tonnes in 2005 <sup>1</sup>. This matrix contains pollutants that, once concentrated in the sludge, could be introduced into the food chain through agricultural application. We have previously studied the presence of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs)<sup>2</sup>, decabromodiphenyl ethane (DBDPE)<sup>3</sup>, and Dechlorane Plus (DP)<sup>4</sup> in sewage sludge. Here we reported the presence of some new halogenated norbornene flame retardants.

Dechloranes 602 (Dec 602; C<sub>14</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>12</sub>O), 603 (Dec 603; C<sub>17</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>12</sub>) and 604 (Dec 604; C<sub>13</sub>H<sub>4</sub> Br<sub>4</sub>Cl<sub>6</sub>) are halogenated flame retardants introduced as replacements for Mirex (Dechlorane; C<sub>10</sub>Cl<sub>12</sub>)<sup>5</sup>, which use was banned in 1978 <sup>6</sup>. These compounds have been recently identified in the Laurentian Great Lakes <sup>7,8</sup> and although were designed and synthesized to minimize bioavailability of the chlorinated norbornene, their bioaccumulation have been demonstrated <sup>7,9</sup>.

### Material and Methods

#### Chemicals

Dec 602 (95%, CAS# 31107-44-5), Dec 603 (98%, CAS# 13560-92-4), and Dec 604 (98%, CAS# 34571-16-9) were purchased from Toronto Research Chemical Inc. (Toronto, ON, Canada). 1,5-Dechlorane plus mono adduct (1,5-DPMA, CAS# 13821-04-4), anti dechlorinated DPs (aCl<sub>11</sub>DP, and aCl<sub>10</sub>DP) and Chlorodene plus (CP, CAS# 13560-91-3) were purchased from Wellington Laboratories Inc. (Guelph, ON, Canada). Mirex (CAS# 2385-85-5) was obtained from Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Andover, MA).

## Sampling

Sewage sludge samples were collected from 31 urban wastewater treatment plants (WWTPs) of different sizes and geographical distributed all over Spain, between April and June, 2006. Samples were collected in amber-glass flasks to protect them from light, humidity and other external factors which might change their chemical composition. In the laboratory, upon receiving, samples were dried at 40°C until they reached a constant weight before grinding into a fine powder. Samples were stored in the laboratory at -18°C until analysis.

## Extraction, cleanup, and instrumental analysis

The initial approach for the analysis of Dec 602, Dec 603, Dec 604, DPMA, CP, Mirex and DP was performed using extracts previously prepared for DP determination<sup>4</sup>. However, the cleaning process designed for GC-LRMS turned out to be insufficient for GC-HRMS analysis. For this reason new extracts were prepared for this study.

Prior to extraction with Accelerated Solvent Extraction system (ASE 100, Dionex, Sunnyvale, CA, USA), 0.5 g of dried sewage sludge was spiked with a recovery standard solution containing 11 <sup>13</sup>C<sub>12</sub> BDEs, including <sup>13</sup>C<sub>12</sub> BDE 47 and <sup>13</sup>C<sub>12</sub> BDE 153. A mixture of hexane: dichloromethane (1:1 v/v) was used as solvent, at 100°C, 1500 psi, 90% volume and three static cycles. The extract obtained was reduced using a TurboVap II Zymark evaporator under a flow of nitrogen and solvent exchanged into hexane prior to be subjected to further clean up.

A purification step was performed using an automated purification Power Prep<sup>tm</sup> System (FMS, Inc, USA) including multilayer silica, alumina and carbon columns. Two fractions were obtained: Fraction A, containing PCDD/Fs and non-ortho PCBs; Fraction B, containing mono-ortho PCB, iPCB, PBDEs and organochlorine pesticides. Both fractions were evaluated for Dechlorane related compounds, and once confirmed that they elute in Fraction B, only these were analysed by high resolution mass spectrometry (MicroMass Autospec Ultima HRMS).

The HRMS was operated in electron ionization mode at a resolution greater than 10,000 (10% valley). Chromatographic separation was carried out on an Agilent 6890 GC fitted with a 15 m DB-5-MS capillary column (0.25 mm i.d. x 0.10 µm film thickness; J&W Scientific). Splitless injections of 1 µL were made onto an injector set isothermally at 280 °C. The initial oven temperature was set at 120 °C with a 1 min hold time, ramped at 20 °C/min to 240 °C, ramped at 5 °C/min to 275 °C, ramped at 40 °C/min to 320 °C, and hold 4 min. Transfer line and source temperatures were 280 °C and 280 °C, respectively. Ions monitored were: 263.8648/265.8618 for DPMA; 271.8102/273.8072 for Mirex, Dec 602 and CP; 262.8570/264.8540 for Dec 603; 417.7026/419.7006 for Dec 604; 201.8911/203.8881 for Dec aCl<sub>10</sub>DP, and 237.8491/239.8462 for aCl<sub>11</sub>DP. Since Dechloranes eluted in the PBDEs fraction <sup>13</sup>C<sub>12</sub> BDE labeled (BDE 47 and 153 as recovery, and BDE-138) standards were used to quantify target analytes.

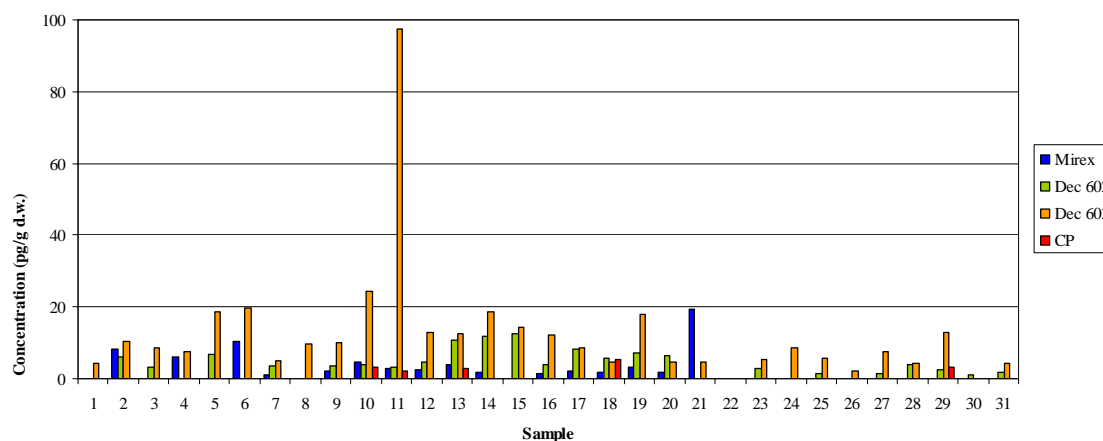
### Quality Assurance/Quality Control.

Criteria for quantification were: retention time and isotope ratio found within 1 s and 15 % of the standard, and a signal to noise ratio greater than 5. Injections of nonane, as instrumental blanks, were used to assess instrument contamination. Three procedural blanks consist as siliceous earth were also processed. No significant levels of DPMA, Mirex, CP, Dec 602, 603 and 604 were found both in procedural and instrumental blanks. Method recoveries for  $^{13}\text{C}_{12}$  BDE-47 and 153 were  $74 \pm 17$  % and  $81 \pm 20$  % (mean  $\pm$  one standard deviation), respectively.

### Results and Discussion

Concentrations of Mirex, Dec 602, 603, and CP (pg/g d. w.) are reported in Figure 1. Similar pattern was obtained in all samples being Dec 603 the major dechlorane related compound followed by Mirex and Dec 602. 1,5-DPMA, an impurity recently related to DP<sup>10</sup> and Dec 604 were not found in any of the samples analyzed. In the same manner, CP was only detected in 5 samples.

There is no evidence of Mirex usage in Spain. Mirex concentrations found in our study, ranged from non detected (n.d.) to 19.2 pg/g d.w (n=31) should be related to long range transport. Concentrations of Mirex in these samples were lower than those reported in sludge from Korea<sup>11</sup>, from n.d. to 150 pg/g d.w. (n=6).

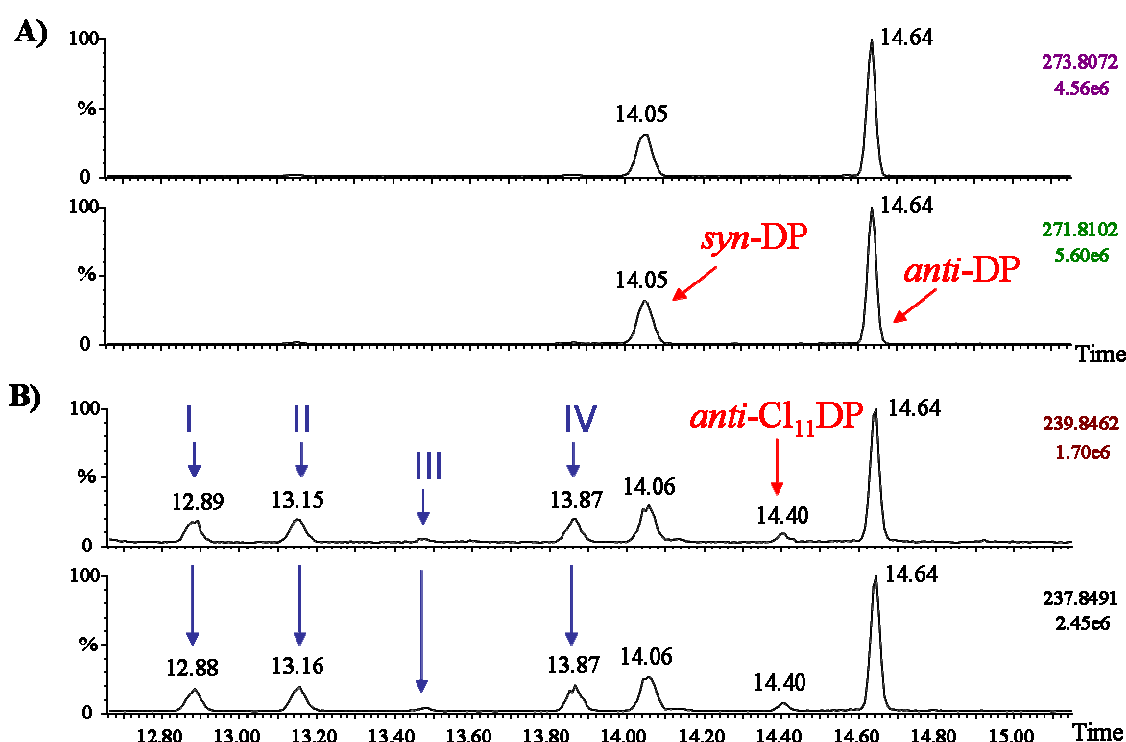


**Figure 1.** Concentrations of Mirex, Dec 602, 603, and CP in (pg/g d.w.).

The levels of Dec 603 observed were higher than Dec 602 while Dec 604 was not detected in any samples. This distribution could be attributed to their production, import or consumption, unfortunately there is no data regarding Dec 603, 602 or 604. Other factors affecting these ratios include physical chemical properties such as Log  $K_{ow}$ . Estimated Log  $K_{ow}$  for Dec 602, 603 and 604 are, 8.05, 11.20, and 11.56<sup>12,13</sup>; indicating that Dec 603 to be

more hydrophobic than Dec 602; resulting in higher concentrations in the sludge. In contrast Dec 604 was not detected in our samples. Dec 604 is a chlorinated/brominated flame retardant while Dec 602 and 603 are only chlorinated, and that would be a reason for different applications or easier degradation which were not detected in our sewage sludge samples.

In some of our samples up to four unidentified peaks were detected. These peaks appeared in the *anti*-Cl<sub>11</sub>DP segment ( $m/z$  239.8462/237.8491), shown in Figure 2, and all matched the ion ratios of the pentachlorocyclopentadiene (PCCPD; C<sub>5</sub>HCl<sub>5</sub>) fragment. Considering that the relative retention time (RRT) of peaks IV and *anti*-Cl<sub>11</sub>DP (RT of peak IV divided by RT of peak *anti*-Cl<sub>11</sub>DP = 0.96 min) is the same as the one obtained for *syn* and *anti*-DP peaks (0.96 min), peak IV could be predicted to be *syn*-Cl<sub>11</sub>DP. Nevertheless three peaks remained unidentified in our samples.



**Figure 2.** Chromatograms obtained by HRMS of sample 14: A)  $m/z$  273.8072/271.8102 of C<sub>5</sub>Cl<sub>6</sub>, and B)  $m/z$  239.8762/237.8491 of C<sub>5</sub>HCl<sub>5</sub>.

Sverko et al.<sup>10</sup> recently reported the presence of some substances structurally related to DP in sediment cores from the Niagara River. Two of these compounds eluted just before *syn*-DP and were identified as 1,4-Cyclooctadiene (1,4.-COD) and 4-Vinylcyclohexene (VCH). Further investigation to elucidate these unknown peaks will be conducted.

In summary, this study reported the occurrence of Dechloranes related compounds in sewage sludge from Spain. To the best of our knowledge this is the first time Dec 602, 603, and CP have been detected in sewage sludge. Presence of these compounds has great relevance, since it has been reported to be more bioaccumulated than DP<sup>9</sup>. Occurrence of these non-



brominated flame retardants in environmental matrices demonstrates that these compounds could leach out of consumer products, during production, use or disposal, in a similar manner as brominated flame retardants.. After leaching they concentrate in the sewage sludge, so they should be included in risk assessment and their effect should be evaluated before agricultural application of sewage sludge.

## References

1. Waste National Integrated Plan, Spain 2008-2015; [http://www.mma.es/secciones/calidad\\_contaminacion/pdf/PNIR\\_22\\_12\\_2008\\_\(con\\_tablas\\_y\\_planes\).pdf](http://www.mma.es/secciones/calidad_contaminacion/pdf/PNIR_22_12_2008_(con_tablas_y_planes).pdf) (Accessed June 2010).
2. Martinez MA, De la Torre A, Concejero MA, Sanz P, Martínez MA. (2006) *Organohalogen Comp*; 68:1804-1807
3. de la Torre A, Concejero MA, Martínez MA, Sanz P. (2007) *Organohalogen Comp*; 69: 2702-2705
4. de la Torre A, Sverko Ed, Alae M, Martínez MA; (2009): *Organohalogen Compds*: 71, 2098-2102
5. WHO, (1984). Mirex, ICPS, Environmental Health Criteria, 44.
6. Persistent Bioaccumulative and Toxic (PBTs) Chemical Program. <http://www.epa.gov/pbt/pubs/mirex.htm> (Accessed June 2010).
7. Shen L, Reiner EJ, Macpherson KA, Kolic TM, Sverko E, Helm PA, Bhavsar SP, Brindle ID, Marvin CH. (2010); *Environ. Sci. Technol.* : 44: 760-766.
8. Shen L, Reiner EJ, Karen AMP, Kolic TM, Burniston DA, Helm PA, Richman LA, Hill B, Brindle ID, Marvin CH. (2010). Presented at the BFR 2010.
9. Zitko V. (1980); *Chemosphere*: 9: 73-78.
10. Sverko E, Reiner EJ, Tommy GT, McCrindle R, Shen L, Arsenault G, Zaruk D, Macpherson KA, Marvin CH, Helm PA, McCarriry BE, (2010); *Environ. Sci. Technol.* : 44: 574-579.
11. Ju JH, Lee IS, Sim WJ, Eun H, Oh JE; (2009): *Chemosphere*: 74, 441-447.
12. VCCLAB, Virtual Computational Chemistry Laboratory, <http://www.vclab.org> (Accessed June 2010)
13. Tecko IV, Gasteiger J, Todeschini R, Mauri A, Livingstone D, Ertl P, Palyulin VA, Radchenko EV, Zefirov NS, Makarenko AS, Tanchuk, VY, Prokopenko, VV; (2005): *J. Comput, Aid. Mol. Des.*: 19, 543-463.



#### 4.5.- Polibromodifenil éteres y sus análogos metoxilados e hidróxilados en plasma de pez gato (*Ameiurus nebulosus*) del lago Ontario

*De la Torre, A., Pacepavicius, G., Martínez, M.A., Darling, C., Muir, D., Sherry, J., McMaster, M., Alae, M., (2010). Polybrominated diphenyl ethers and their methoxylated and hydroxylated in Brown Bullhead (Ameiurus Nebulosus) plasma from lake Ontario. Submitted.*

##### Resumen

En este trabajo se evaluó la presencia y origen de polibromodifenil éteres (PBDE), polibromodifenil éteres metoxilados (MeO-PBDE) y polibromodifenil éteres hidroxilados (OH-PBDE) en plasma de pez gato (*Ameiurus nebulosus*) del lago Ontario. Se capturaron un total de 117 ejemplares en tres puntos cercanos a la ciudad de Toronto: Toronto Island y Tommy Thompson Park, situados en el puerto de Toronto y Frenchman's Bay, situado a 40 Km al norte de la ciudad. Debido a la pequeña cantidad de plasma obtenida para cada ejemplar, las muestras de los 117 peces se combinaron para formar 19 muestras de alrededor de 2.5 g.

Las muestras se extrajeron mediante extracción líquido-líquido con una mezcla de hexano : metil terbutil éter (1:1 v/v). El extracto obtenido se hizo pasar por una columna de Florisil<sup>®</sup>, obteniéndose dos fracciones: Fracción A, conteniendo PBDE y MeO-PBDE y Fracción B, conteniendo OH-PBDE. La fracción B se derivatizó con diazometano y seguidamente ambas fracciones se purificaron mediante columnas de sílice ácida y neutra. El análisis instrumental se realizó en un HRGC-HRMS (Agilent 6890GC- MicroMass Autospec Ultima) operando en ionización electrónica positiva a una resolución mayor de 10000 (10% valle). La cuantificación se realizó mediante patrón interno (PBDE) y dilución isotópica (MeO-PBDE y HO-PBDE metilados) utilizando <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-6'-MeO-BDE-100 y <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-6'-OH-BDE-100 como patrones de extracción y <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-6-MeO-BDE-47 como patrón de inyección.

Se detectaron niveles de PBDE (3.3 – 9.0 ng/g m.h.; min-max), MeO-PBDE (n.d. – 0.1 ng/g m.h.; min-max) y OH-PBDE (n.d. – 3.6 ng/g m.h.; min-max) en la mayoría de las muestras. Con los datos obtenidos se estimaron, analizaron y discutieron las posibles fuentes de MeO-PBDE y OH-PBDE en estas muestras. Los resultados obtenidos indican que la presencia de estos compuestos en plasma de pez gato se debe principalmente a la formación de los mismos en procesos antropogénicos y su posterior bioacumulación en los peces.



**POLYBROMINATED DIPHENYL ETHERS AND THEIR METHOXYLATED  
AND HYDROXYLATED ANALOGS IN BROWN BULLHEAD (*AMEIURUS  
NEBULOSUS*) PLASMA FROM LAKE ONTARIO**

De la Torre, A.<sup>1</sup>, Pacepavicius, G.<sup>2</sup>, Martínez, M.A.<sup>1</sup>, Darling, C.<sup>2</sup>, Muir, D.<sup>2</sup>, Sherry, J.<sup>2</sup>,  
McMaster, M.<sup>2</sup>, Alae, M.<sup>2</sup>

- 1) Persistent Organic Pollutant Group, Environment Department. CIEMAT, Avd. Complutense 22 Madrid, Spain.
- 2) Aquatic Ecosystem Protection Research Division, Water Science and Technology Directorate, Environment Canada, 867 Lakeshore Road, Burlington, ON, L7R 4A6, Canada.

**Keywords:** PBDEs, MeO-PBDEs, OH-PBDEs, Brown Bullhead (*Ameiurus nebulosus*)

### **Abstract**

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), methoxylated PBDEs (MeO-PBDEs) and hydroxylated PBDEs (OH-PBDEs) were detected and quantified in brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*) from Lake Ontario. Samples were collected in 2006 from three different locations near the city of Toronto: Frenchman's Bay, Toronto Island, and Tommy Thompson Park. A total of 117 plasma samples were pooled into 19 samples, separating males and females by site of capture. Pooled samples were analyzed for 36 PBDEs, 20 MeO-PBDEs and 20 OH-PBDEs, but only six PBDEs, five MeO- and eight OH- compounds were confirmed against standards currently available. These peaks were quantified as "identified" peaks, while peaks matching ion ratios but not matching the retention time of the available standards were quantified as "unidentified" peaks. Both "identified" and "unidentified" concentrations were combined to obtain a total concentration. No significant variations were obtained for total PBDEs concentrations, ranging from 3.33 to 9.02 ng/g wet weight. However, OH- and MeO-PBDE totals ranged over 1 order of magnitude among the samples (not detected - 3.57 ng/g wet weight for OH-PBDEs and not detected - 0.10 ng/g wet weight for MeO-PBDEs). The results of this study suggest that these compounds are ubiquitous in biota. Source estimation of MeO- and OH-PBDEs in freshwater fish were discussed. Considering that up to date no freshwater sources for MeO- or OH-PBDEs have been reported, concentrations found should be mainly related to bioaccumulation from anthropogenic sources, although other sources could not be dismissed.

### **Introduction**

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) have been produced and used in large quantities as flame retardants in a wide variety of consumer products (furniture, PCs, TVs, etc). Their persistence, potential bioaccumulation and toxic effects to humans and wildlife have caused large concern (European Communities, 2001, 2002 and 2003) and as a result, tetra-, penta-, hexa- and hepta- PBDEs have been included in Annex A of the Stockholm Convention (UNEP, 2001). Over the past several years significant efforts have been put forth on understanding the source and fate of PBDEs in the environment however there is a lack of

knowledge regarding their methoxylated (MeO-PBDEs) and hydroxylated (OH-PBDEs) analogs.

OH- and MeO-PBDEs have been detected as natural products of marine organisms (Fu et al., 1995; Handayani et al., 1997; Cameron et al., 2000; Vetter et al., 2001; Marsh et al., 2004; Kierkegaard et al., 2004; Teuten et al., 2005; Malmvärn et al., 2005; Malmvärn et al., 2008). Several studies have also identified OH-PBDEs as metabolites of PBDEs in mice and rats exposed to PBDEs (Örn and Klasson-Wehler, 1998; Malmberg et al., 2005; Marsh et al., 2006; Qiu et al., 2007). In fact, Qiu et al., (2007) proposed three metabolic pathways for OH-PBDE formation: i) direct metabolic derivation resulting from cytochrome P450 enzyme mediated metabolism of precursor PBDEs, ii) a 1,2-shift of a bromine atom after epoxidation of the parent PBDE, and iii) debromination and hydroxylation of the parent PBDE. In addition, MeO-PBDEs have been detected as products of OH-PBDEs via O-methylation in bacteria (Allard et al., 1987) and also metabolic production of OH-PBDEs from MeO-PBDEs have been reported (Wan et al., 2009). Reactions involving PBDE parent precursors including thermal heat stress, pyrolysis and incineration, transformation by free radicals such as OH and/or CH<sub>3</sub> (Haglund et al., 1997) and oxidative processes in sewage treatments plants (Ueno et al., 2008) could be other potential sources of these compounds.

MeO- and OH-PBDEs have been identified in abiotic environmental matrices such as surface water and precipitation in Ontario, Canada by Ueno et al. (2008). These compounds have also been detected in the biotic environment including algae, mussel (Malmvärn et al., 2005), herring, seal, salmon muscle and fish oil (Haglund et al., 1997), marine fish (Asplund et al., 1999; Marsh et al., 2004), marine mammals (van Babel et al., 2001; Vetter, 2001; Vetter et al., 2002; Pettersson et al., 2004; Sinkkonen et al., 2004; Marsh et al., 2005; Stapleton et al., 2006; Wan et al., 2009), freshwater fish (Letcher et al., 2003; Kierkegaard et al., 2004; Valters et al., 2005; Houde et al., 2009), birds (Haglund et al., 1997; McKinney et al., 2006), as well as humans (Hovander et al., 2002; Vetter and Jun, 2003; Athanasiadou et al., 2008; Qiu et al., 2009; Lacorte and Ikononou, 2009). Presence of MeO- and OH-PBDEs in humans arouses high concern, since these compounds have some structural resemblance to the thyroid hormone thyroxine (T<sub>4</sub>), and have been shown to have up to three times stronger affinity for transthyretin (TTR) than thyroxine (Malmberg, 2004) thus providing a mechanism for potential disruption in thyroxine homeostasis (Meerts et al., 2001).

The aim of this study was to investigate the occurrence of methoxylated and hydroxylated PBDEs in fish plasma from Lake Ontario. The brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*), an abundant benthic feeding and high trophic species in Lake Ontario was used in this study. This species is widely used for monitoring purposes in the Great Lakes region due to its common occurrence in polluted habitats (IJC, 1989). Concentrations and congener patterns are discussed to estimate the possible origin of these compounds in the sampled fish.

## Materials and Methods

### Sample collection

A total of 117 fish plasma samples were collected in October 2006 from three different sites near the city of Toronto: Toronto Island and Tommy Thomson Park, located within the city of Toronto, and Frenchman's Bay, located 40 Km North to Toronto. Complete details about sample collection are provided in the Supplementary Materials (SM: Material and Methods). In brief: blood was sampled and stored in heparinized vials keep in ice and stored at -80°C until analysis. Due to the small volumes of individual samples, 19 different pools of plasma were created with samples mixed together from the three locations - male and female samples were pooled separately by site. Percent lipid in these samples ranged between 0.6 and 2.3 %. Detailed biological descriptions of the pooled samples are summarized in Table 1, and complete details of for each pooled sample are listed in Table S1.

**Table 1.** Summary of biological characteristics according to capturing site of the fish collected.

	Frenchman's Bay (n=6) <sup>a</sup>		Toronto Island (n=7) <sup>a</sup>		Tommy Thomson (n=6) <sup>a</sup>	
	mean	(min-max)	mean	(min-max)	mean	(min-max)
Fork length (cm)	32.3	( 30.1 - 35.5)	33.2	(30.6 - 35.6)	27.6	(26.2 - 29.7)
Total weight (g)	467.6	(365.7 -546.0)	520.3	(430.0 - 645.1)	292.5	(230.7 - 387.2)
Gonad weight (g)	3.11	(0.73 - 7.03)	3.66	(0.60 - 0.11)	2.28	(0.36 - 5.01)
GSI <sup>b</sup>	0.69	(0.15 - 1.29)	0.71	(0.11 - 1.36)	0.83	(0.12 - 1.59)
Liver weight (g)	11.3	(9.2- 13.6)	10.7	(8.3 - 14.0)	8.28	(6.4 - 10.6)
LSI <sup>c</sup>	2.42	(2.21 - 2.59)	2.16	(1.72 - 2.42)	2.82	(2.61 - 3.11)
Age (years)	6.4	(6.0 - 6.8)	6.9	(6.1 - 7.5)	7.6	(7.3 - 7.6)
Plasma lipid percentage (%)	1.48	(0.99 - 1.91)	0.89	(0.64 -1.14)	1.46	(1.04 -2.33)

a pooled samples

b GSI = (Gonad weight/ Total weight) x 100

c LSI = (Liver weight/ Total weight) x 100

### Chemicals and materials

For MeO- and methylated OH-PBDE determination, twenty individual analytical grade solutions, ranging from mono to hexa brominated native MeO-PBDEs, one labelled <sup>13</sup>C OH-PBDE and two <sup>13</sup>C<sub>12</sub> MeO-PBDE solutions as recovery and performance standards were purchased from Accustandard Inc (New Haven, CT, USA) and Wellington Laboratories (Guelph, ON, Canada), complete details are described in SM. For PBDEs determination five individual calibration solutions including forty one PBDEs from mono to deca brominated were purchased from Wellington Laboratories (Guelph, ON, Canada). Diazomethane was prepared from N-methyl-N-nitroso-p-toluenesulfonamide (Diazald) (Sigma Aldrich) (Fieser and Fieser, 1967).

### **Extraction, clean up, and quantification**

The extraction procedure has been described elsewhere (Hovander et al., 2000; Athanasiadou et al., 2008) and is only summarized here. Briefly, pooled plasma samples (average wet weight of 2.72 g) were spiked with  $^{13}\text{C}$  recovery standards before extraction ( $^{13}\text{C}_{12}$ -6'-MeO-BDE-100 and  $^{13}\text{C}_{12}$ -6'-OH-BDE-100). Hydrochloric acid (1 mL) and 2-propanol (6 mL) were added to denature the proteins and help with the emulsification, respectively. The organic phase was extracted twice with 6 and 4 mL of hexane/methyl tert-butyl ether mixture (1:1; v/v). Organic extracts were combined and washed with 4 mL of potassium chloride (1%), reduced to dryness with nitrogen for gravimetric lipid determination, and subsequently redissolved in a hexane/methyl tert-butyl ether mixture (1:1; v/v).

Fractionation was performed using a florisil column (Berger et al., 2004, 1.5 g activated for 12h at 450°C and deactivated with 0.5 % v/v water) topped with 2 g anhydrous sodium sulfate which was washed with 10 mL hexane and dichloromethane (3:1; v/v). Fraction A, containing PBDEs and MeO-PBDEs, was obtained eluting the column with 11 mL hexane and dichloromethane (3:1; v/v) and subsequently with 2 mL of hexane and acetone (85:15 v/v). Fraction B, containing OH-PBDEs was then obtained with 4 mL of hexane and acetone (85:15; v/v) and 10 mL of dichloromethane:methanol (88:12; v/v). Fraction B was evaporated to dryness and derivatized with 1 mL of diazomethane for 2 h although previous studies have demonstrated that 30 min is sufficient for quantitative methylation (Athanasiadou et al., 2008). Finally, excess diazomethane and ether were removed by the addition of 10 mL of hexane to the extract followed by evaporation to 4 mL. Fraction A and B were subjected to further cleanup. Co-extracted lipids were removed by treatment with 2 mL of concentrated sulfuric acid and washed with 4 mL of hexane, and the organic phase was eluted on acid and neutral silica columns. The final fraction was concentrated until incipient dryness and re-dissolved in the performance standard ( $^{13}\text{C}_{12}$ -6-MeO-BDE-47 in isooctane) prior to GC-MS.

Fraction A, containing MeO-PBDEs and PBDEs, and Fraction B, containing OH-PBDEs (as MeO-PBDEs), were analysed by high resolution mass spectrometry (MicroMass Autospec Ultima HRMS) operated in electron ionization mode at a resolution greater than 10,000, details are described in the SM. Peaks which matched the retention times and isotopic ratio with authentic MeO-PBDE standards were quantified as “identified” MeO- or OH-PBDEs, while peaks that matched only the isotopic ratio were quantified as “unidentified” using an average response factor of same homologue group.

### **Quality control**

Three criteria were used to ensure the correct identification and quantification of analytes: (a)  $\pm 1$  s retention time between the analyte and standard, (b) the ratio of quantifier and qualifier ions had to be within  $\pm 15$  % of the theoretical values and (c) signal to noise ratio had to be greater than 5:1. Recoveries for  $^{13}\text{C}_{12}$ -6'-MeO-BDE-100 and  $^{13}\text{C}_{12}$ -6'-OH-BDE-100 during this study averaged  $72 \pm 9\%$  and  $56 \pm 15\%$ , respectively. Method detection limits (MDLs) were defined as three times the standard deviation analytical mean procedural blank value (n=3).



MDLs ranged from 0.005 to 0.015 pg/g wet weight (w.w.) for MeO-PBDEs, from 0.009 to 0.020 pg/g w.w. for OH-PBDEs, and from 0.001 to 0.009 pg/g w.w. for PBDEs. Nonane, used as an instrumental blank was injected between samples to ensure that there was no carry over between samples. No PBDEs, MeO-PBDEs and OH-PBDEs were detected in the procedure and instrument blanks.

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS statistical software (Version 17.0). Principal component analysis (PCA) was conducted to evaluate correlation between biological characteristics and total PBDE, OH-PBDE and MeO-PBDE concentrations. Correlations between PBDE, OH-PBDE and MeO-PBDE congeners were also evaluated by Pearson's test. Concentrations of pollutants related to the different sampling locations were compared using Mann-Whitney Test. Correlation matrices are shown in supporting information (Tables S5 and S6).

### Results

#### PBDEs

Table 2 summarizes PBDE concentrations (ng/g w.w.) by sampling sites, and results for the 19 pooled samples are shown in Table S2. Plasma lipid content did not correlate with concentrations of PBDEs, MeO- and OH-PBDEs, and thus concentrations in this study were expressed on a wet weight basis (w.w.), see Table S5. Average of total PBDE concentrations (sum of BDE-47, BDE-99, BDE-100, BDE-153, BDE-154, and BDE-183) was  $5.03 \pm 1.31$  ng/g w.w. (mean  $\pm$  SD). Valters et al. (2005) published levels of PBDEs and OH-PBDEs (levels of MeO-PBDEs were below LODs) in different fish species from the Detroit River. Among others, two pools of four Brown Bullhead fish were evaluated, reporting an average concentration of total PBDEs (BDE-47, -99, -100, -154, -153) for the two samples of 1.71 pg/g w.w.

Only six PBDEs were detected in all samples: BDE-47, -99, -100, -154, -153 and -183, with an average contributions to the total PBDE concentrations of: 39% for BDE-47, 37% for BDE-99, 13% for BDE-100, 6% for BDE-153, 6% for BDE-154 and 1% for BDE-183. Similar congener pattern was obtained by Valters et al (2005) and is also well correlated to those reported for two penta-BDEs commercial mixtures, DE-71 and Bromkal 70-5DE, by La Guardia et al. (2006). Concentration of BDE-99, -100, -153, -154 and -183 are closely correlated ( $p < 0.01$ ;  $r = 0.647$  to  $0.954$ ; min to max). However no significant correlations could be obtained with BDE-47 and any other analyte detected in our study (see Table S6).

**Table 2.** Summary of concentrations (ng/g w.w.) of PBDEs, OH-PBDEs and MeO-PBDEs according to capturing sites evaluated in this study. Only detected congeners are described for both identified and unidentified compounds.

Compounds		Frenchman's Bay (n = 6)a		Toronto Island (n = 7)a		Tommy Thomson (n = 6)a	
		mean	(min-max)	mean	(min-max)	mean	(min-max)
<b>PBDEs</b>							
Tetra	BDE-47	2.21	(1.36 - 3.00)	1.53	(1.10 - 2.01)	2.12	(1.58 - 2.50)
Penta	BDE-100	0.75	(0.56 - 0.98)	0.74	(0.47 - 1.26)	0.43	(0.28 - 0.53)
	BDE-99	1.60	(1.15 - 2.05)	2.02	(1.16 - 3.28)	1.68	(1.39 - 1.90)
Hexa	BDE-153	0.36	(0.26 - 0.51)	0.4	(0.19- 1.03)	0.21	(0.15 - 0.29)
	BDE-154	0.26	(0.12 - 0.36)	0.43	(0.16 - 1.30)	0.22	(0.15 - 0.30)
Hepta	BDE-183	0.03	(0.01 - 0.04)	0.06	(0.02 - 0.15)	0.04	(0.03 - 0.06)
	Total PBDEs	5.21	(3.78 - 6.02)	5.18	(3.33- 9.02)	4.69	(3.69 - 5.40)
<b>OH-PBDEs</b>							
Tri	2'- OH-BDE-28	n.d.		0.009	(0.006 - 0.016)	0.013	(0.006 - 0.022)
	4'- OH-BDE-17	0.002	(n = 1)	0.018	(0.009 - 0.037)	0.033	(0.006 - 0.072)
	Unidentified	0.075	(n = 1)	0.041	(0.001-0.14)	0.054	(0.016 - 0.106)
Tetra	2'-OH-BDE-68	n.d.		0.022	(0.013 - 0.034)	0.023	(0.009 - 0.052)
	6- OH-BDE-47	0.043	(0.01 - 0.15)	0.83	(0.18 - 2.55)	1.09	(0.26 - (2.77)
	5- OH- BDE-47	0.011	(n = 1)	n.d.		0.011	(n = 1)
	4'- OH-BDE-49	0.15	(0.07 - 0.35)	0.24	(0.060 - 0.50)	0.24	(0.055 - 0.453)
	4- OH-BDE-42	0.012	(0.008 - 0.018)	0.014	(0.009 - 0.026)	0.005	(n = 1)
	Unidentified	0.026	(0.014 - 0.043)	0.04	(0.002 - 0.10)	0.038	(0.010 - 0.107)
Penta	4'- OH-BDE-101	0.044	(0.025 - 0.064)	0.063	(0.021 - 0.14)	0.029	(0.022 - 0.037)
	Unidentified	n.d.		0.164	(0.118 - 0.211)	0.04	(0.022 - 0.070)
Hexa	Unidentified	n.d.		0.029	(n = 1)	n.d.	
	Total identified OH-PBDEs	0.24	(n.d. - 0.51)	1.15	(0.31 - 3.10)	1.42	(0.37 - 3.36)
	Total unidentified OH-PBDEs	0.03	(n.d. - 0.04)	0.13	(0.003-0.35)	0.11	(0.05 - 0.21)
	Total OH-PBDEs	0.27	(n.d. - 0.55)	1.28	(0.33 - 3.34)	1.53	(0.42 - 3.58)
	Total ident/Total OH-PBDEs	0.90	(0.87 - 0.92)	0.89	(0.75 - 1.00)	0.91	(0.86 - 0.95)
	Total OH-PBDEs/ Total PBDEs	0.05	(0.02 - 0.13)	0.25	(0.08 - 0.67)	0.35	(0.09 - 0.97)
<b>MeO-PBDEs</b>							
Di	Unidentified	n.d.		0.006	(n = 1)	n.d.	
Tri	2'- MeO-BDE-28	0.003	(n = 1)	n.d.		n.d.	
	4'- MeO-BDE-17	0.001	(n = 1)	n.d.		n.d.	
Tetra	2'-MeO-BDE-68	0.003	(0.001 - 0.004)	0.012	(0.002 - 0.021)	0.004	(0.002 - 0.008)
	6- MeO-BDE-47	0.008	(0.005 - 0.014)	0.028	(0.006 - 0.076)	0.036	(0.006 - 0.089)
	Unidentified	n.d.		0.009	(n = 1)	n.d.	
Penta	4'- MeO-BDE-103	n.d.		0.002	(n = 1)	n.d.	
	Total identified MeO-PBDEs	0.01	(n.d. - 0.017)	0.037	(0.008 -0.097)	0.034	(0.008 - 0.089)
	Total unidentified MeO-PBDEs	n.d.		0.016	(n = 1)	n.d.	
	Total MeO-PBDEs	0.01	(n.d. - 0.017)	0.039	(0.008 - 0.097)	0.034	(0.008 - 0.089)
	Total ident/ Total MeO-PBDEs	1.00		0.95	(0.64 - 1.00)	1.00	
	Total MeO-PBDEs/ Total PBDEs	0.002	(0.001 - 0.003)	0.008	(0.001 - 0.02)	0.007	(0.002 - 0.018)

a pooled samples.

n.d.: not detected

### MeO- PBDEs

Table 2 summarizes concentration of “identified” and “unidentified” MeO-PBDEs. Complete details for each pooled sample are listed in Table S3. Fraction A was assessed for 20 MeO-PBDEs, but only five MeO-PBDEs were identified while three unidentified peaks were detected. To evaluate the importance of unidentified concentrations, the identification ratios (Total identified MeO-PBDEs / Total MeO-PBDEs) were calculated. Mean value was  $0.98 \pm 0.08$  (mean  $\pm$  SD), indicating that the unidentified compounds contributed less than 10 % to the final total concentration.

Concentration of total MeO-PBDEs ranged between N.D. and 0.10 ng/g w.w. (0.03 ng/g w.w.; mean) for females; and between 0.01 and 0.09 ng/g w.w. (0.02 ng/g w.w.; mean) for males. These levels are low compare to those reported by Kierkegaard et al., (2004) in a temporal trend study in Pike from Swedish Lakes. Authors reported a decreasing trend for the sum of two MeO-PBDEs, 2'-MeO-BDE-68 and 6-MeO-BDE-47, from 5.4 to 0.5 ng/g w.w. between 1967 and 2000.

Similar congener patterns were observed in all locations evaluated, both for males and females. The major MeO-PBDEs in the samples were tetra-brominated diphenyl ethers congeners: 2'-MeO-BDE-68, and 6-MeO-BDE-47. This data correlates well with those obtained in Pike from Swedish lakes by Kierkegaard et al. (2004), where 2'-MeO-BDE-68, and 6-MeO-BDE-47 were detected in all fish. Both congeners have been reported previously in marine mammals (Marsh et al., 2005; Stapleton et al., 2006). To the best of our knowledge, this is the first time that 2'-MeO-BDE-28, 4'-MeO-BDE-17, and 4'-MeO-BDE-103, are identified in freshwater fish. These MeO-PBDEs were detected at much lower concentrations in three of the nineteen pooled samples analyzed.

### OH-PBDEs

Concentration of “identified” and “unidentified” OH-PBDEs are also summarized in Table 2, and complete details for each pooled sample are listed in Tables S4. Fraction B was assessed for 20 OH-PBDEs, however only eight were identified with the standards while seven were quantified as “unidentified”. Mean value for Total identified OH-PBDEs / Total OH-PBDEs ratio was  $0.90 \pm 0.08$  (mean  $\pm$  SD).

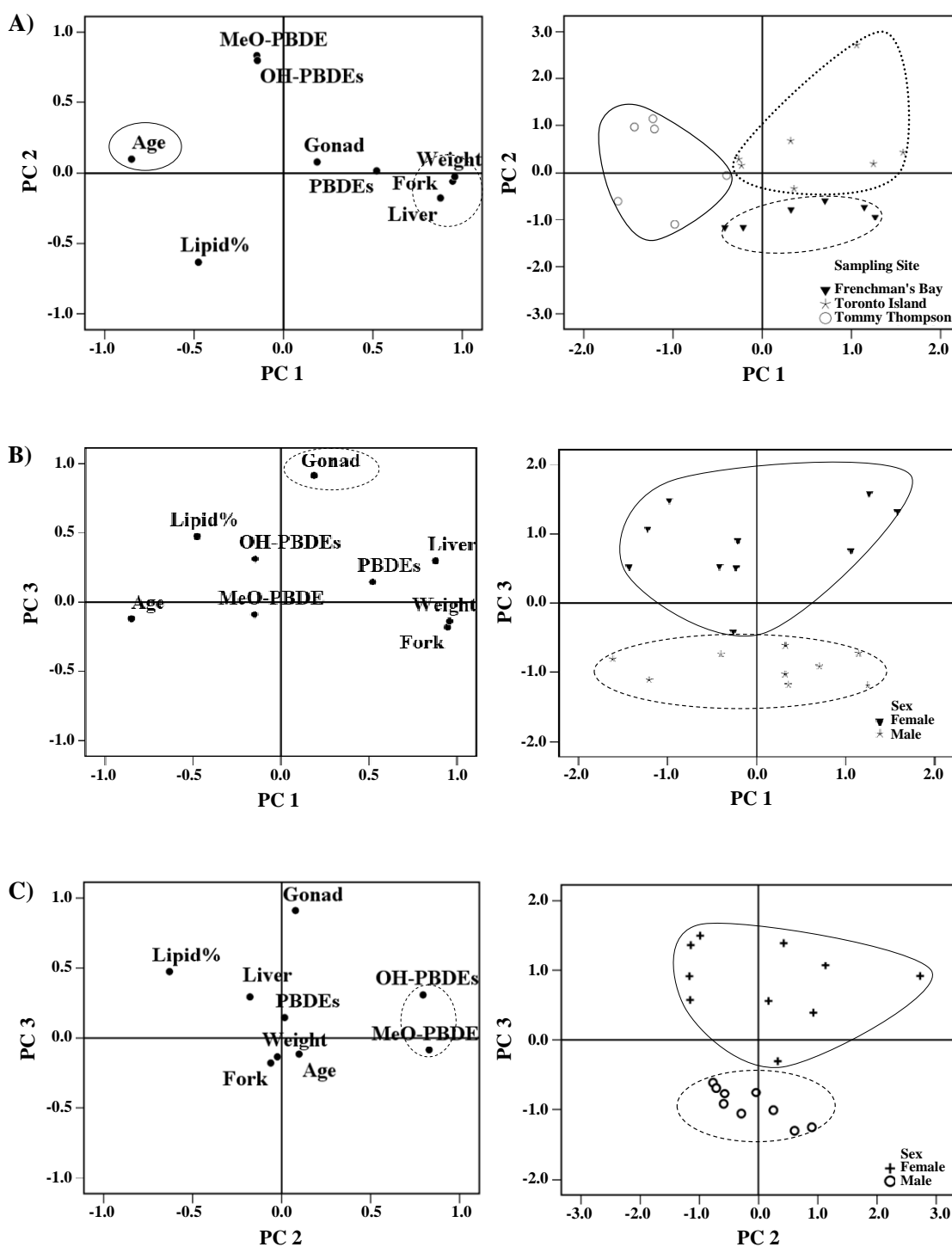
Total OH-PBDEs ranged between N.D. and 3.58 ng/g w.w (1.46 ng/g w.w.; mean) for females; and between 0.16 and 1.51 ng/g w.w. for males (0.70 ng/g w.w.; mean). Concentrations of OH-PBDEs were approximately 46- and 56-fold higher for males and females respectively, than the MeO-PBDEs. Concentrations presented in this study were higher than those reported by Valters et al., (2005), in two pooled samples of brown bullhead from Detroit River (12.8 pg/g w.w; mean of total OH-PBDEs including 2'-OH-BDE-68, 6-OH-BDE-47, 4'-OH-BDE-49, 4-OH-BDE-42 and 2-OH-BDE-123). This fact is in agreement with levels of OH-PBDEs (MeO-PBDEs were not analyzed) reported in the abiotic environment from the Great Lakes region, including the Detroit River and Lake Ontario by Ueno et al. (2008). In that study,

snow samples presented the highest value in Guelph Lake located 45 km north of Lake Ontario, and 65 km from Toronto Island and the Tommy Thompson Park, sampling locations of our study. In addition, higher concentrations of OH-PBDEs in surface water samples were found in Lake Ontario compared to those obtained from the Detroit River. The authors suggest that sources of OH-PBDEs are related to populated areas and they may be produced in sewage treatment plants (STPs). Since urban wastewater treatment is a highly oxidative process, it is not surprising to find OH-PBDEs in these effluents (Hua et al., 2005), although a fraction of OH-PBDEs may also arrive to the WWTPs in their influent, and could be due to a multitude of sources, like human or animal excretion (Hakk et al., 2006 and 2002; Ueno et al., 2008). Possible sources of MeO- and OH-PBDEs detected in this study are discussed later.

As in the case of MeO-PBDEs, for OH-PBDEs similar congener patterns were also observed in all locations evaluated, both for males and females. The major OH-PBDEs were tetra-BDEs: 6-OH-BDE-47, and 4'-OH-BDE-49, which accounted for  $77 \pm 14$  % (mean  $\pm$  SD) of the total OH-PBDE concentration and were detected in 18 of 19 samples analyzed. Other congeners such as 2'-OH-BDE-28, 4'-OH-BDE-17, 2'-OH-BDE-68, 5-OH-BDE-47, 4-OH-BDE-42 and 4'-OH-BDE-101 were detected in some of the samples but at lower concentrations. 5-OH-BDE-47, a tetra OH-BDE, was only detected in two samples and at very low levels. These results are consistent with congener patterns reported by Valters et al. (2005) in plasma of fish from the Detroit River where 6-OH-BDE-47, and 4'-OH-BDE-49 accounted for 75% of the total OH PBDE concentration without considering 2-OH-BDE-123 that we did not analyze in our study. 2'-OH-BDE-68 has also been frequently detected in fish (Asplund et al., 1999; Marsh et al., 2004).

## Discussion

Principal Components Analysis (PCA) was performed including biological characteristics and total PBDE, OH-PBDE and MeO-PBDE concentrations, respectively. Results showed that three principal components (PC) depicted 79.2% of the variance. The first component, included age, total weight, fork length and liver weight. Total weight, fork length and liver weight were closely positively correlated ( $p < 0.01$ ;  $r = 0.980, 0.789$  and  $0.818$ , respectively), see Table S5. However, negative correlations were obtained between these variables and age ( $p < 0.01$ ;  $r = -0.749, -0.760$  and  $-0.738$ , respectively). The second component described total concentrations of OH- and MeO-PBDEs, which are positively correlated ( $p < 0.05$ ;  $r = 0.454$ ), and the third component was only influenced by gonad weight.

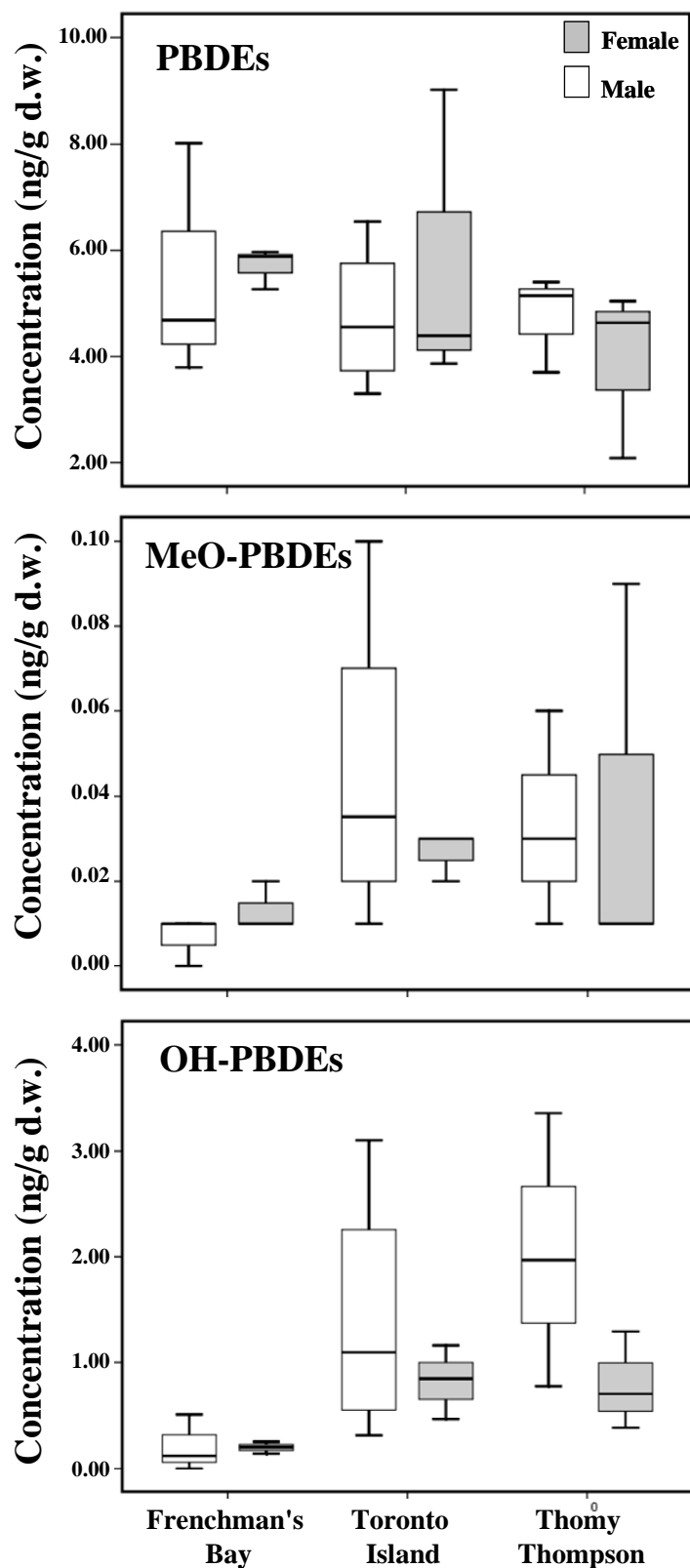


**Fig 1.** Diagrams of dispersion related to the three components resulting from a principal components analysis (PCA): A) PC 1 and PC 2, B) PC 1 and PC 3, and C) PC 2 and PC 3. Loading plots (left) contributions of each variable to each component. Scores plot (right) of all samples on each component.

Figure 1.A shows the relationship between the first and second component, sample scores are labelled according to the sampling site. It is observed that samples from Tommy Thompson are located on the negative side of the first component, while samples from

Frenchman Bay and Toronto Island are situated on the positive side. This indicates that samples from Tommy Thompson are older and smaller when compared to the other two sampling sites. Tommy Thompson location is the final destination of the sediments produced during the dredging of Toronto Port Channels (TAP, 2006), so differences in growing ratio could be explained by the less availability of food in this location. In addition, samples from Frenchman's Bay are situated in the negative side of the second component, indicating that these samples have a lower concentration of MeO- and OH-PBDEs when compared to the other sampling sites. Figure 2 shows the concentrations of total PBDEs, total MeO-PBDEs and total OH-PBDEs for males and females in the three locations studied. No significant variations could be obtained between sites of capture for PBDEs, however levels of MeO- and OH-PBDEs were lowest ( $p < 0.05$ ) at the Frenchman's Bay sampling site compared to the Toronto Island and the Tommy Thompson sites. The higher MeO- and OH-PBDEs concentrations found near the city of Toronto (Toronto Island and Tommy Thompson Park) are plausibly due to the large population and greater usage of PBDEs in urban areas (Ueno et al., 2008).

The relationship between the first and third components is shown in Figure 1.B. Samples are labelled according to sex. Samples are clearly located in two poles for the third component, females on the positive side and males on the negative side. Females invest more energy into gonad weight compared to males. Similarly, females and males are located in both poles of the first factor indicating heterogeneity in age of the samples for both sexes. Figure 1.C represents second and third components. Samples are labelled according to sex. Both females and males are distributed in the negative and positive side of the second factor, thus no significant difference could be observed between females and males in terms of MeO- and OH-PBDE concentrations.



**Fig. 2.** Box and whisker plots obtained for A) PBDEs B) MeO-PBDEs, and C) OH-PBDEs in the studied locations, distinguishing between male and female pooled samples. Upper edge of the box, line within the box and lower edge of the box, represents the 75<sup>th</sup>, 50<sup>th</sup>, and 25<sup>th</sup> percentiles. Vertical lines extends from the minimum to the maximum value.

**Potential sources of MeO- and OH-PBDEs in plasma of Brown Bullhead**

Presence of MeO- and OH-PBDEs in the plasma could be derived from: i) bioaccumulation from natural or anthropogenic sources, and/or ii) metabolism.

*Bioaccumulation from natural sources*

As discussed in the introduction, MeO- and OH-PBDEs have been reported as natural products of marine organisms (Fu et al., 1995; Handayani et al., 1997; Cameron et al., 2000; Vetter et al., 2001; Marsh et al., 2004; Kierkegaard et al., 2004; Teuten et al., 2005; Malmvärn et al., 2005; Malmvärn et al., 2008). Naturally occurring MeO- and OH-PBDEs reported in the literature always have a methoxy or hydroxy group in the ortho position relative to the diphenyl ether bond (Marsh et al., 2004) whereas polybrominated diphenyl ether exposed mice and rats (Örn and Klasson-Wehler, 1998; Malmberg et al., 2005; Marsh et al., 2006; Qiu et al., 2007), have the methoxy or hydroxy group in the meta and para position also. Thus, findings of MeO- or OH-PBDEs with methoxyl or hydroxyl groups in the meta or para positions may indicate PBDE metabolism. To date, no natural freshwater sources of these compounds are known, although this does not preclude that a percentage of ortho hydroxylated or methoxylated PBDEs reported in this study (2'-OH-BDE-28, 2'-OH-BDE-68, 6-OH-BDE-47, 2'-MeO-BDE-28, 2'-MeO-BDE-68, and 6-MeO-BDE-47) could be due to unidentified freshwater sources, or atmospheric transport from marine environment (Ueno et al., 2008).

*Bioaccumulation from anthropogenic sources*

MeO- and OH-PBDEs could also be originated from the reaction of PBDEs with OH formed from the UV degradation of ozone or from UV reactions with dissolved organic matter in the aquatic environment (Ueno et al., 2008), but this contribution is difficult to quantify with data obtained in this study. However, there are two factors in the results that indicate anthropogenic sources of OH-PBDEs near the city of Toronto: i) the variation of total OH- and MeO-PBDEs among capturing sites, and ii) a shift in the ratio of 6-OH-BDE-47 to 4'-OH-BDE-49. As discussed before, samples captured close to Toronto, presented statistical higher ( $p < 0.05$ ) total MeO and OH-PBDEs concentrations (0.039 and 0.034 ng/g w.w. for MeO-PBDEs, and 1.28 and 1.53 ng/g w.w. for OH-PBDEs; means obtained at Toronto Island and Tommy Thompson Park, respectively) compare to those obtained at Frenchman Bay (0.01 ng/g w.w. for MeO-PBDEs and 0.27 ng/g w.w. for OH-PBDEs; mean). In addition there is a shift in the ratio of 6-OH-BDE-47 to 4'-OH-BDE-49 between pooled samples from the Frenchman's Bay ( $0.2 \pm 0.1$ ; mean  $\pm$  SD) and samples captured near the city of Toronto (Toronto Island and Tommy Thompson Park) ( $4.2 \pm 1.5$ ; mean  $\pm$  SD). Qui et al. (2007) reported a ratio of 0.4 for these OH-PBDEs in mouse plasma exposed to DE-71. This ratio is similar to the one obtained in fish from the Frenchman's Bay, and suggests a metabolic source in these samples. On the other hand, enrichment of 6-OH-BDE-47 found in the samples near the city of Toronto could indicate bioaccumulation in samples collected near the city of Toronto.



### *Metabolism*

Metabolic transformation could be indicated by significant correlation between precursors and metabolites (Wan et al., 2009). However total PBDE concentrations obtained in this study did not correlate neither with MeO-PBDEs nor OH-PBDEs, suggesting that metabolism is not the main source of OH- and MeO-PBDEs in the samples. However, significant correlation was found between total MeO-PBDEs and total OH-PBDEs ( $p < 0.05$ ;  $r = 0.454$ ). Interconversion of MeO-PBDEs and OH-PBDEs by formation of MeO-PBDEs from OH-PBDEs (Allard et al., 1987; Haglund et al., 1997) and vice versa (Wan et al., 2009) have been demonstrated, and could support this correlation. Nevertheless, since each congener could produce different OH- and/or MeO-PBDEs, metabolism should be evaluated by congeners.

Concentrations of 4'-OH-BDE-17, 2'-OH-BDE-68, and 6-OH-BDE-47 were well correlated ( $p < 0.01$ ;  $r > 0.646$ ), indicating a possible common origin. Qui et al. (2007) proposed a metabolic pathway that produces these OH-PBDEs as metabolites of BDE-47 in mouse plasma after exposure to a PentaBDE commercial formulation (DE-71). However no correlation was obtained between 4'-OH-BDE-17, 2'-OH-BDE-68, and 6-OH-BDE-47 and BDE 47 to support this metabolic pathway in fish. Others metabolic pathways for 2'-OH-BDE-68 formation could be: i) direct metabolic derivation of BDE-68, ii) via a 1,2-shift of a bromine atom after epoxidation of BDE-49, or by iii) debromination/hydroxylation of BDE-90 as shown in Figure S1. Although samples were evaluated for 36 PBDEs, commercial mixture used for instrumental analysis did not include neither BDE-68 nor BDE-90. However, Valters et al., (2005) also indicated 2'-OH-BDE-68 in the plasma of fish from the Detroit river (Valters et al., 2005) but was not found in exposed mice (Qiu et al., 2007) or rats (Marsh et al., 2006) which suggests bioaccumulation from natural or anthropogenic sources.

Good correlations were obtained between 4-OH-BDE-42 and 4'-OH-BDE-101 ( $p < 0.01$ ;  $r = 0.819$ ) and these with BDE-100, -153, -154, and -183 ( $p < 0.05$ ,  $r > 0.522$ ), see Table S6. Origin of 4'-OH-BDE-101 could be via a 1,2-shift of a bromine atom after epoxidation of the parent BDE-99 as shown in Figure S2. In addition, Qui et al., (2007) proposed the metabolic formation of 4-OH-BDE-42 from BDE-47 and reported that levels of BDE metabolites could be due to a debromination and hydroxylation of a highly brominated PBDEs. Therefore, degradation of BDE-100, -153, -154, and -183 to BDE-47 and BDE-99 and their hydroxylation could explain the presence of 4-OH-BDE-42 and 4'-OH-BDE-101 in the plasma. In the same manner, debromination and hydroxylation of BDE-47 have been proposed as a potential origin for 2'-OH-BDE-28 and 4'-OH-BDE-17 in faeces (Marsh et al., 2006) and plasma (Qui et al., 2007) of BDE-47 exposed rats (Marsh et al., 2006). However, we did not find any correlation between these OH-PBDEs and BDE-47 to support this hypothesis in Brown Bullhead.

In summary, this study detected PBDEs, MeO-, and OH-PBDEs in fish samples from Lake Ontario and the results demonstrate that these compounds are ubiquitous in biota. Results indicate that dietary intake represents the most important source, while contribution of PBDE metabolism is low. Since up to date no freshwater sources for MeO- or OH-PBDEs have been

reported, bioaccumulated concentrations found in this study should be related to anthropogenic sources. Results also suggests that among others, sources related to human activities like human excretion, or oxidative processes occurring in the WWTP, could be important sources of OH-PBDEs and MeO-PBDEs. Further research is needed to evaluate the sources, fate, bioavailability, and toxicological significance of these compounds in freshwater fish.

### Acknowledgements

A. de la Torre acknowledges the Spanish Ministry of Science and Education for the grant to study flame retardants in environmental matrices. The authors thank Gerald Tetreault, Chad Boyko, Maria Vilella, Lisa Heikkila, Stacey Clarence, Cheryl Tinson, and Technical Operations staff for their technical support. The authors acknowledge funding for this project provided by GLIE and GLAP.

### References

- Allard, A.S., Remberger, M., Neilson, A.H., 1987. Bacterial O-methylation of halogen-substituted phenols. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 839-845.
- Asplund, L., Athanasiadou, M., Sjodin, A., Bergman, A., Borgeson, H., 1999. Organohalogen substances in muscle, egg and blood from healthy Baltic salmon (*Salmo salar*) and Baltic salmon that produced offspring with the M74 syndrome. *Ambio.* 28, 67-76.
- Athanasiadou, M., Cuadra, S.N., Marsh, G., Bergman, A., Jakobsson, K., 2008. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and bioaccumulative hydroxylated PBDE metabolites in young humans from Managua, Nicaragua. *Environ. Health Perspect.* 116, 400-408.
- Berger, U., Herzke, D., Sandanger, T.M., 2004. Two trace analytical methods for determination of hydroxylated PCBs and other halogenated phenolic compounds in eggs from Norwegian birds of prey. *Anal. Chem* 76, 441-452.
- Cameron, G.M., Stapleton, B.L., Simonsen, S.M., Brecknell, D.j., Garson, M., 2000. New Sesquiterpene and Brominated Metabolites form the Tropical Marine Sponge *Dysidea* sp. *Tetrahedron.* 56, 5247-5252.
- Directive 2003/11/EC of the European Parliament and of The Council of the European Union, of 6 February 2003 amending for the 24th time Council Directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (pentabromodiphenyl ether, octabromodiphenyl ether). *Official Journal L042, 15/02/2003.*
- European Communities, 2001. European Union Risk Assessment Report. Diphenyl ether, pentabromo derivate (pentabromodiphenyl ether). CAS No.: 32534-81-9. EINECS No.: 251-084-2. United Kingdom on behalf of the European Union.
- European Communities, 2002. European Union Risk Assessment Report. Bis(pentabromopheny) ether. CAS No.: 1163-19-5. EINECS No.: 214-604-19. United Kingdom on behalf of the European Union.
- European Communities, 2003. European Union Risk Assessment Report. Diphenyl ether, octabromo derivate (octabromomodiphenyl ether). CAS No.: 32536-52-0. EINECS No.: 251-087-9. France and United Kingdom on behalf of the European Union.
- Fieser, L.F. and Fieser, M., 1967. Reagents for organic Synthesis. John Wiley and Sons
- Fu, X., Schmitz, F.J., Govindan, M., Abbas, S.A., Hanson, K.M., Horton, P.A., Crews, P., Laney, M., Schatzman, R.C., 1995. Enzyme inhibitors: new and known polybrominated

- phenols and diphenyl ethers from four Indo-Pacific Dysidea sponges. *J. Nat. Prod.* 58, 1384-1391.
- Haglund, P.S., Zook, D.R., Buser, H.R., Hu, J., 1997. Identification and Quantification of Polybrominated Diphenyl Ethers and Methoxy-Polybrominated Diphenyl Ethers in Baltic Biota. *Environ. Sci. Technol.* 31, 3281-3287.
- Hakk, H., Huwe, J., Low, M., Rutherford, D., Larsen, G., 2006. Tissue disposition, excretion and metabolism of 2,2',4,4',6-pentabromodiphenyl ether (BDE-100) in male Sprague-Dawley rats. *Xenobiotica* 36, 79-94.
- Hakk, H., Larsen, G., Klasson Wehler, E., 2002. Tissue disposition, excretion and metabolism of 2,2', 4,4', 5-pentabromodiphenyl ether (BDE-99) in the male Sprague-Dawley rat. *Xenobiotica* 32, 369-382.
- Handayani, D., Edrada, R.A., Proksch, P., Wray, V., Witte, L., Van Soest, R.W., Kunzmann, A., Soedarsono, 1997. Four new bioactive polybrominated diphenyl ethers of the sponge *Dysidea herbacea* from West Sumatra, Indonesia. *J. Nat. Prod.* 60, 1313-1316.
- Houde, M., Pacepavicius, G., Darling, C., Fair, P.A., Alae, M., Bossart, G.D., Solomon, K.R., Letcher, R.J., Bergman, Å., Marsh, G., Muir, D., 2009. Polybrominated diphenyl ethers and their hydroxylated analogs in plasma of bottlenose dolphins (*Tursiops Truncatus*) from the United States east coast. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 2061-2068.
- Hovander, L., Athanasiadou, M., Asplund, L., Jensen, S., Wehler, E.K., 2000. Extraction and cleanup methods for analysis of phenolic and neutral organohalogenes in plasma. *J. Anal. Toxicol.* 24, 696-703.
- Hovander, L., Malmberg, T., Athanasiadou, M., Athanassiadis, I., Rahm, S., Bergman, A., Wehler, E.K., 2002. Identification of hydroxylated PCB metabolites and other phenolic halogenated pollutants in human blood plasma. *Arch. Environ. Contam Toxicol.* 42, 105-117.
- Hua, W., Bennett, E.R., Letcher, R.J., 2005. Triclosan in waste and surface waters from the upper Detroit River by liquid chromatography-electrospray-tandem quadrupole mass spectrometry. *Environ. Int.* 31, 621-630.
- International Joint Commission (IJC), 1989. Guidance on characterization of toxic substances problems in areas of concern in the Great Lakes Basin. Report of the Great Lakes Water Quality Board, Windsor, ON.
- Kierkegaard, A., Bignert, A., Sellstrom, U., Olsson, M., Asplund, L., Jansson, B., De Wit, C.A., 2004. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and their methoxylated derivatives in Pike from Swedish waters with emphasis on temporal trends, 1967-2000. *Environ. Pollut.* 130, 187-198.
- Lacorte, S. and Ikonou, M.G., 2009. Occurrence and congener specific profiles of polybrominated diphenyl ethers and their hydroxylated and methoxylated derivatives in breast milk from Catalonia. *Chemosphere.* 74, 412-420.
- La Guardia, M.J., Hale, R.C., Harvey, E., 2006. Detailed polybrominated diphenyl ether (PBDE) congener composition of the widely used penta-, octa-, and deca-PBDE technical mixtures. *Environ. Sci. Technol.* 40, 6247-6254.
- Letcher, R.J., D'Sa, I., Valters, K., Marsh, G., Li, H., Bennett, E., Alae, M., 2003. Polybrominated diphenyl ethers and hydroxylated and methoxylated analogues in Detroit River fish. *Organohalogen Compd.* 62, 29-32.
- Malmberg, T. 2004. Identification and characterisation of hydroxylated PCB and PBDE metabolites in blood -congener specific synthesis and analysis. Ph.D. thesis, Stockholm University, Sockholm Swedem.

- Malmberg, T., Athanasiadou, M., Marsh, G., Brandt, I., Bergman, A., 2005. Identification of hydroxylated polybrominated diphenyl ether metabolites in blood plasma from polybrominated diphenyl ether exposed rats. *Environ. Sci. Technol.* 39, 5342-5348.
- Malmvärn, A., Marsh, G., Kautsky, L., Athanasiadou, M., Bergman, A., Asplund, L., 2005. Hydroxylated and methoxylated brominated diphenyl ethers in the red algae *Ceramium tenuicorne* and blue mussels from the Baltic Sea. *Environ. Sci. Technol.* 39, 2990-2997.
- Malmvärn, A., Zebuhr, Y., Kautsky, L., Bergman, K., Asplund, L., 2008. Hydroxylated and methoxylated polybrominated diphenyl ethers and polybrominated dibenzo-p-dioxins in red alga and cyanobacteria living in the Baltic Sea. *Chemosphere* 72, 910-916.
- Marsh, G., Athanasiadou, M., Bergman, A., Asplund, L., 2004. Identification of hydroxylated and methoxylated polybrominated diphenyl ethers in Baltic Sea salmon (*Salmo salar*) blood. *Environ. Sci. Technol.* 38, 10-18.
- Marsh, G., Athanasiadou, M., Athanassiadis, I., Bergman, A., Endo, T., Haraguchi, K., 2005. Identification, quantification, and synthesis of a novel dimethoxylated polybrominated biphenyl in marine mammals caught off the coast of Japan. *Environ. Sci. Technol.* 39, 8684-8690.
- Marsh, G., Athanasiadou, M., Athanassiadis, I., Sandholm, A., 2006. Identification of hydroxylated metabolites in 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether exposed rats. *Chemosphere* 63, 690-697.
- McKinney, M.A., Cesh, L.S., Elliott, J.E., Williams, T.D., Garcelon, D.K., Letcher, R.J., 2006. Brominated flame retardants and halogenated phenolic compounds in North American west coast bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*) plasma. *Environ. Sci. Technol.* 40, 6275-6281.
- Meerts, I.A., Letcher, R.J., Hoving, S., Marsh, G., Bergman, A., Lemmen, J.G., van der, B.B., Brouwer, A., 2001. In vitro estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PDBEs, and polybrominated bisphenol A compounds. *Environ. Health Perspect.* 109, 399-407.
- Örn, U. and Klasson-Wehler, E., 1998. Metabolism of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether in rat and mouse. *Xenobiotica.* 28, 199-211.
- Pettersson, A., van, B.B., Engwall, M., Jimenez, B., 2004. Polybrominated diphenylethers and methoxylated tetrabromodiphenylethers in cetaceans from the Mediterranean Sea. *Arch. Environ. Contam Toxicol.* 47, 542-550.
- Qiu, X., Mercado-Feliciano, M., Bigsby, R.M., Hites, R.A., 2007. Measurement of polybrominated diphenyl ethers and metabolites in mouse plasma after exposure to a commercial pentabromodiphenyl ether mixture. *Environ. Health Perspect.* 115, 1052-1058.
- Qiu, X., Bigsby, R.M., Hites, R.A., 2009. Hydroxylated metabolites of polybrominated diphenyl ethers in human blood samples from the United States. *Environ. Health Perspect.* 117, 93-98.
- Sinkkonen, S., Rantalainen, A.L., Paasivirta, J., Lahtipera, M., 2004. Polybrominated methoxy diphenyl ethers (MeO-PBDEs) in fish and guillemot of Baltic, Atlantic and Arctic environments. *Chemosphere* 56, 767-775.
- Stapleton, H.M., Dodder, N.G., Kucklick, J.R., Reddy, C.M., Schantz, M.M., Becker, P.R., Gulland, F., Porter, B.J., Wise, S.A., 2006. Determination of HBCD, PBDEs and MeO-BDEs in California sea lions (*Zalophus californianus*) stranded between 1993 and 2003. *Mar. Pollut. Bull.* 52, 522-531.
- Teuten, E.L., Xu, L., Reddy, C.M., 2005. Two abundant bioaccumulated halogenated compounds are natural products. *Science* 307, 917-920.

- TPA, Toronto Port Authority. Western channel Maintenance Dredging. Canadian Environmental Assessment Registry (06-01-19783). <http://www.acee-ceaa.gc.ca/052/details-eng.cfm?pid=19783> (Accessed February 2010).
- Ueno, D., Darling, C., Alae, M., Pacepavicius, G., Teixeira, C., Campbell, L., Letcher, R.J., Bergman, A., Marsh, G., Muir, D., 2008. Hydroxylated polybrominated diphenyl ethers (OH-PBDEs) in the abiotic environment: surface water and precipitation from Ontario, Canada. *Environ. Sci. Technol.* 42, 1657-1664.
- United Nations Environmental Programme(UNEP), 2001. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. <http://chm.pops.int> (Accessed october 2010)
- Valters, K., Li, H., Alae, M., D'Sa, I., Marsh, G., Bergman, A., Letcher, R.J., 2005. Polybrominated diphenyl ethers and hydroxylated and methoxylated brominated and chlorinated analogues in the plasma of fish from the Detroit River. *Environ. Sci. Technol.* 39, 5612-5619.
- van Babel, B., Dam, M., Tysklind, M., Lindström, G., 2001. Levels of polybrominated diphenyl ethers in marine mammals. *Organohalogen Compd.* 52, 99-103.
- Vetter, W., 2001a. A GC/ECNI-MS method for the identification of lipophilic anthropogenic and natural brominated compounds in marine samples. *Anal. Chem* 73, 4951-4957.
- Vetter, W., Scholz, E., Gaus, C., Muller, J.F., Haynes, D., 2001b. Anthropogenic and natural organohalogen compounds in blubber of dolphins and dugongs (Dugong dugon) from northeastern Australia. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 221-231
- Vetter, W., Stoll, E., Garson, M.J., Fahey, S.J., Gaus, C., Muller, J.F., 2002. Sponge halogenated natural products found at parts-per-million levels in marine mammals. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2014-2019.
- Vetter, W. and Jun, W., 2003. Non-polar halogenated natural products bioaccumulated in marine samples. II. Brominated and mixed halogenated compounds. *Chemosphere.* 52, 423-431.
- Wan, Y., Wiseman, S., Chang, H., Zhang, X., Jones, P.D., Hecker, M., Kannan, K., Tanabe, S., hu, J., Lam, M., Geisy, J., 2009. Origin of hydroxylated brominated diphenyl ethers, Natural Compounds or man-made flame retardants?. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7536-7542.
- WHO, 1997. Flame retardants: A general Introduction. IPCS, Environmental Health Criteria, World Health Criteria (WHO), Geneva.
- Yu, Z., Zheng, K., Ren, G., Zheng, Y., Ma, S., Peng, P., Wu, M., Sheng, G., Fu, J., 2010. Identification of hydroxylated octaand nona-bromodiphenyl ethers in human serum from electronic waste dismantling workers. *Environ. Sci. Technol.* 44, 3979-3985.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

### POLYBROMINATED DIPHENYL ETHERS AND THEIR METHOXYLATED AND HYDROXYLATED IN BROWN BULLHEAD (*AMEIURUS NEBULOSUS*) PLASMA FROM LAKE ONTARIO

De la Torre, A.<sup>1</sup>, Pacepavicius, G.<sup>2</sup>, Martínez, M.A.<sup>1</sup>, Darling, C.<sup>2</sup>, Muir, D.<sup>2</sup>, Sherry, J.<sup>2</sup>, McMaster, M.<sup>2</sup>, Alae, M.<sup>2</sup>

- 1) Persistent Organic Pollutant Group, Environment Department. CIEMAT, Avd. Complutense 22 Madrid, Spain.
- 2) Aquatic Ecosystem Protection Research Division, Water Science and Technology Directorate, Environment Canada, 867 Lakeshore Road, Burlington, ON, L7R 4A6, Canada.

#### Sample collection

A total of 117 fish plasma samples were collected in October 2006 from three different sites near the city of Toronto: Toronto Island and Tommy Thompson Park, located within the city of Toronto, and Frenchman's Bay, located 40 km north of Toronto. Fish were anaesthetized in a clove oil bath (~0.05% + ~0.025% ethanol to aid emulsification). Blood was sampled and stored in heparinized vials kept on ice, and centrifuged within one hour of collection. The plasma was removed, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until analysis. Due to the small volumes of individual samples, 19 different pools of plasma were created with samples mixed together from the three locations - male and female samples were pooled separately by site. Percent lipid in these samples ranged between 0.6 and 2.3 %. Detailed biological descriptions of the pooled samples are summarized in Table S1.

#### Chemicals and materials

For MeO- and methylated OH-PBDEs determination, twenty individual analytical grade solutions, ranging from mono to hexa brominated native MeO-PBDEs (2'-MeO-BDE-3, 2'-MeO-BDE-7, 3'-MeO-BDE-7, 2'-MeO-BDE-28, 3'-MeO-BDE-28, 4'-MeO-BDE-17, 4-MeO-BDE-42, 6-MeO-BDE-47, 3-MeO-BDE-47, 5-MeO-BDE-47, 4'-MeO-BDE-49, 6'-MeO-BDE-99, 4-MeO-BDE-90, 6-MeO-BDE-140, 6-MeO-BDE-157, (Accustandard Inc, New Haven, CT, USA), 2'-MeO-BDE-68, 5'-MeO-BDE-99, 5'-MeO-BDE-100, 4'-MeO-BDE-101, 4'-MeO-BDE-103), two labelled <sup>13</sup>C<sub>12</sub> solutions (6'-MeO-BDE-100 and 6'-OH-BDE-100) as recovery standards, and <sup>13</sup>C<sub>12</sub> 6-MeO-BDE-47 as performance standard were obtained from Wellington Laboratories, Guelph, ON, Canada. For PBDE determination five individual calibration solutions (BFR CS1-CS5) including 36 PBDEs from mono to deca brominated were purchased from Wellington Laboratories, Guelph, ON, Canada.

Diazomethane was prepared from N-methyl-N-nitroso-p-toluenesulfonamide (Diazald) (Sigma Aldrich) (Fieser and Fieser, 1967).

### **Extraction, clean up, and quantification**

The detailed extraction procedure has been described elsewhere (Hovander et al., 2000; Athanasiadou et al., 2008) and is only summarized here. Briefly, pooled plasma samples (average wet weight of 2.72 g) were spiked with 5 ng of  $^{13}\text{C}$  recovery standards before extraction ( $^{13}\text{C}_{12}$  6'-MeO-BDE-100 and  $^{13}\text{C}_{12}$  6'-OH-BDE-100). Hydrochloric acid (1 mL) and 2-propanol (6 mL) were added to denature the proteins and help with the emulsification, respectively. The organic phase was extracted twice with 6 and 4 mL of hexane /methyl tert-butyl ether mixture (1:1;v/v). Organic extracts were combined and washed with 4 mL of KCl (1%), reduced to dryness with nitrogen for gravimetric lipid determination, and subsequently redissolved in a hexane/methyl tert-butyl ether mixture (1:1; v/v).

Fractionation was performed using a florisil column (Berger et al., 2004, 1.5 g activated for 12h at 450°C and deactivated with 0.5 % v/v water) topped with 2 g anhydrous sodium sulfate which was washed with 10 mL hexane and dichloromethane (3:1; v/v). Fraction A, containing PBDEs and MeO-PBDEs, was obtained eluting the column with 11 mL hexane and dichloromethane (3:1; v/v) and subsequently with 2 mL of hexane and acetone (85:15; v/v). Fraction B, containing OH-PBDEs was then obtained with 4 mL of hexane and acetone (85:15; v/v) and 10 mL of dichloromethane:methanol (88:12; v/v). Fraction B was evaporated to dryness and derivatized with 1 mL of diazomethane for 2 h although previous studies have demonstrated that 30 min is sufficient for quantitative methylation (Athanasiadou et al., 2008). Finally, excess diazomethane and ether were removed by the addition of 10 mL of hexane to the extract followed by evaporation to 4 mL. Fractions A and B were subjected to further cleanup. Co-extracted lipids were removed by treatment with 2 mL of concentrated sulfuric acid and washed with 4 mL of hexane. The organic phase was reduced to ~1 mL and then applied onto an acid silica column (1 g of Silica:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2:1; w/w) and eluted using 6 mL of cyclohexane:dichloromethane (1:1; v/v) and 10 mL of dichloromethane. Both fractions were combined and concentrated to 0.5 mL. The resultant fraction was eluted on an additional silica column, 1 g eluted with 3 mL of cyclohexane, and 6 mL of dichloromethane. The second fraction was concentrated until incipient dryness and re-dissolved in 50  $\mu\text{L}$  of performance standard ( $^{13}\text{C}_{12}$ -6-MeO-BDE-47 in isooctane) prior to GC-MS.

### **Instrumental analysis**

Fraction A, containing PBDEs and MeO-PBDEs, and Fraction B, containing OH-PBDEs (as MeO-PBDEs), were analysed by high resolution mass spectrometry (MicroMass Autospec Ultima HRMS) operated in electron ionization mode at a resolution greater than 10,000. The chromatographic separation of MeO-PBDEs was carried out on Agilent 6890 GC fitted with a 60 m DB-5-MS capillary column (0.25 mm i.d. x 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness; J&W Scientific). Split/ splitless injections of 1  $\mu\text{L}$  were made onto an injector set isothermally at 280

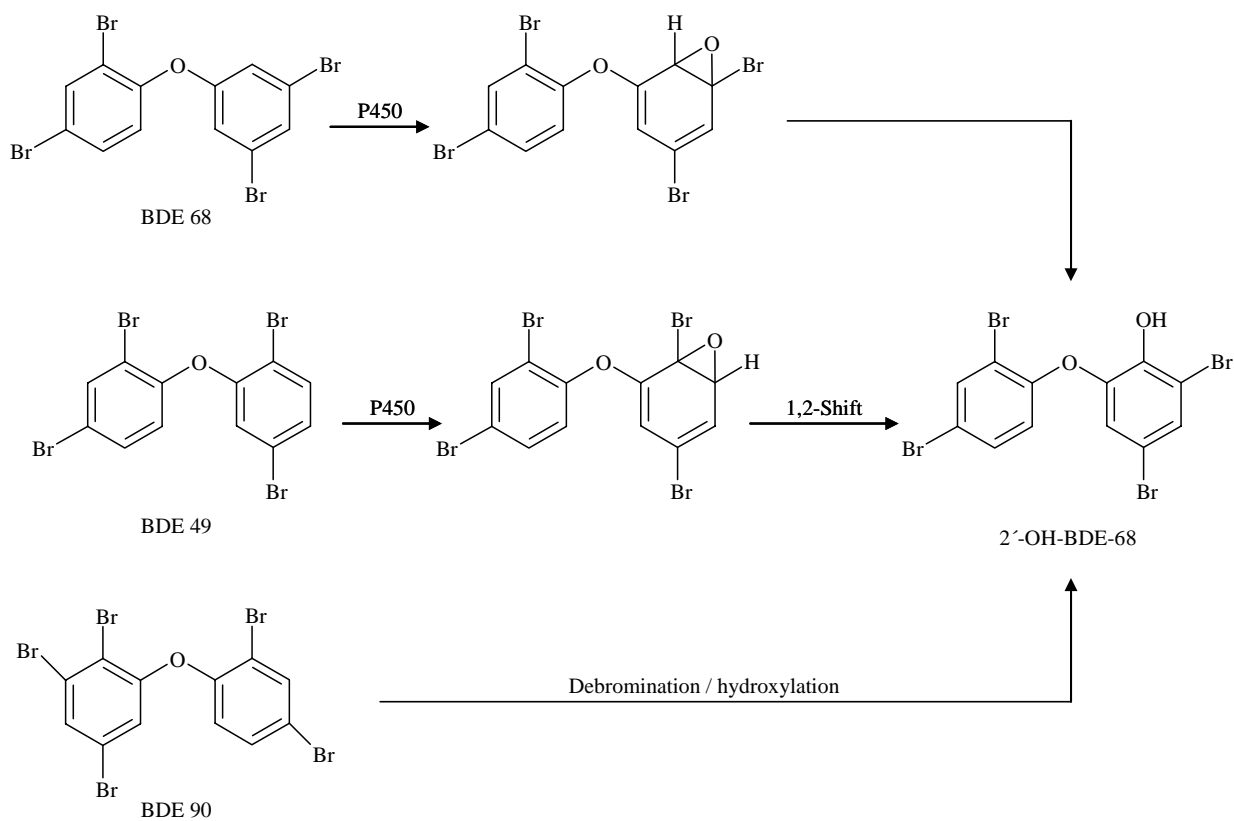
°C. The initial oven temperature was set at 110 °C with a 1 min hold time, ramped at 20 °C/min to 170 °C, and then at 20 °C/min to 300 °C and held for 15 min. Chromatographic separation of PBDEs was carried out in the same instrument but with a shorter column (15 m DB-5-MS, 0.25 mm i.d. x 0.10 µm film thickness; J&W Scientific). Split/ splitless injections of 1 µL were made onto an injector set isothermally at 280 °C. The initial oven temperature was set at 100 °C with a 2 min hold time, ramped at 25 °C/min to 250 °C, then at 1.5 °C/min to 260 °C, and finally at 25 °C/min to 325 °C and held for 10 min. Transfer line and source temperatures were set to 280 °C and 250 °C, respectively for PBDE, MeO-PBDEs and OH-PBDEs analysis.

For MeO-PBDEs and methylated OH-PBDEs, peaks which matched the retention times and isotopic ratio with authentic MeO-PBDE standards were quantified as “identified” MeO- or OH-PBDEs”, while peaks that matched only the isotopic ratio were quantified as “unidentified” using an average response factor of same homologue group.

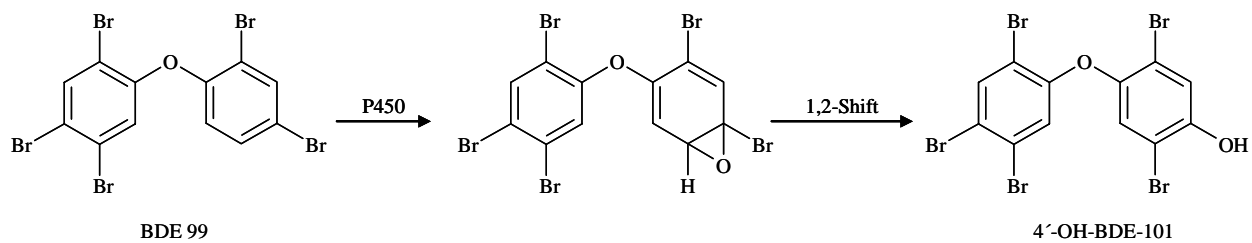
## REFERENCES

- Athanasiadou, M., Cuadra, S.N., Marsh, G., Bergman, A., Jakobsson, K., 2008. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and bioaccumulative hydroxylated PBDE metabolites in young humans from Managua, Nicaragua. *Environ. Health Perspect.* 116, 400-408.
- Berger, U., Herzke, D., Sandanger, T.M., 2004. Two trace analytical methods for determination of hydroxylated PCBs and other halogenated phenolic compounds in eggs from Norwegian birds of prey. *Anal. Chem* 76, 441-452.
- Fieser, L.F. and Fieser, M., 1967. *Reagents for organic Synthesis.* John Wiley and Sons
- Hovander, L., Athanasiadou, M., Asplund, L., Jensen, S., Wehler, E.K., 2000. Extraction and cleanup methods for analysis of phenolic and neutral organohalogenes in plasma. *J. Anal. Toxicol.* 24, 696-703.





**Fig. S1.** Proposed pathways to obtain 2'-OH-BDE-68.



**Fig S2.** Proposed pathway to obtain 4'-OH-BDE-101 from BDE-99.

**Table S1.** Average biological characteristics of the fish collected, amount extracted and lipid percentage of the pooled samples. Mean values were obtained for the pooled samples.

SampleE	Location	Sex	Fork Length (cm)	Total Weight (g)	Gonad Weight (g)	GSI (Gonad wt/totalwt)x100	Liver weight (g)	LSI (Live rwt/totalwt)x100	Age (years)	Pool sample (g)	Lipid (%)
Frenchman's Bay											
1		Female	30.11	365.71	4.57	1.24	9.24	2.49	6,6	2.434	1.76
2			30.83	401.50	4.68	1.16	10.43	2.59	6,8	2.167	1.91
3			32.95	531.50	7.03	1.29	13.57	2.55	6,0	2.647	1.60
4		Male	32.05	470.38	0.73	0.15	10.86	2.32	6,5	2.858	1.43
5			32.45	490.67	0.77	0.15	10.80	2.21	6,2	2.729	0.99
6			35.50	546.00	0.92	0.16	13.05	2.36	6,5	2.613	1.16
Toronto Island											
7		Female	30.56	430.00	6.48	1.36	10.02	2.35	7,5	2.205	1.14
8			32.18	436.75	3.86	0.92	8.33	2.15	7,3	2.769	1.01
9			33.72	552.00	5.32	0.99	12.41	2.27	6,4	2.991	0.70
10			34.08	581.40	7.98	1.33	14.03	2.42	6,3	2.666	0.71
11		Male	31.90	444.57	0.60	0.14	8.75	2.18	7,3	2.945	0.64
12			33.74	552.20	0.68	0.13	10.71	2.02	7,2	2.803	1.09
13			35.93	645.14	0.71	0.11	11.01	1.72	6,1	3.38	0.92
Tommy Thompson											
14		Female	26.24	230.77	3.51	1.51	6.39	2.76	7,4	2.685	1.44
15			26.73	260.15	3.99	1.50	8.11	3.11	7,3	2.82	1.39
16			28.57	325.83	5.01	1.59	10.60	3.10	7,8	3.012	2.33
17		Male	26.63	276.97	0.36	0.13	7.52	2.71	7,8	2.463	1.46
18			27.50	273.87	0.39	0.14	7.17	2.63	7,7	2.438	1.11
19			29.73	387.23	0.45	0.12	9.88	2.61	7,4	3.101	1.04

**Table S2.** Concentration of PBDEs in pooled blood plasma (ng/g w.w.).

SAMPLE	Location	Sex	BDE-47	BDE-100	BDE-99	BDE-153	BDE-154	BDE-183	Total PBDEs	Total OH-PBDES/ Total PBDEs
1	F Bay	F	1.36	0.56	1.38	0.26	0.20	0.03	3.78	nd
2			1.76	0.60	1.45	0.30	0.21	0.04	4.34	0.13
3			3.00	0.98	1.15	0.51	0.36	0.02	6.02	0.02
4		M	2.40	0.71	1.72	0.30	0.12	0.01	5.27	0.04
5			2.24	0.80	2.05	0.40	0.34	0.03	5.87	0.03
6			2.50	0.84	1.86	0.40	0.35	0.03	5.97	0.05
7	T Island	F	1.55	0.66	1.56	0.22	0.16	0.02	4.16	0.08
8			1.28	0.47	1.16	0.19	0.20	0.04	3.33	0.25
9			1.75	0.74	1.97	0.27	0.22	0.02	4.96	0.67
10			1.47	0.91	2.96	0.55	0.57	0.08	6.53	0.21
11		M	2.01	1.26	3.28	1.03	1.30	0.15	9.02	0.17
12			1.10	0.57	1.53	0.27	0.31	0.06	3.85	0.16
13			1.58	0.57	1.66	0.29	0.26	0.03	4.39	0.21
14	T Thomp	F	2.28	0.53	1.90	0.20	0.20	0.03	5.15	0.41
15			1.58	0.35	1.39	0.16	0.17	0.03	3.69	0.97
16			2.50	0.44	1.84	0.29	0.30	0.04	5.40	0.16
17		M	2.06	0.28	1.53	0.15	0.15	0.04	4.20	0.19
18			2.50	0.48	1.59	0.20	0.22	0.06	5.05	0.09
19			1.81	0.49	1.80	0.24	0.25	0.03	4.63	0.30

nd: not detecte

<b>Table S3. Concentration of OH-PBDEs in pooled blood plasma.</b>																			
Sample	Location	Sex	Identified OH-PBDEs pg/g w.w.							Unidentified OH-PBDEs pg/g w.w. <sup>a</sup>						Total Identified OH-PBDEs (ng/g ww)	Total Unidentified OH-PBDEs (ng/g ww)	Total OH-PBDEs <sup>b</sup> (ng/g ww)	Total Ident/ Total MeO-PBDEs <sup>c</sup>
			Tri		Tetra			Penta		Tri	Tetra	Penta	Hexa						
			2'- OH- BDE-28	4'- OH- BDE-17	2'-OH- BDE-68	6- OH- BDE-47	5- OH- BDE-47	4'- OH- BDE-49	4- OH- BDE-42					4'- OH- BDE-101					
1	F Bay	F	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	na		
2			nd	nd	nd	150	nd	355	nd	nd	nd	42.7 (1)	nd	nd	0.51	0.04	0.92		
3			nd	1.82	nd	10.6	nd	70.0	9.90	30.1	0.75 (1)	13.6 (1)	nd	nd	0.12	0.01	0.90		
4		M	nd	nd	nd	22.7	10.7	97.4	7.84	58.9	nd	22.2 (2)	nd	nd	0.20	0.02	0.90		
5			nd	nd	nd	13.7	nd	105	nd	24.9	nd	21.1 (1)	nd	nd	0.14	0.02	0.87		
6			nd	nd	nd	19.3	nd	146	17.7	63.7	nd	28.6 (1)	nd	nd	0.25	0.03	0.90		
7	T Island	F	6.17	8.90	nd	179	nd	59.8	8.90	45.2	nd	18.4 (2)	nd	nd	0.31	0.02	0.94		
8			nd	11.7	nd	573	nd	146	nd	59.1	30.4 (2)	13.4 (1)	nd	nd	0.79	0.04	0.95		
9			nd	36.6	21.4	2549	nd	495	nd	nd	137 (2)	100 (1)	nd	nd	3.10	0.24	0.93		
10			nd	nd	nd	912	nd	483	nd	nd	1.52 (1)	1.62 (1)	nd	nd	1.40	0.00	1.00		
11		M	6.10	14.1	12.8	832	nd	133	26.4	138	19.0 (1)	88.6 (3)	211 (3)	28.7 (1)	1.16	0.35	0.77		
12			nd	nd	21.7	306	nd	66.4	11.1	50.5	5.00 (1)	29.4 (2)	118 (1)	nd	0.46	0.15	0.75		
13			15.6	nd	33.9	488	nd	268	10.7	21.3	54.8 (2)	26.3 (2)	nd	nd	0.84	0.08	0.91		
14	T Thomp	F	22.0	nd	nd	1542	nd	429	nd	nd	73.6 (1)	33.3 (1)	nd	nd	1.99	0.11	0.95		
15			19.8	72.8	52.5	2767	nd	453	nd	nd	106 (1)	107 (2)	nd	nd	3.37	0.21	0.94		
16			9.50	19.9	13.9	580	nd	105	nd	36.7	22.6 (1)	30.4 (2)	69.2 (1)	nd	0.77	0.12	0.86		
17		M	nd	17.4	17.4	537	11.1	108	nd	22.2	29.5 (2)	22.6 (2)	22.0 (1)	nd	0.71	0.07	0.91		
18			5.66	6.35	9.35	264	nd	55.4	5.16	27.7	16.2 (2)	10.0 (1)	28.7 (1)	nd	0.37	0.05	0.87		
19			9.96	48.5	20.2	864	nd	315	nd	27.8	75.5 (2)	24.8 (1)	nd	nd	1.29	0.10	0.93		

nd: Not detected; na: No data available.

<sup>a</sup> number of peaks detected in brackets.

<sup>b</sup> Total OH-PBDEs sum of identified and unidentified OH-PBDEs.

<sup>c</sup> Total Ident/Total MeP-PBDEs: ratio between Total Identified OH-PBDEs to Total OH-PBDEs.

**Table S4.** Concentration of MeO-PBDEs in pooled blood plasma.

SAMPLE	Location	Sex	Identified MeO-PBDEs (pg/g w.w.)					Unidentified MeO-PBDEs (pg/g w.w. <sup>a</sup> )			Total Identified MeO-PBDEs (ng/g ww)	Total Unidentified MeO-PBDEs (ng/g ww)	Total MeO-PBDEs <sup>b</sup> (ng/g ww)	Total Ident/Total OH-PBDEs <sup>c</sup>
			Tri		Tetra		Penta	Di	Tetra					
			2'- MeO- BDE-28	4'- MeO- BDE-17	2'-MeO- BDE-68	6- MeO- BDE-47	4'- MeO- BDE-103							
1	F Bay	F	nd	nd	4.17	7.01	nd	nd	nd	0.01	nd	0.01	1.00	
2			nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	na	
3			nd	nd	nd	6.56	nd	nd	nd	0.01	nd	0.01	1.00	
4		M	2.87	nd	nd	13.8	nd	nd	nd	0.02	nd	0.02	1.00	
5			nd	nd	nd	7.83	nd	nd	nd	0.01	nd	0.01	1.00	
6			nd	1.07	1.47	5.21	nd	nd	nd	0.01	nd	0.01	1.00	
7	T Island	F	nd	nd	16.6	24.6	nd	nd	nd	0.04	nd	0.04	1.00	
8			nd	nd	15.5	17.4	nd	nd	nd	0.03	nd	0.03	1.00	
9			nd	nd	21.1	76.0	nd	nd	nd	0.10	nd	0.10	1.00	
10			nd	nd	1.69	6.55	nd	nd	nd	0.01	nd	0.01	1.00	
11		M	nd	nd	7.39	17.8	2.5	6.18 (1)	9.34 (2)	0.03	0.02	0.04	0.64	
12			nd	nd	nd	19.1	nd	nd	nd	0.02	nd	0.02	1.00	
13			nd	nd	nd	33.2	nd	nd	nd	0.03	nd	0.03	1.00	
14	T Thomp	F	nd	nd	nd	55.2	nd	nd	nd	0.06	nd	0.06	1.00	
15			nd	nd	8.14	19.0	nd	nd	nd	0.03	nd	0.03	1.00	
16			nd	nd	3.60	9.00	nd	nd	nd	0.01	nd	0.01	1.00	
17		M	nd	nd	nd	11.3	nd	nd	nd	0.01	nd	0.01	1.00	
18			nd	nd	nd	89.3	nd	nd	nd	0.09	nd	0.09	1.00	
19			nd	nd	1.91	6.0	nd	nd	nd	0.01	nd	0.01	1.00	

nd: Not detected; na: Not data available.

<sup>a</sup> number of peaks detected in brackets.

<sup>b</sup> Total MeO-PBDEs sum of identified and unidentified MeO-PBDEs.

<sup>c</sup> Total Ident/Total: ratio between Total Identified MeO-PBDEs to Total MeO-PBDEs.

**Table S5.** Pearson correlation matrix for biological characteristics and total MeO-PBDEs, OH-PBDEs and PBDEs.

	Age	Fork length	Total weight	Liver weight	Gonad weight	Lipid (%)	PBDEs	OH-PBDEs	MeO-PBDEs
Age	1.000								
Fork length	-0.749(**)	1.000							
Total weight	-0.760(**)	0.980(**)	1.000						
Liver weight	-0.738(**)	0.789(**)	0.818(**)	1.000					
Gonad weight	-0.207	0.034	0.082	0.387	1.000				
Lipid (%)	0.234	-0.463(*)	-0.486(*)	-0.141	0.219	1.000			
PBDEs	-0.479(*)	0.355	0.335	0.435	0.142	-0.211	1.000		
OH-PBDEs	0.522(*)	-0.238	-0.191	-0.152	0.202	-0.262	-0.086	1.000	
MeO-PBDEs	0.199	-0.151	-0.143	-0.321	-0.011	-0.376	-0.069	0.454(*)	1.000

**Table S6.** Pearson correlation matrix for MeO-PBDE, OH-PBDE and PBDE congeners. Compounds detected in one sample have been excluded in the statistical analysis. Congeners with concentrations below MDLs were replaced as ½ MDLs.

	BDE47	BDE100	BDE99	BDE153	BDE154	BDE183	2'-OH BDE28	4'-OH BDE17	2'-OH BDE68	6-OH BDE47	5-OH BDE47	4'-OH BDE49	4-OH BDE42	4'-OH BDE101	2'-MeO BDE68	6-MeO BDE47
BDE47	1.000															
BDE100	0.245	1.000														
BDE99	0.012	0.647(**)	1.000													
BDE153	0.191	0.903(**)	0.766(**)	1.000												
BDE154	0.057	0.771(**)	0.810(**)	0.954(**)	1.000											
BDE183	-0.132	0.502(*)	0.743(**)	0.768(**)	0.901(**)	1.000										
2'-OH BDE28	-0.001	-0.086	0.126	0.062	0.142	0.123	1.000									
4'-OH BDE17	-0.162	-0.346	-0.072	-0.216	-0.091	-0.077	0.111	1.000								
2'-OH BDE68	-0.303	-0.274	-0.048	-0.134	-0.007	0.031	0.385	0.717(**)	1.000							
6-OH BDE47	-0.226	-0.183	0.156	-0.131	-0.006	0.016	-0.085	0.759(**)	0.646(**)	1.000						
5-OH BDE47	0.203	-0.227	-0.101	-0.182	-0.236	-0.186	-0.211	-0.065	-0.235	-0.165	1.000					
4'-OH BDE49	-0.227	-0.048	0.277	-0.066	-0.026	-0.026	-0.075	0.444	0.392	0.773(**)	-0.218	1.000				
4-OH BDE42	0.185	0.663(**)	0.379	0.688(**)	0.668(**)	0.522(*)	0.222	-0.268	0.018	-0.282	-0.062	-0.362	1.000			
4'-OH BDE101	0.142	0.524(*)	0.389	0.641(**)	0.676(**)	0.589(**)	0.191	-0.153	-0.113	-0.307	0.087	-0.289	0.819(**)	1.000		
2'-MeO BDE68	-0.342	0.052	0.019	-0.047	0.014	-0.031	-0.027	0.416	0.174	0.398	-0.217	0.231	-0.032	0.124	1.000	
6-MeO BDE47	0.086	-0.144	-0.002	-0.236	-0.142	-0.013	0.118	0.086	0.203	0.408	-0.141	0.205	-0.062	-0.167	0.305	1.000

\*\* significant correlation (p < 0.01); \* significant correlation (p < 0.05)



## **CAPÍTULO 5.- DISCUSIÓN**

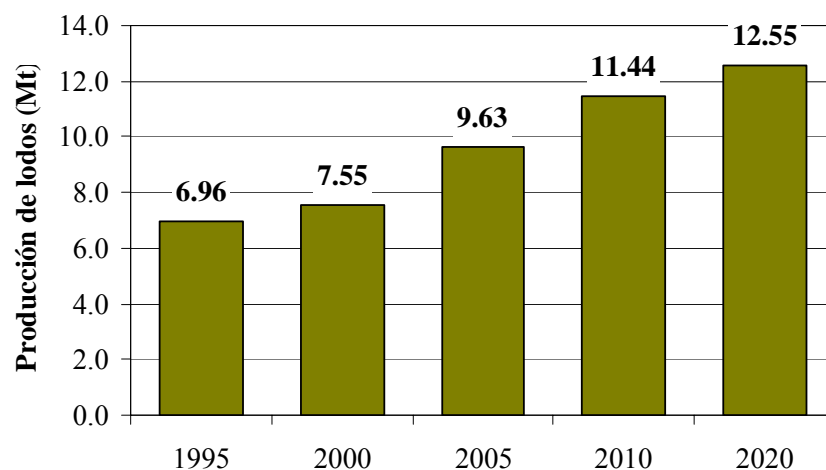




## CAPÍTULO 5.- Discusión

### 5.1.- Retardantes de llama en lodos de EDAR Españoles

Desde 1995 a 2009 la población equivalente que dispone de instalación de tratamiento de aguas residuales ha pasado del 41 % al 95 %, en España (OSE, 2010). Este aumento se debe en gran medida a la implementación de la Directiva 91/271/CEE (transpuesta a la normativa española por el R.D. Ley 11/1995, el R.D. 509/1996 y el R.D. 2113/1998) que establece la obligación de que las aglomeraciones urbanas con más de 2000 habitantes equivalentes dispongan de sistemas colectores para la recogida y conducción de las aguas residuales y prevé distintos tratamientos a los que deberán someterse dichas aguas antes de su vertido a las aguas continentales o marinas. Por habitante equivalente (h.e.) se entiende la carga orgánica biodegradable con una demanda bioquímica de oxígeno de 5 días ( $DBO_5$ ) de 60 g de oxígeno por día (MMA, 2000). Esta carga contaminante, o población equivalente a depurar en las aglomeraciones urbanas, viene determinada por: la población de hecho, la población estacional (que genera un incremento de los caudales y de la carga contaminante a tratar en zonas con elevado componente turístico y que tiene gran importancia en España) y la contaminación de origen industrial conectada al saneamiento urbano (Directiva 91/271/CEE). Según el indicador referente a la depuración de aguas residuales urbanas, del Banco Público de Indicadores Ambientales del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, la población equivalente total a mediados de 2006 era de 73.3 millones de h.e. (MARM, 2009b), para una población total de 44.7 millones de habitantes (INE, 2006), por tanto puede decirse que por cada habitante existen aproximadamente 1.64 habitantes equivalentes.

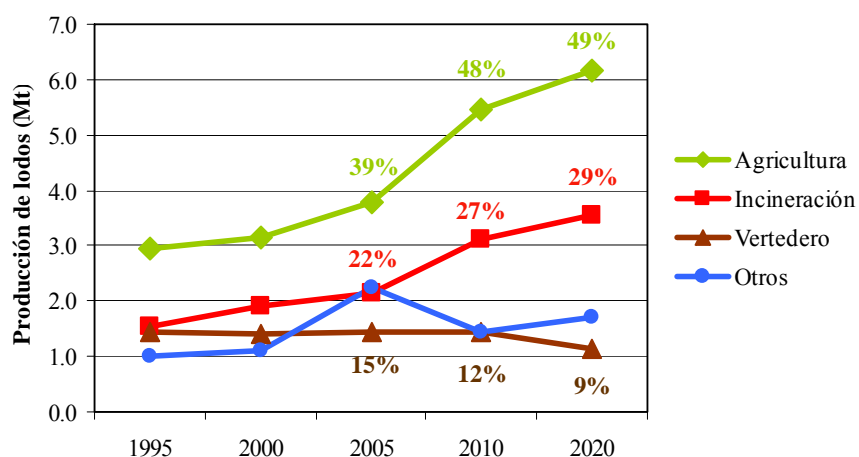


**Figura 5.1.** Evolución de la producción de lodos en la Unión Europea (Mileu et al., 2010a).

El principal subproducto de los tratamientos de aguas residuales es el lodo de depuradora, el cual constituye un residuo que debe ser convenientemente gestionado. La producción de lodos ha sufrido un aumento continuado en la Unión Europea, ver figura 5.1, sin

embargo, esta tendencia está influenciada por comportamientos locales que se deben estudiar de manera separada. Países como Holanda, Alemania y Austria han estabilizado o incluso disminuido su producción de lodos, principalmente debido a un menor consumo de agua y un aumento en el tratamiento del lodo. En el otro extremo se sitúan los nuevos Estados Miembros (10 en 2004 y 2 en 2007), países donde los porcentajes de población conectada a las depuradoras son aún muy bajos (65 % en Polonia y Hungría, 40 % en Rumania y Bulgaria, 30 % en Eslovenia y 10 % en Malta (EEA, 2009; Mileu et al., 2010b)). Estos nuevos países deberán cumplir la Directiva 91/271/CEE antes de 2015 (2019 en el caso de Rumania) lo que hace prever un aumento en la producción total de lodos de la Unión Europea.

Existen principalmente 3 rutas para la gestión de los lodos: aplicación agrícola, incineración y enterramiento en vertedero. En la figura 5.2 se muestra el porcentaje de utilización de estas técnicas en la Unión Europea desde 1995 a 2020.



**Figura 5.2.** Evolución temporal de las principales rutas de gestión de los lodos de depuradora en la Unión Europea (Mileu et al., 2010a). Millones de toneladas y porcentajes del total anual.

Como se puede apreciar en la figura, se espera una disminución en la cantidad de lodos dispuestos en vertedero debido a: i) políticas restrictivas relativas a la cantidad de residuos orgánicos que se disponen en estas instalaciones y ii) rechazo social relativo a esta práctica (Mileu et al., 2010a).

La incineración supone la principal alternativa a la aplicación agrícola, especialmente en aquellos países que no disponen de tierra adecuada para el reciclaje de los lodos (el 90 % y 100 % de los lodos que se generan en Bélgica y los Países Bajos son incinerados) (Mileu et al., 2010b).

La aplicación agrícola de los lodos supone la mayor ruta de gestión de este residuo en Europa (~ 50% de los lodos generados) y es de especial importancia en países como España, donde la mayor parte de los suelos resultan muy indicados para esta práctica (el 50 % de los suelos españoles presenta un contenido en materia orgánica inferior al 1.7 % (López y Grau,

2005). En el año 2006 alrededor del 65 % de los lodos generados en España se destinaron a los suelos agrícolas (PNLD-I, 2001) y se espera que este porcentaje aumente hasta un 70 % en 2010 (Mileu et al., 2010b).

Aunque los lodos son ricos en nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo, lo que sugiere su uso como fertilizante en la agricultura, también pueden contener contaminantes potenciales como metales pesados, organismos patógenos o compuestos orgánicos. La aplicación agrícola de los lodos de depuradora está regulada en Europa bajo la Directiva 86/278/CEE, incorporada a la legislación española mediante el Real Decreto 1310/1990. Esta directiva regula el uso de los lodos de depuradora en la agricultura, de tal forma que se eviten efectos nocivos en los suelos, la vegetación, los animales y los seres humanos. La directiva se basa en el conocimiento disponible en ese momento (1986) e incluye valores límite de concentración de metales pesados (cadmio, cobre, níquel, plomo, zinc, mercurio y cromo), pero no regula la presencia de nuevos contaminantes orgánicos. Por este motivo, en el año 2000 la Unión Europea presentó el tercer documento de trabajo (Working Document on Sludge 3<sup>rd</sup> Draft; Directorado General para el Medio Ambiente de la Comisión Europea) de la futura directiva sobre la utilización de lodos en la agricultura, en el que se incluyen niveles máximos de concentración en lodos para policlorodibenzo-p-dioxinas y furanos (PCDD/F) y policlorobifenilos (PCB). Sin embargo, estos valores suponen un argumento de controversia entre países (Aparicio et al., 2009), algunos de los cuales incluso han realizado estudios sobre nuevos contaminantes cuya presencia en los lodos debería ser considerada para su correcta gestión.

En el año 2005 se inició en España un programa de caracterización de lodos de depuradora, que fue diseñado y elaborado por el Ministerio de Medio Ambiente en colaboración con las Comunidades Autónomas y la Asociación Española de Saneamiento. La coordinación del estudio se llevó a cabo por el Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas (CEDEX), pero las determinaciones analíticas se realizaron en el CEDEX, en el Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) y en el Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA) (MARM, 2009a). Las muestras de las cuales derivan los resultados que se recogen a continuación se obtuvieron durante la realización de este proyecto (Investigación de los lodos obtenidos de estaciones de depuración de aguas residuales urbanas, nº 44-403-1-096).

Para el estudio específico de retardantes de llama, más de 100 lodos de depuradora se recogieron a lo largo de cuatro campañas de muestreo (una por estación) desde octubre de 2005 a septiembre de 2006, en 31 estaciones de depuración de aguas residuales (EDAR) urbanas de diferente tamaño (habitantes equivalentes) y distintas tasas de producción de lodos. La selección de las plantas se realizó tratando de cubrir todas las diferencias climáticas y actividades antropogénicas posibles de la España peninsular. Las características específicas de las EDAR evaluadas y la localización de las mismas se recogen en la tabla 5.1. y la figura 5.3.

**Tabla 5.1.** Características de las EDAR evaluadas.

EDAR	Capacidad (Habitantes equivalentes)	Producción (Toneladas m.s./ año)	Influyente <sup>a</sup> (% Industrial)	Tipo de industria	Línea de aguas <sup>b</sup>	Línea de fangos <sup>c</sup> Tiempo Temperatura
						(días) (°C)
1	188610	4149	n.r.		A	20 35
2	195000	3000	n.r.		A	20 36
3	400000	4500	n.r.		A	26 36
4	280000	2569	n.r.		A	13 38
5	143324	3838	n.r.		A	30 35
6	288000	50512	n.r.		A	15 35
7	620000	18300	n.r.		A	35 37
8	575000	47450	n.r.		A	27 37
9	562500	7686	n.r.		A	14 33
10	950000	12867	n.r.		A	22 37
11	1000000	17949	n.r.		A	20 35
12	1314831	12960	n.r.		A	22 35
13	105851	3910	n.r.		A	Estabilización química
14	116000	3709	15		A	21 36
15	80000	2510	16	Metalúrgica y automovilística	A	28 36
16	622673	8108	20	Alimentario y automovilístico	A	20 37
17	228000	4216	20	Textiles y tratamiento de superficies	A	22 35
18	225000	2500	20	Textiles	A	35 38
19	320000	3147	35	Talleres mecánicos, pinturas y fábricas de muebles	A	23 35
20	165000	2800	40		A	20 35
21	700000	16719	n.r.		B	Sin estabilización
22	570000	8166	n.r.		B	24 36
23	590000	32872	n.r.		B	27 35
24	852961	24005	4		B	25 35
25	259125	17184	8		B	Sin estabilización
26	195323	1560	10	Industrias lácteas y bodegas	B	19 37
27	466560	2680	10	Bodegas y tratado de lanas	B	21 35
28	382249	12184	10	Levaduras	B	Sin estabilización
29	350000	6600	20		B	21 35
30	650000	8000	25	Mataderos y agroalimentarias	B	20 36
31	456304	8639	51	Circuitos impresos y Talleres mecánicos	B	Estabilización química

n.r.= no reconocido.

<sup>a</sup>Datos descritos por la EDAR. Porcentaje de origen industrial en el influente de la planta e industria a la que se atribuye.

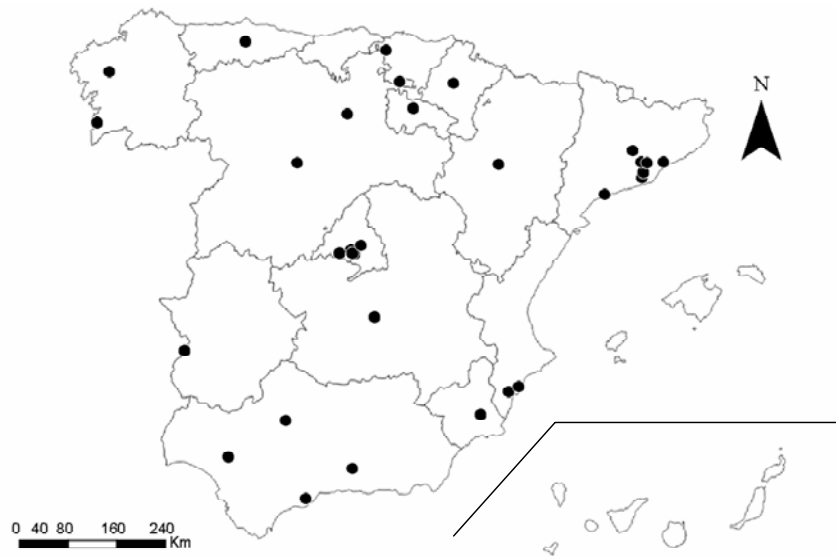
<sup>b</sup>Línea de aguas: A) tratamiento aeróbico, B) eliminación biológica de N y P (anaeróbico + anóxico + aeróbico).

<sup>c</sup>Línea de lodos: Las muestras 21, 25 y 28 no presentan estabilización, las muestras 13 y 31 se trataron químicamente y el resto fueron anaeróbicamente estabilizadas bajo condiciones mesofílicas ( 23 días y 36°C; media aritmética).

Todas las depuradoras realizaban un tratamiento secundario aeróbico convencional en la línea de aguas, el cual se ve complementado en las plantas 21 a 31 (n=11) con la eliminación de nutrientes N y P. Este tratamiento se desarrolla en tres etapas: una anaeróbica, seguida de otra anóxica y finalmente una etapa aeróbica. Los lodos obtenidos en la línea de aguas fueron tratados químicamente (plantas 13 y 31; n = 2), no estabilizados (plantas 21, 25 y 28; n= 3) o estabilizados mediante digestión anaeróbica mesofílica (n = 26). Aunque las plantas evaluadas se consideran urbanas, algunas de ellas reconocieron un aporte de efluentes de procedencia industrial en su influente.

La muestra total se considera representativa por dos motivos: i) el total de habitantes equivalentes relativos a las 31 plantas estudiadas (1.38 millones h.e.) supone el 19 % del total de España a mediados de 2006 y ii) la tasa total de producción de lodos de las plantas evaluadas (0.34 millones de toneladas) representa el 32 % y 34 % de la producción total de España en 2005 y 2006 (MARM, 2009a; Mileu et al., 2010 a y b), respectivamente.

Las muestras resultantes de los tratamientos consecutivos de la línea de aguas y lodos fueron recogidas por el personal de las plantas en botellas de vidrio ámbar para preservarlas de la luz, humedad u otros factores externos que pudiesen modificar su composición química. Una vez en el laboratorio, las muestras se secaron en estufa a 40 °C, para evitar la pérdida de compuestos volátiles hasta alcanzar pesada constante, después se molieron para obtener una consistencia pulverulenta y posteriormente se congelaron a -18 °C hasta el momento de su análisis.



**Figura 5.3.** Situación geográfica de las EDAR evaluadas.

La primera aproximación al contenido en retardantes de llama de los lodos de depuradora se centró en el análisis de PBDE. Se analizaron un total de 120 muestras obtenidas en las cuatro campañas (coincidiendo con las estaciones), procedentes de 31 EDAR (las muestras de las EDAR 5 y 15, correspondientes primer periodo y a las EDAR 21 y 31 del último periodo, no se recibieron en el laboratorio por problemas durante la etapa de muestreo a

cargo del personal de las estaciones depuradoras). Una vez estudiada la presencia de PBDE en estas muestras se eligió una campaña (muestras tomadas entre abril y junio de 2006), para evaluar la presencia de retardantes de llama emergentes.

### **5.1.1.- Análisis de retardantes de llama en lodos de EDAR**

En la tabla 5.2 se muestran, de manera detallada, las condiciones en las que se realizan las etapas de extracción, purificación y/o fraccionamiento y el posterior análisis instrumental de los lodos de depuradora.

#### **Extracción:**

En todos los casos se realizó una extracción mediante fluidos presurizados (PFE) en un equipo ASE 100 (Dionex), utilizando una mezcla de hexano : diclorometano (1:1 v/v) como disolvente de extracción, 10.34 MPa y 100 °C durante tres ciclos estáticos de 10 min cada uno. Cuando se usaron patrones de recuperación éstos se añadieron sobre 0.5 g de muestra (previamente secada en estufa a 40 °C hasta alcanzar pesada constante), que se mezclaron y homogenizaron con 2.5 g de sulfato sódico anhidro y 0.5 g de cobre, este último para eliminar el azufre elemental presente en la muestra. La mezcla obtenida se introdujo en una celda de 11 mL, previamente preparada con un filtro de celulosa y 2.5 g de sulfato sódico anhidro. Antes de la purificación se realizó un cambio de disolvente a hexano.

#### **Purificación:**

La purificación se realizó en dos pasos: i) tratamiento ácido (todos los analitos) y ii) cromatografía de adsorción sólido-líquido en columna a presión atmosférica (análisis de DP) y cromatografía de adsorción sólido-líquido en columna a presión de manera automatizada (resto de compuestos analizados).

#### **Tratamiento ácido**

Como una primera etapa de purificación, al extracto en hexano (100 mL) se le añaden 50 mL de ácido sulfúrico concentrado (95 % a 97 %) de forma que se carbonice la materia orgánica, lípidos e incluso proteínas que pueda presentar. La fase orgánica se recoge y concentra (1 - 2 mL) y posteriormente es sometida a una segunda etapa de purificación.

#### **Cromatografía de adsorción sólido-líquido en columna a presión atmosférica**

La columna cromatográfica, preparada con 2 g de sílice neutra (acondicionada a 140 °C durante 12 h) seguidos de 2 g de sílice ácida (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 44% en peso) y 1 g de sulfato sódico anhidro), se eluye primero con 5 mL de hexano que se descartan y posteriormente con 90 mL de hexano que se recogen en un matraz.

**Tabla 5.2.** Condiciones de extracción, purificación y/o fraccionamiento y análisis instrumental de los lodos de depuradora.

	EXTRACCIÓN	PURIFICACIÓN Y/O FRACCIONAMIENTO	ANÁLISIS INSTRUMENTAL	CUANTIFICACIÓN
PBDE (4.1., Capítulo 4)	<p><b>ASE 100</b></p> <p><u>Disolvente:</u> hexano : diclorometano (1:1 v/v) <u>Temperatura:</u> 100 °C <u>Presión:</u> 10.34 MPa <u>Ciclos:</u> 3 (10 min), 90 % volumen de descarga</p> <p><u>Preparación de la celda:</u> Filtro + 2.5 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro + (0.5 g muestra + 2.5 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro + 0.5 g Cu)</p>	<p>1) Tratamiento ácido: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado</p> <p>2) Power Prep™ System: columnas de sílice, alúmina y carbón</p>	<p><b>HRGC:</b> Agilent 6890 GC <u>Gas portador:</u> He <u>Flujo volumétrico:</u> 1 ml/min constante <u>Columna:</u> DB -5-MS (15 m; 0.25 mm d.i. y 0.10 µm espesor fase estacionaria) <u>Inyector:</u> Pulso 0.21 MPa, sin división de flujo (Split/Splitless) y 280 °C (temperatura). <u>Volumen de inyección:</u> 1 µL <u>Horno:</u> 140 °C (1 min), 20 °C/min hasta 310 °C (5 min)</p> <p><b>LRMS:</b> Agilent 5973MSD (EI) <u>Línea de transferencia:</u> 280 °C Fuente: 230 °C <u>Cuadrupolo:</u> 150 °C</p>	<p>Patrón Interno (dilución isotópica)</p> <p><u>Patrón de extracción:</u> MBDE-MXE (Wellington Laboratories)</p> <p><u>Patrón de inyección:</u> BDE-CVS-EISS <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-BDE-138 (Wellington Laboratories)</p> <p><u>Recta de calibrado:</u> BDE-CVS-E (Wellington Laboratories)</p>
DBDPE (4.2., Capítulo 4)	<p><b>ASE 100</b></p> <p><u>Disolvente:</u> hexano : diclorometano (1:1 v/v) <u>Temperatura:</u> 100 °C <u>Presión:</u> 10.34 MPa <u>Ciclos:</u> 3 (10 min), 90 % volumen de descarga</p> <p><u>Preparación de la celda:</u> Filtro + 2.5 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro + (0.5 g muestra + 2.0 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro + 0.5 g Cu)</p>	<p>1) Tratamiento ácido: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado</p> <p>2) Power Prep™ System: columnas de sílice, alúmina y carbón</p>	<p><b>HRGC:</b> Varian CP-3800 GC <u>Gas portador:</u> He <u>Flujo volumétrico:</u> 1 ml/min constante <u>Columna:</u> DB -5-MS (15 m; 0.25 mm d.i. y 0.25 µm espesor fase estacionaria) <u>Inyector:</u> Pulso 0.21 MPa, sin división de flujo (Splitless) y 280 °C (temperatura). <u>Volumen de inyección:</u> 1 µL <u>Horno:</u> 140°C (1 min), 20 °C/min hasta 310°C (8 min)</p> <p><b>LRMS:</b> Varian 320MS-TQ (EI) <u>Línea de transferencia:</u> 280 °C Fuente: 300 °C <u>Colector:</u> 42 °C</p>	<p>Patrón Interno (dilución isotópica)</p> <p><u>Patrón de extracción:</u> <sup>13</sup>C<sub>14</sub>-DBDPE (Wellington Laboratories)</p> <p><u>Patrón de inyección:</u> <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-BDE-138 (Wellington Laboratories)</p> <p><u>Recta de calibrado:</u> Preparada a partir de la recta : BDE-CVS-E y los patrones: <sup>13</sup>C<sub>14</sub>-DBDPE y <sup>12</sup>C<sub>14</sub>-DBDPE (Wellington laboratories)</p>

<p>DP (4.3., Capítulo 4)</p>	<p><b>ASE 100</b></p> <p><u>Disolvente:</u> Hexano : diclorometano (1:1 v/v) <u>Temperatura:</u> 100 °C <u>Presión:</u> 10.34 MPa <u>Ciclos:</u> 3 (10 min), 90 % volumen de descarga</p> <p><u>Preparación de la celda:</u> Filtro + 2.5 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro + (0.5 g muestra + 2.5 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro + 0.5 gCu)</p>	<p>1) Tratamiento ácido: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado 2) Columna multicapa: 2 g de sílice neutra (acondicionada a 140 °C durante 12 h) + 2 g sílice (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 44% en peso) + 1 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></p>	<p><b>HRGC:</b> Agilent 6890 GC <u>Gas portador:</u> He <u>Flujo volumétrico:</u> 1 ml/min constante <u>Columna:</u> DB -5-MS (15 m; 0.25 mm d.i. y 0.10 µm espesor fase estacionaria) <u>Inyector:</u> Pulso 0.21 MPa, sin división de flujo (Splitless) y 265 °C (temperatura). <u>Volumen de inyección:</u> 1 µL <u>Horno:</u> 90 °C (1 min), 20 °C/min hasta 300 °C (3 min)</p> <p><b>LRMS:</b> Agilent 5973MSD (ECNI, metano) <u>Línea de transferencia:</u> 300 °C <u>Fuente:</u> 150 °C <u>Cuadrupolo:</u> 150 °C</p>	<p>Patrón externo</p> <p><u>Recta de calibrado:</u> Preparada a partir de los patrones <sup>12</sup>C syn- y anti-DP (Wellington Laboratories)</p>
<p>Dec 602, 603, 604, 1,5-DPMA, Mirex, CP, aCl<sub>10</sub>DP, aCl<sub>11</sub>DP (4.4., Capítulo 4)</p>	<p><b>ASE 100</b></p> <p><u>Disolvente:</u> Hexano : diclorometano (1:1 v/v) <u>Temperatura:</u> 100 °C <u>Presión:</u> 10.34 MPa <u>Ciclos:</u> 3 (10 min), 90 % volumen de descarga</p> <p><u>Preparación de la celda:</u> Filtro + 2.5 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro + (0.5 g muestra + 2.5 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro + g 0.5 Cu)</p>	<p>1) Tratamiento ácido: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado 2) Power Prep™ System: columnas de sílice, alúmina y carbón</p>	<p><b>HRGC:</b> Agilent 6890 GC (flujo constante 1 ml/min) <u>Columna:</u> DB -5-MS (15 m; 0.25 mm d.i. y 0.25 µm espesor fase estacionaria) <u>Inyector:</u> Splitless 280 °C. <u>Volumen de inyección:</u> 1 µL <u>Horno:</u> 120 °C (1 min), 20 °C/min hasta 240 °C, 5 °C/min hasta 275 °C, 40 °C/min hasta 320 (4 min)</p> <p><b>HRMS:</b> Autospec Ultima (EI, resolución &gt; 10000, 10% valle) <u>Línea de transferencia:</u> 280 °C <u>Fuente:</u> 280 °C</p>	<p>Patrón interno</p> <p><u>Patrón de extracción:</u> 10µL MBDE-MXE : <sup>13</sup>C-BDE-47 y -153 (Wellington Laboratories)</p> <p><u>Patrón de inyección:</u> 5µL BDE-CVS-EISS <sup>13</sup>C-BDE-138 (Wellington Laboratories)</p> <p><u>Recta de calibrado:</u> Preparada a partir de los patrones: Dec 602, 603 y 604 (Toronto Research Chemical In); Mirex (Cambridge Isotope Laboratories) 1,5-DPMA, aCl<sub>10</sub>DP, aCl<sub>11</sub>DP, CP, MBDE-MXE, BDE-CVSEISS (Wellington Laboratories);</p>

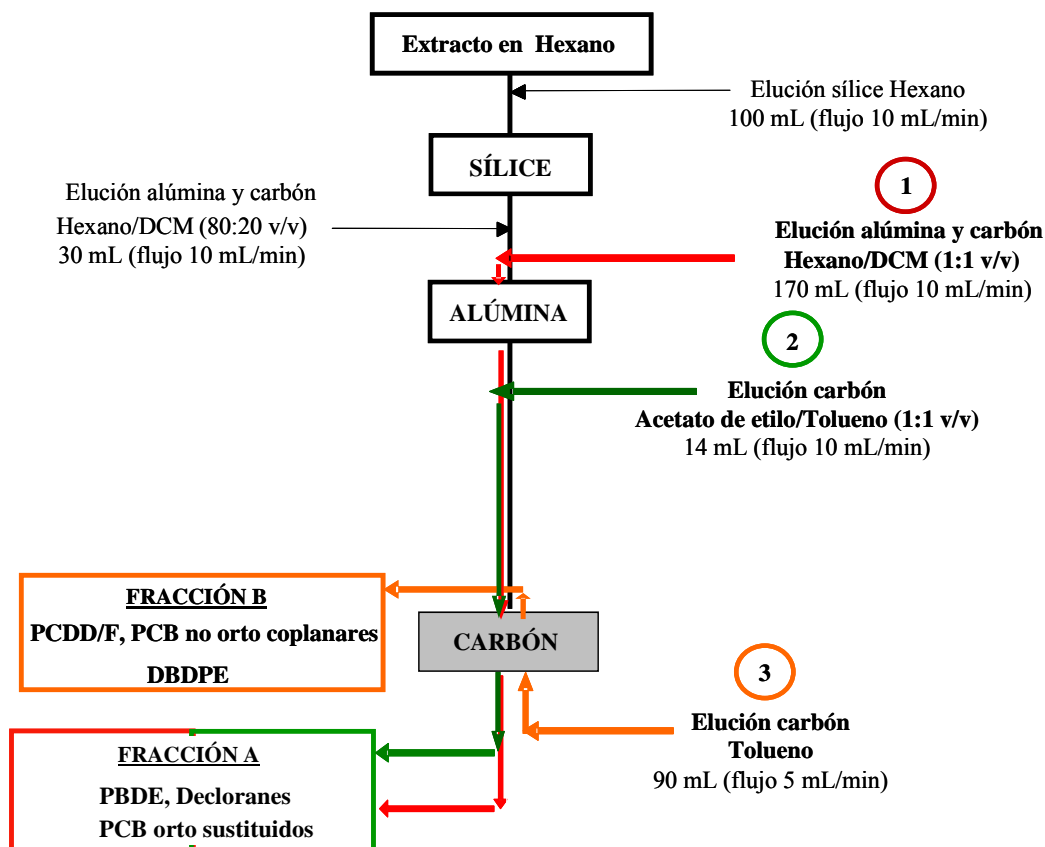


**Purificación automatizada**

En este caso se utilizaron distintas mezclas de disolventes para la separación de los analitos de interés de sus posibles interferentes. Los flujos y volúmenes utilizados se muestran en la figura 5.4. Con este método se consigue además de la purificación, el fraccionamiento del extracto en dos fracciones:

- Fracción A: Elución de la columna de alúmina y carbón con hexano : diclorometano (1:1 v/v) y acetato de etilo : tolueno (1:1 v/v). PBDE, DP, Dec 602, 603, 604, CP, 1,5-DPMA, aCl<sub>10</sub>DP, aCl<sub>11</sub>DP.
- Fracción B: Elución a contra corriente de la columna de carbón, donde quedan retenidos los compuestos más planos. DBDPE.

Las fracciones obtenidas durante esta etapa de purificación automatizada se concentran mediante una combinación de evaporación bajo corriente de nitrógeno y calentamiento por baño de agua (40 °C).



**Figura 5.4.** Diagrama del método de purificación automatizada (Power Prep™ system) utilizado.

### **Análisis Instrumental**

La información detallada sobre el análisis instrumental, métodos cromatográficos y condiciones de los distintos espectrómetros de masas utilizados para la realización del presente trabajo, se encuentra recogida en la tabla 5.2. En todo los casos se usó la misma columna cromatográfica, concretamente una columna DB-5-MS (J&W Scientific, Folsom, CA) de 15 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.10  $\mu\text{m}$  de espesor de la fase estacionaria.

### **PBDE en lodos**

A partir de una extensa revisión bibliográfica, se concluyó que los niveles de concentración esperados para PBDE en lodos deberían ser muy altos, del orden de ng/g m.s. Por este motivo, el análisis instrumental de estos analitos se realizó en un espectrómetro de masas de baja resolución con analizador cuadrupolar, trabajando en ionización electrónica (EI). Como se ha comentado en detalle en los puntos 3.4.2.1 y 3.4.2.2 (*Capítulo 3.- Metodología analítica*), esta técnica presenta menor sensibilidad que la ionización química por captura electrónica (ECNI), sin embargo los niveles en los que se encuentran los PBDE en los lodos permite la utilización de la EI, mejorando de esta manera la selectividad, lo que permite solventar problemas de coeluciones con posibles sustancias interferentes.

En la tabla 5.3 se muestran las masas seleccionadas en el registro selectivo de iones (SIM) y los tiempos de retención obtenidos durante el análisis de los distintos congéneres de PBDE bajo las condiciones cromatográficas descritas en la tabla 5.2.

**Tabla 5.3.** Tiempos de retención y masas seleccionadas en el SIM realizado en el análisis de PBDE en lodos de depuradora mediante LRMS (qMS-EI) (de la Torre et al., 2007b).

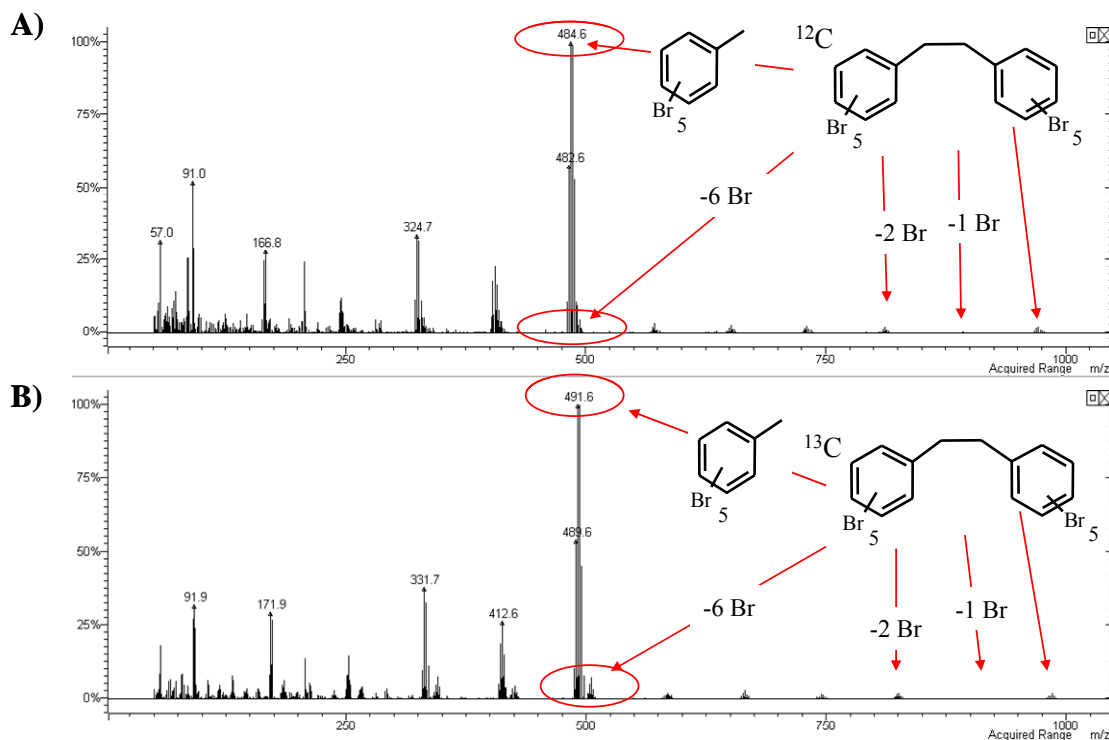
Grado de bromación	Compuesto	Tiempo de retención (min)	Iones <sup>a</sup>	
TriBDE	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> BDE-28	4.53	<b>418,420,422</b>	[M+2] <sup>+</sup> , [M+6] <sup>+</sup> , [M+8] <sup>+</sup>
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> BDE-17	4.26	<b>406,408,401</b>	[M+2] <sup>+</sup> , [M+6] <sup>+</sup> , [M+8] <sup>+</sup>
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> BDE-28	4.53		
TetraBDE	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> BDE-47	5.80	<b>336,338,340</b>	[M-2Br] <sup>+</sup> , [M-2Br+2] <sup>+</sup> , [M-2Br+4] <sup>+</sup>
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> BDE-47	5.80	<b>324,326,328</b>	[M-2Br] <sup>+</sup> , [M-2Br+2] <sup>+</sup> , [M-2Br+4] <sup>+</sup>
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> BDE-66	5.99		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> BDE-77	6.30		
PentaBDE	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> BDE-99	6.90	<b>416,418,420</b>	[M-2Br+2] <sup>+</sup> , [M-2Br+4] <sup>+</sup> , [M-2Br+6] <sup>+</sup>
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> BDE-100	6.63	<b>404,406,408</b>	[M-2Br+2] <sup>+</sup> , [M-2Br+4] <sup>+</sup> , [M-2Br+6] <sup>+</sup>
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> BDE-119	6.75		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> BDE-99	6.90		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> BDE-85	7.30		
HexaBDE	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> BDE-154	7.51	494, <b>496</b> ,498	[M-2Br+2] <sup>+</sup> , [M-2Br+4] <sup>+</sup> , [M-2Br+6] <sup>+</sup>
	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> BDE-153	7.86		
	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> BDE-138	8.26		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> BDE-154	7.51	482, <b>484</b> ,486	[M-2Br+2] <sup>+</sup> , [M-2Br+4] <sup>+</sup> , [M-2Br+6] <sup>+</sup>
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> BDE-153	7.86		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> BDE-138	7.26		
<sup>12</sup> C <sub>12</sub> BDE-156	8.44			
HeptaBDE	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> BDE-183	8.73	<b>574,576,578</b>	[M-2Br+4] <sup>+</sup> , [M-2Br+6] <sup>+</sup> , [M-2Br+8] <sup>+</sup>
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> BDE-184	8.56	<b>562,564,566</b>	[M-2Br+4] <sup>+</sup> , [M-2Br+6] <sup>+</sup> , [M-2Br+8] <sup>+</sup>
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> BDE-183	8.73		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> BDE-191	8.98		
OctaBDE	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> BDE-197	9.74	652, <b>654</b> ,656	[M-2Br+4] <sup>+</sup> , [M-2Br+6] <sup>+</sup> , [M-2Br+8] <sup>+</sup>
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> BDE-197	9.74	640, <b>642</b> ,644	[M-2Br+4] <sup>+</sup> , [M-2Br+6] <sup>+</sup> , [M-2Br+8] <sup>+</sup>
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> BDE-196	9.98		
NonaBDE	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> BDE-207	11.34	<b>732,734,736</b>	[M-2Br+6] <sup>+</sup> , [M-2Br+8] <sup>+</sup> , [M-2Br+10] <sup>+</sup>
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> BDE-207	11.34	<b>720,722,724</b>	[M-2Br+6] <sup>+</sup> , [M-2Br+8] <sup>+</sup> , [M-2Br+10] <sup>+</sup>
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> BDE-206	11.76		
DecaBDE	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> BDE-209	14.20	649.5, <b>651.5</b> ,653.5	[M-4Br+6] <sup>+</sup> , [M-4Br+8] <sup>+</sup> , [M-4Br+10] <sup>+</sup>
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> BDE-209	14.20	230, <b>232</b> ,234	M= <sup>12</sup> C <sub>6</sub> Br <sub>2</sub> [M] <sup>+</sup> , [M+2] <sup>+</sup> , [M+4] <sup>+</sup>

<sup>a</sup> Iones cuantificadores (negrita) y cualificadores (letra normal).

### DBDPE en lodos

La determinación de DBDPE se realizó en un espectrómetro de masas de baja resolución con analizador tandem, triple cuadrupolo. La utilización del modo MS/MS del instrumento permitió evitar el solapamiento del pico base correspondiente al fragmento [<sup>12</sup>C<sub>14</sub>H<sub>4</sub>Br<sub>4</sub>]<sup>+</sup> de la pérdida de 6 bromos del <sup>12</sup>C<sub>14</sub>-DBDPE y el fragmento pentabromobencílico [<sup>13</sup>C<sub>7</sub>H<sub>2</sub>Br<sub>5</sub>]<sup>+</sup> del <sup>13</sup>C<sub>14</sub>-DBDPE tal y como se muestra en la figura 5.5. (Konstantinov et al., 2006). En el primer cuadrupolo se separaron los iones moleculares [M+10]<sup>+</sup> del <sup>12</sup>C<sub>14</sub>- y <sup>13</sup>C<sub>14</sub>-DBDPE, que posteriormente se fragmentaron en el segundo cuadrupolo, generándose los iones producto (m/z 487 y 485 [<sup>12</sup>C<sub>7</sub>H<sub>2</sub>Br<sub>5</sub>]<sup>+</sup> y m/z 971 [<sup>12</sup>M+10]<sup>+</sup> para <sup>12</sup>C<sub>14</sub>-DBDPE; m/z 493/491

$[^{13}\text{C}_7\text{H}_2\text{Br}_5]^+$  y  $m/z$  985  $[^{13}\text{M}+10]^+$  para el  $^{13}\text{C}_{14}$ -DBDPE) que finalmente se analizaron en el tercer cuadrupolo.



**Figura 5.5.** Espectro de masas desde  $m/z$  50 a  $m/z$  1000 obtenido para: A)  $^{12}\text{C}_{14}$  DBDPE y b)  $^{13}\text{C}_{14}$  DBDPE.

### DP en lodos

El análisis instrumental del DP se llevó a cabo en un espectrómetro de masas de baja resolución con analizador cuadrupolar. La ionización se realizó mediante ionización electrónica por captura electrónica (ECNI) usando metano como gas moderador y seleccionando para el registro el ión molecular  $m/z$  652  $[\text{M}+4]^+$  como cuantificador y  $m/z$  654  $[\text{M}+6]^+$  como cualificador. Como se ha comentado anteriormente (punto 3.4.2.2.2., Capítulo 3), esta técnica presenta alta sensibilidad cuando se registran los iones moleculares del analito.

### Dec 602, 603, 604, 1,5-DPMA, Mirex y CP en lodos

En este caso y dado que los niveles esperados eran muy bajos, la técnica seleccionada fue la espectrometría de masas de alta resolución HRMS con analizador de sector magnético con doble enfoque, trisector (configuración EBE). Los iones monitorizados fueron: 263.8648  $[\text{C}_7\text{H}_3^{35}\text{Cl}_4^{37}\text{Cl}]^+$  y 265.8618  $[\text{C}_7\text{H}_3^{35}\text{Cl}_3^{37}\text{Cl}_2]^+$  para 1,5-DPMA; 271.8102  $[\text{C}_5^{35}\text{Cl}_5^{37}\text{Cl}]^+$  y 273.8072  $[\text{C}_5^{35}\text{Cl}_5^{37}\text{Cl}_1]^+$  para Mirex, Dec 602 y CP; 262.8570  $[\text{C}_7\text{H}_2^{35}\text{Cl}_4^{37}\text{Cl}]^+$  y 264.8540  $[\text{C}_7\text{H}_2^{35}\text{Cl}_3^{37}\text{Cl}_2]^+$  para Dec 603; 417.7026  $[\text{C}_8\text{H}_4^{79}\text{Br}_3^{81}\text{Br}_1]^+$  y 419.7006  $[\text{C}_8\text{H}_4^{79}\text{Br}_2^{81}\text{Br}_2]^+$  para Dec 604; 201.8911  $[\text{C}_5\text{H}_2^{35}\text{Cl}_3^{37}\text{Cl}]^+$  y 203.8881  $[\text{C}_5\text{H}_2^{35}\text{Cl}_2^{37}\text{Cl}_2]^+$  para aCl<sub>10</sub>DP y 237.8491  $[\text{C}_5\text{H}_2^{35}\text{Cl}_4^{37}\text{Cl}]^+$  y 239.8462  $[\text{C}_5\text{H}_2^{35}\text{Cl}_3^{37}\text{Cl}_2]^+$  para aCl<sub>11</sub>DP. Este equipo presenta una mayor

sensibilidad en comparación con los espectrómetros de baja resolución lo que permitió detectar Dec 602, 603, 604, 1,5-DPMA, Mirex y CP en niveles de concentración de ppt (pg/g m.s.) en los lodos evaluados.

**Evaluación de la calidad del análisis de retardantes de llama en lodos de depuradora**

**Linealidad, repetitividad, reproducibilidad y límites de detección**

Para asegurar la cuantificación fidedigna de los distintos analitos, se establecieron los siguientes criterios en los métodos optimizados: linealidad en el intervalo de cuantificación (> 0.99), repetitividad (RSD < 10 %) y reproducibilidad (RSD < 20 %), ver tabla 5.4. En la misma tabla se recogen los límites de detección, definidos como la menor concentración que presenta una relación Señal / Ruido igual a 3.

**Tabla 5.4.** Intervalo de concentración de la calibración (pg/ µL), linealidad (R<sup>2</sup>), repetitividad (% RSD; n=5), reproducibilidad (% RSD; n=5) y límite de detección (LOD) de los métodos optimizados.

		Intervalo de concentración pg/µL	R <sup>2</sup>	Repetitividad RSD (%)	Reproducibilidad RSD (%)	LOD S/N=3 (pg/g m.s)
PBDE (4.1., Capítulo 4) LRMS	BDE-17	1 – 400	0.995	6.8	12.5	5.2
	BDE-28	1 – 400	0.997	5.6	8.9	3.1
	BDE-47	1 – 400	0.996	3.1	7.8	2.5
	BDE-66	1 – 400	0.999	7.1	11.7	8.0
	BDE-77	1 – 400	0.993	6.8	12.0	9.1
	BDE-99	1 – 400	0.998	5.6	8.5	4.3
	BDE-100	1 – 400	0.996	2.1	6.8	8.5
	BDE-119	1 – 400	0.996	6.1	13.1	7.6
	BDE-138	1 – 400	0.997	4.5	7.6	5.2
	BDE-153	2 – 800	0.997	7.2	14.9	2.2
	BDE-154	2 – 800	0.993	3.8	7.1	2.0
	BDE-156	2 – 800	0.997	5.4	9.1	6.8
	BDE-183	2 – 800	0.996	7.1	10.7	9.3
	BDE-184	2 – 800	0.998	6.1	9.7	4.5
	BDE-191	2 – 800	0.997	3.4	8.9	7.5
	BDE-196	2 – 800	0.991	6.7	11.4	6.2
	BDE-197	2 – 800	0.995	7.8	10.5	5.2
	BDE-206	5 – 2000	0.997	5.7	8.4	6.5
	BDE-207	5 – 2000	0.991	5.4	9.5	5.8
BDE-209	5 - 2000	0.997	4.8	9.7	9.7	
DBDPE (4.2., Capítulo 4) LRMS	DBDPE	5 - 2000	0.998	3.7	8.7	0.3
DP (4.3., Capítulo 4) LRMS	Syn-DP	10 – 2500	0.995	2.5	7.8	8.2
	Anti-DP	10 - 2500	0.996	3.1	9.2	11.2
Dec 602, 603, 604, 1,5-DPMA, Mirex, CP, aCl <sub>10</sub> DP, aCl <sub>11</sub> DP (4.4., Capítulo 4) HRMS	Dec 602	3 – 800	0.999	5.7	9.1	0.005
	Dec 603	3 – 800	0.998	6.7	8.4	0.006
	Dec 604	3 – 800	0.996	3.4	6.7	0.002
	1,5-DPMA	4 - 1000	0.999	4.8	5.8	0.005
	CP	4 - 1000	0.995	3.5	6.5	0.002
	aCl <sub>10</sub> DP	4 - 1000	0.997	5.8	6.7	0.001
	aCl <sub>11</sub> DP	4 - 1000	0.999	4.3	5.8	0.001

### Identificación

Se utilizaron tres criterios para asegurar la correcta identificación y cuantificación de los analitos: i) la diferencia entre el tiempo de retención del compuesto de interés y de su patrón no debe ser superior a 1 s, ii) la relación isotópica entre los iones cualificador y cuantificador del analito debe estar dentro del 15% del valor teórico, iii) la relación Señal / Ruido del ión cuantificador debe ser mayor a 5.

### Recuperación de los patrones de extracción

Las recuperaciones medias (tasas de recuperación del patrón interno añadido antes de la extracción calculadas a partir del patrón de inyección) obtenidas para los distintos analitos se recogen en la tabla 5.5. En todos los casos se obtuvieron recuperaciones superiores al > 60%.

<b>Tabla 5.5.</b> Tasas de recuperación medias obtenidas en los distintos estudios descritos en esta memoria.		
		Recuperación % (media ± desviación estándar)
PBDE (4.1., Capítulo 4)	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> BDE-28	87 ± 10
	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> BDE-47	79 ± 12
	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> BDE-99	75 ± 18
	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> BDE-153	92 ± 8
	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> BDE-154	95 ± 9
	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> BDE-183	86 ± 15
	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> BDE-197	84 ± 20
	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> BDE-207	82 ± 21
	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> BDE-209	85 ± 15
DBDPE (4.2., Capítulo 4)	<sup>13</sup> C <sub>14</sub> DBDPE	63 ± 25
DP (4.3., Capítulo 4)	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> BDE-47	87 ± 26
	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> BDE-209	75 ± 13
Dec 602, 603, 604, 1,5-DPMA, Mirex, CP, aCl <sub>10</sub> DP, aCl <sub>11</sub> DP (4.4., Capítulo 4)	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> BDE-47	74 ± 17
	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> BDE-153	81 ± 20

### Blancos

Se analizaron dos tipos de blancos: i) blancos de procedimiento, preparados y analizados bajo las mismas condiciones que las muestras (utilizando tierra de diatomea como matriz) y ii) blancos instrumentales, inyecciones de nonano realizadas entre las muestras durante el análisis instrumental para detectar efecto memoria en el instrumento. Sólo se encontraron niveles de BDE-209 (desde n.d. hasta 3 pg/g m.s.) al inicio de la realización de los experimentos. Estas concentraciones fueron tres órdenes de magnitud inferiores a las obtenidas en las muestras y se debieron a una limpieza deficiente del material de vidrio. Una vez detectado y corregido el problema, los niveles de BDE-209 se situaron por debajo de los límites de detección.

## Validación

### PBDE

Actualmente no existe ningún lodo de depuradora con concentraciones certificadas de PBDE. Por este motivo, se eligió un polvo de origen doméstico (Standard Reference Material *SRM 2585; National Institute of Standards and Technology, NIST*). Se prepararon 5 réplicas y éstas se extrajeron, purificaron y cuantificaron, de la misma forma que el resto de lodos. En la tabla 5.6 se muestra el valor certificado para cada congénere con su desviación y la media y desviación obtenida en nuestro laboratorio. Los valores obtenidos están dentro de la desviación de la concentración certificada por el NIST.

**Tabla 5.6.** Concentración certificados para el SRM2585 y valores obtenidos en el laboratorio (n=5)

	Valor Certificado (ng/g m.s.)	$\delta$ (ng/g m.s.)	Valor obtenido (ng/g m.s.)	$\delta$ (ng/g m.s.)
BDE-17	11.5	1.2	11.6	1.8
BDE-28	46.9	4.4	46	0.9
BDE-47	497	46	494.3	5.5
BDE-100	145	11	142.5	5.7
BDE-99	892	53	901.5	9.8
BDE-85	43.8	1.6	42.5	0.8
BDE-154	83.5	2.0	81.9	5.5
BDE-153	119	1.0	120.5	0.7
BDE-138	15.2	2.0	13.8	2.8
BDE-183	43.0	3.5	43.1	3.1
BDE-206	271	42	263	7.5
BDE-209	2510	190	2518.3	8.7

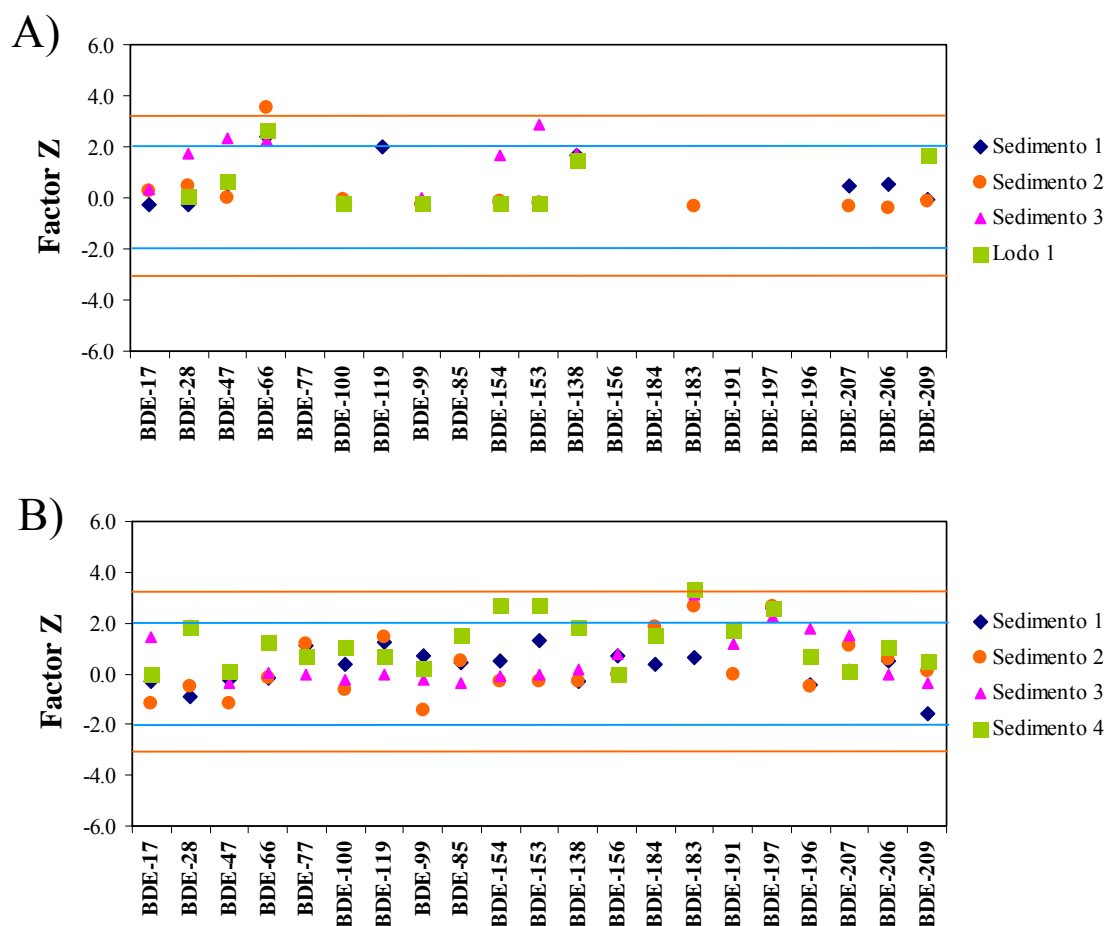
$\delta$  = desviación estándar.

Desde el año 2007 el laboratorio ha participado en 4 ejercicios de intercomparación de PBDE. Estos trabajos han sido coordinados por el Dr. Bert van Babel, MTM Research Center, Universidad de Örebro (Suecia). En la figura 5.6 se muestran los valores del factor Z obtenidos en los ejercicios de 2007 y 2008 (factor Z = resultado emitido por el laboratorio – valor medio obtenido con todos los laboratorios participantes / desviación estándar de la media obtenida con los laboratorios participantes; Thompson y Wood, 1993). A fecha de la finalización de esta memoria, noviembre de 2010, no se han recibido los resultados de los intercomparativos correspondientes a 2009 y 2010. Según la Asociación Oficial de Químicos (AOAC internacional), la Organización Internacional de Estandarización (ISO) y la Unión Internacional de Química Pura y Analítica (IUPAC), valores de  $|Z| \leq 2$  son satisfactorios,  $2 < |Z| < 3$  son cuestionables y  $|Z| \geq 3$  son insatisfactorios.

Como se puede observar en la figura 5.6.A., en el ejercicio del año 2007 sólo se obtuvo un valor del factor Z superior a 3. Este punto corresponde a la concentración del congénere BDE-66 en el sedimento 2. Bajo las condiciones cromatográficas descritas anteriormente para el análisis de PBDE, el pico correspondiente al BDE-66 aparece como un hombro del BDE-47. Mientras que el BDE-47 es un congénere mayoritario en todas las matrices medioambientales, la presencia del BDE-66 es prácticamente despreciable. A partir de la detección de este

problema, en el ejercicio de 2008 se prestó especial atención a la integración del pico correspondiente al BDE-66, obteniéndose entonces valores satisfactorios ( $|Z| \leq 2$ ).

Por otro lado, los valores de  $|Z| > 2$  obtenidos para los congéneres BDE-153, -154, -183 y -197 en el ejercicio de 2008, corresponden a niveles de concentración muy próximos a los límites de detección del equipo utilizado (LRMS). Este hecho no afecta a los valores mostrados para dichos congéneres en los lodos de depuradora, dado que las concentraciones medias obtenidas para ellos son tres órdenes de magnitud superiores a los límites de detección.



**Figura 5.6.** Valores obtenidos para el factor Z en los ejercicios intercomparativos realizados en A) 2007 y B) 2008.

DBDPE y Decloranes

Hasta donde el autor conoce no existen materiales de referencia en ninguna matriz para DBDPE, DP, Dec 602, 603, 604, CP o 1,5-DPMA, ni se ha organizado ningún ejercicio intercomparativo en el que se evalúen estos compuestos.



### 5.1.2.- Niveles de retardantes de llama en lodos de EDAR

En la tabla 5.7 se detallan las concentraciones de los distintos retardantes de llama considerados: PBDE, DBDPE, DP, Dec 603, 602, Mirex y CP. No se detectaron 1,5-DPMA, ni Dec 604 en ninguna de las muestras analizadas.

**Tabla 5.7.** Concentraciones de PBDE, DBDPE, DP, Dec 603, 602, Mirex y CP obtenidas en las muestras analizadas.

Muestra	PBDE ng/g m.s.	BDE-209 ng/g m.s.	DBDPE ng/g m.s.	syn-DP ng/g m.s.	anti-DP ng/g m.s.	DP ng/g m.s.	$f_{syn}^a$	Dec 603 pg/g m.s.	Dec 602 pg/g m.s.	Mirex pg/g m.s.	CP pg/g m.s.
1	9.1	5.5	3.3	0.9	2.3	3.2	0.28	4.3	n.d.	n.d.	n.d.
2	408.3	330.9	49.6	13.8	43.9	57.7	0.24	10.5	6.2	8.4	n.d.
3	251.3	169.0	23.3	6.9	19.7	26.6	0.26	8.5	3.1	n.d.	n.d.
4	798.8	674.2	92.6	16.3	47.8	64.1	0.25	7.4	n.d.	6.0	n.d.
5	613.4	491.4	78.8	12.4	33.6	46.0	0.27	18.6	6.7	n.d.	n.d.
6	170.4	114.1	54.0	5.3	14.8	20.1	0.26	19.8	n.d.	10.4	n.d.
7	300.0	224.5	19.8	6.2	16.4	22.6	0.27	4.9	3.5	1.0	n.d.
8	121.8	110.8	30.8	7.8	18.2	26.0	0.30	9.5	n.d.	n.d.	n.d.
9	205.4	94.6	51.6	10.3	31.1	41.4	0.25	10.0	3.6	2.3	n.d.
10	359.0	282.6	50.9	3.3	6.2	9.4	0.35	24.5	3.9	4.8	n.d.
11	372.0	300.1	6.9	2.9	7.9	10.9	0.27	97.4	3.4	3.0	3.4
12	820.5	693.6	51.5	12.7	43.0	55.6	0.23	12.8	4.5	2.6	2.0
13	112.8	79.2	57.5	4.2	11.7	16.0	0.27	12.4	10.8	3.9	n.d.
14	362.5	271.3	33.9	8.9	26.7	35.7	0.25	18.8	11.8	1.9	2.7
15	137.0	92.0	23.3	9.7	25.7	35.4	0.27	14.5	12.5	n.d.	n.d.
16	275.0	207.4	72.5	11.1	24.0	35.0	0.32	12.3	3.9	1.6	n.d.
17	840.9	748.7	87.0	14.6	59.1	73.7	0.20	8.7	8.1	2.0	n.d.
18	897.1	714.6	112.0	18.7	75.1	93.8	0.20	4.7	5.9	1.8	n.d.
19	419.7	345.6	32.3	5.7	14.7	20.4	0.28	17.9	7.1	3.3	5.4
20	994.9	843.0	125.0	19.2	61.9	81.2	0.24	4.8	6.3	1.8	n.d.
21	123.1	98.4	49.6	2.0	5.0	6.9	0.28	4.8	n.d.	19.2	n.d.
22	159.1	96.2	27.6	2.3	3.4	5.7	0.40	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
23	345.1	254.8	56.0	12.0	40.1	52.1	0.23	5.5	3.0	n.d.	n.d.
24	107.0	75.2	17.5	1.3	3.2	4.4	0.29	8.4	n.d.	n.d.	n.d.
25	186.5	154.9	31.5	0.9	1.5	2.5	0.37	5.9	1.6	n.d.	n.d.
26	100.5	76.2	43.7	3.7	10.6	14.3	0.26	2.0	n.d.	n.d.	n.d.
27	150.8	99.0	6.0	4.1	5.6	9.6	0.42	7.4	1.4	n.d.	n.d.
28	178.9	109.0	62.1	4.6	13.8	18.4	0.25	4.2	4.0	n.d.	n.d.
29	335.5	271.5	26.0	2.8	6.0	8.7	0.32	13.0	2.5	n.d.	n.d.
30	616.1	499.7	56.4	14.5	34.4	48.9	0.30	n.d.	1.0	n.d.	3.3
31	569.6	451.9	24.1	15.3	46.3	61.6	0.25	4.3	1.9	n.d.	n.d.
Media	365.9	289.7	47.0	8.2	24.3	32.5	0.28	13.0	5.1	4.6	3.4
Mediana	300.0	224.5	49.6	6.9	18.2	26.0	0.27	8.7	3.9	2.8	3.3
Mínimo	9.1	5.5	3.3	0.9	1.5	2.5	0.20	2.0	1.0	1.0	2.0
Máximo	994.9	843.0	125.0	19.2	75.1	93.8	0.42	97.4	12.5	19.2	5.4
Muestras detectadas/ muestras analizadas	31/ 31	31/ 31	31/ 31	31/ 31	31/ 31	31/ 31	31/ 31	29/ 31	23/ 31	16/ 31	5/ 31

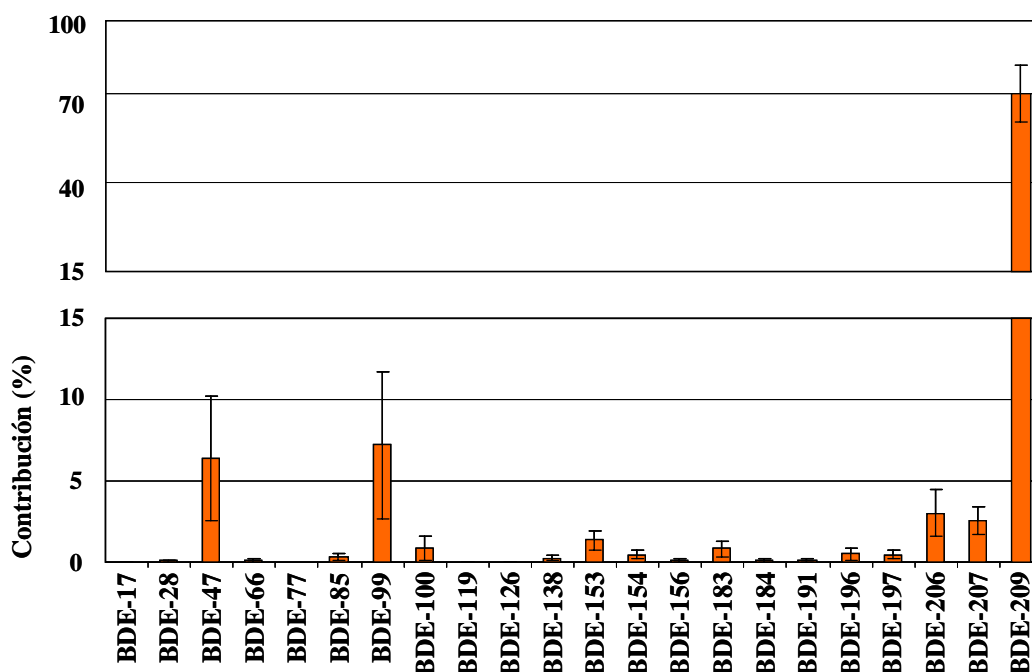
n.d.= no detectado.

<sup>a</sup>  $f_{syn} \text{ tolueno} = [\text{syn-DP}] / [\text{anti-DP}] + [\text{syn-DP}]$ .

**PBDE**

Se detectaron PBDE en todas las muestras, con un intervalo de concentración desde 9.1 hasta 994.9 ng/g m.s. Los valores de la media y la mediana para estas concentraciones se situaron en 365.9 ng/g m.s. y 300.0 ng/g m.s., respectivamente. Similares niveles se han descrito en lodos por todo el mundo (Hale 2001 y 2003; North 2004; Song et al., 2006; Knoth et al., 2007; Wang et al., 2007; Eljarrat et al., 2008; Gevao et al., 2008; Sánchez-Brunete et al, 2009; Clarke et al., 2010).

Se encontró un patrón de congéneres común para todos los lodos de EDAR analizados, siendo el BDE-209 el congénere mayoritario ( $75.2 \pm 9.8 \%$  ; media  $\pm \delta$ ), seguido del BDE-99 ( $7.2 \pm 4.5 \%$  ; media  $\pm \delta$ ) y BDE-47 ( $6.4 \pm 3.8 \%$  ; media  $\pm \delta$ ), ver figura 5.7. También se cuantificaron niveles relativamente altos para los BDE-206 ( $3.0 \pm 1.5\%$ ; media  $\pm \delta$ ) y BDE-207 ( $2.6 \pm 0.8\%$ ; media  $\pm \delta$ ).



**Figura 5.7.** Patrón de congéneres de PBDE detectados en las muestras de lodos. La altura de la barra representa la media y las barras de error señalan la desviación típica de la contribución de cada congénere sobre el total de PBDE obtenido.

Como se ha comentado en detalle en el punto 1.2.2.1.1 (Capítulo 1, Introducción), los PBDE se han comercializado bajo tres tipos de mezclas comerciales (PentaBDE, OctaBDE, y DecaBDE). Sin embargo la producción, importación y uso de las mezclas Penta y OctaBDE está prohibida en Europa desde el 1 de enero de 2004 (Directiva 2003/11/CE). El patrón de congéneres encontrado en las muestras de este estudio correlaciona bien con el descrito por La guardia et al, 2006, para dos preparados comerciales de tipo DecaBDE (94.2 % BDE -209, 3.6 % BDE-207 y 2.2 % de BDE-206; contribuciones medias para las mezclas Saytex 102E y Bromkal 82-0DE), lo que evidencia el uso de este tipo de mezclas en España. La contribución

media del congénere BDE-209 al total de PBDE obtenido en los lodos (77.2 %) es algo más baja que la descrita en las mezclas comerciales. Este hecho podría deberse a fenómenos de degradación por estrés térmico (WHO, 1994a), fotolíticos (Kajiwara et al., 2008; Shih y Wang, 2009) y/o anaeróbicos (Gerecke et al., 2005 y 2006; Shin et al., 2009) que puede sufrir el BDE-209, resultando en la presencia de PBDE con menor grado de bromación, como por ejemplo BDE-207, -206, -197, -183, -153, -154, -99 o -47. Aunque no se puede descartar que la presencia de estos congéneres también puede deberse a la utilización histórica de mezclas de tipo Penta y/o OctaBDE.

### **DBDPE**

Se detectó DBDPE en todas las muestras analizadas, con un intervalo de concentración desde 3.3 hasta 125.0 ng/g m.s. Los valores de la media y la mediana para estas concentraciones se situaron en 47.0 ng/g m.s. y 49.6 ng/g m.s., respectivamente. Estos niveles son más bajos que los obtenidos para el BDE-209 (289.7, 224.5, 5.5, 843.0 ng/g m.s.; media, mediana, mínimo y máximo), congénere relativo a la mezclas de tipo DecaBDE, a las cuales el DBDPE está encaminado a sustituir (ECB, 2007), lo que indica un grado de sustitución aún bastante bajo.

La concentración media de DBDPE obtenida en este estudio es dos veces menor que la descrita en un estudio internacional realizado por Ricklund et al., (2008) (81 ng/g m.s.). Sin embargo, en dicho estudio la media Europea está claramente influenciada por niveles altos de DBDPE (121 y 120 ng/g m.s.; valores medios) obtenidos en lodos de EDAR de Alemania y Suiza (8 de las 18 muestras europeas), que pueden ser fácilmente atribuidos a los vínculos comerciales entre los dos países y las altas importaciones de DBDPE en Alemania (Arias, 2001). Conviene recordar en este caso que el DBDPE cumple las Ordenanzas alemanas, ya que no produce dioxinas bromadas bajo condiciones de pirólisis (Pettigrew, 1993). Por otro lado, los niveles encontrados en España son similares a los descritos en Suecia (Kierkegaard et al., 2004b) (n.d., 100 ng/g m.s.; mínimo y máximo) y mayores que los encontrados en lodos de Canadá (Konstantinov et al., 2006) (15.1, 14.9, 5.6, 31.6 ng/g m.s.; media, mediana, mínimo y máximo), donde la mezclas DecaBDE están siendo ampliamente utilizadas.

### **Decloranes y CP**

Como se ha comentado en detalle en el punto 1.2.2.1.2. (Capítulo 1, Introducción), los Decloranes 602 (Dec 602), 603 (Dec 603), 604 (Dec 604) y 605 (Dec 605) o Dechlorane Plus (DP), son compuestos introducidos por la industria como substitutos del Declorane o Mirex, cuando en 1978, se prohibió la utilización de este último en EE. UU. (WHO, 1984).

De todos los Decloranes analizados en este estudio (Dec 602, 603, 604, DP y Mirex), el que se encontró en mayor concentración fue el DP. Este compuesto se detectó en todas las muestras analizadas, con un intervalo de concentración desde 2.5 hasta 93.8 ng/g m.s. Los valores de la media y la mediana para estas concentraciones se situaron en 32.5 ng/g m.s. y 26.0 ng/g m.s., respectivamente. Estos niveles son inferiores a los cuantificados para PBDE y DBDPE en las mismas muestras, lo que indica un menor uso de DP en comparación con el de

los dos anteriores retardantes de llama. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las aplicaciones del DP son más limitadas. Concretamente, el DP se utiliza en aparatos eléctricos y electrónicos (principalmente en cables y conectores) (OxyChem, 2010), mientras que los PBDE se encuentran ampliamente distribuidos en multitud de materiales (Alaee et al., 2003; European Communities, 2001, 2002 y 2003; Larsen, 1978; Pettigrew, 1993; WHO, 1994a). Hasta donde el autor conoce, éste es el primer estudio que presenta datos de DP en lodos de depuradora. Existe un único dato publicado por Kolic et al., (2009), en el que se cuantifica de manera semi-cuantitativa una concentración total de DP de  $\sim 119$  ng/g m.s. de una muestra de lodo recogida en una depuradora de Toronto, Canadá.

En todas las muestras se detectaron tanto el isómero *syn*-DP (8.2, 6.9, 0.9, 19.2 ng/g m.s.; media, mediana, mínimo y máximo) como el isómero *anti*-DP (24.3, 18.2, 1.5, 75.1 ng/g m.s.; media, mediana, mínimo y máximo). El valor medio de  $f_{syn}$  (concentración del isómero *syn*-DP entre la concentración total de DP (*syn*-DP + *anti*-DP)) fue de  $0.28 \pm 0.05$ . En la actualidad sólo se conocen dos fábricas de DP en el mundo: la situada en la ciudad de Niagara Falls (New York, EE. UU.) y la recientemente descubierta por Wang et al., 2010 en Anpon (China). El  $f_{syn}$  medio, obtenido en los lodos españoles se acerca más a la mezcla comercial producida en EE. UU. ( $f_{syn} = 0.31 \pm 0.05$  (Qiu et al, 2007a; Tomy et al., 2007; Sverko et al., 2008; Shen et al., 2010) en EE. UU.;  $f_{syn} = 0.40 \pm 0.05$  (Wang et al., 2010) lo que indica que el DP detectado en nuestro estudio podría proceder de la mezcla comercial fabricada en Niagara Falls.

El resto de Decloranes sólo se detectaron en algunas muestras, pero en concentraciones tres órdenes de magnitud inferior a las obtenidas para el DP: niveles de Declorane 603 cuantificados en 29 muestras (13.0, 8.7, 2.0, 97.4 pg/g m.s.; media, mediana, mínimo y máximo), Dec 602 en 23 muestras (5.1, 3.9, 1.0, 12.5 pg/g m.s.; media, mediana, mínimo y máximo) y Mirex en 16 muestras (4.6, 2.8, 1.0, 19.2 pg/g m.s.; media, mediana, mínimo y máximo). No se encontraron niveles cuantificables de Dec 604 ni 1,5-Declorane plus monoadducto (1,5-DPMA) en ninguna de las muestras analizadas. El patrón de distribución de estos compuestos fue bastante similar en todas las muestras, siendo el Dec 603 el compuesto que presentó mayor contribución al total de Decloranes (61 %; media), seguido del Dec 602 (27 % ; media) y el Mirex (12 % ; media), excluyendo el DP. Hasta donde el autor conoce, éste es el primer estudio que presenta niveles para Dec 602 y 603 en lodos de depuradora. Las concentraciones obtenidas evidencian la utilización de estos compuestos en España. Aunque parte del Dec 603 podría deberse a transporte a larga distancia y deposición (de la Torre et al., 2010).

Según se recoge en el Plan Nacional de Aplicación del Convenio de Estocolmo y Reglamento 850/2004, sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (PNA, 2006), no existen registros de la utilización de Mirex en España, por lo que las concentraciones encontradas en los lodos podrían deberse a transporte a larga distancia (de la Torre et al., 2010). Los niveles detectados son inferiores a los encontrados en Korea (Ju et al., 2009) (67.7, 56.0, n.d., 150.0 pg/g m.s.; media, mediana, mínimo y máximo).

Sólo se obtuvieron niveles cuantificables de CP en 5 muestras, con un valor medio de concentración de 3.4 ng/g m.s. (3.3, 2.0 y 5.4 pg/g m.s.; mediana, mínimo y máximo). Hasta donde el autor conoce, éste es el primer estudio que presenta niveles de CP en lodos de depuradora.

**Análisis de Componentes Principales (ACP)**

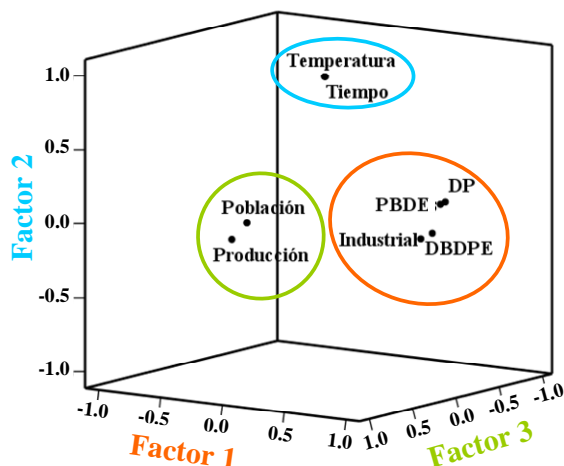
Para establecer posibles relaciones entre las características de las depuradoras y los niveles de concentración de retardantes de llama encontrados en los lodos, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP). En este estudio se incluyeron las variables numéricas: población equivalente (h.e.), producción de lodos (t/a) y porcentaje del influente de las EDAR relativo a efluentes industriales (% Ind.), tiempo (días) y temperatura (°C) a la que se desarrolla la estabilización anaeróbica del lodo (suponiendo 0 para ambas variables en las muestras sujetas a tratamiento químico y no estabilizadas, muestras: 13, 21, 25, 28 y 31) y las concentraciones de PBDE, DBDPE y DP obtenidas. En este análisis no se incluyeron Dec 603, 602, Mirex y CP, dado que estos compuestos no se detectaron en todas las muestras.

Como paso previo al ACP, se estudió el ajuste a la normalidad de todas las variables con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. En todos los casos se obtuvo una  $p > 0.05$ , no rechazándose la hipótesis nula y confirmándose que los datos se ajustan a una distribución normal. Se obtuvo un p-valor para el test de esfericidad de Barlett de 0.000 contrastando formalmente la existencia de correlación entre variables. Además, el estadístico de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) presentó un valor de 0.602, lo que indica una buena adecuación muestral al análisis factorial.

Se obtuvieron tres factores con autovalor mayor que la unidad. El primer factor explica el 38.3 % de la varianza total y los dos siguientes un 24.7 % y un 14.2 % (un 77.2 % entre los tres). Como se muestra en la matriz de factores rotados (tabla 5.8) y su representación tridimensional (figura 5.8), el primer factor incluye claramente variables de concentración de contaminante (PBDE, DBDPE y DP), el segundo factor incluye variables del tipo de tratamiento del lodo (tiempo y temperatura) y el tercer factor incluye las características de la planta (población equivalente y producción de lodo).

**Tabla 5.8.** Matriz de factores. Método de extracción por Análisis de Componentes Principales y rotación Varimax con normalización Kaiser.

	Factor		
	1	2	3
Población (h.e.)	-0.019	0.070	0.801
Producción (t/año)	-0.156	-0.058	0.780
Industrial (% Ind.)	0.477	-0.175	-0.499
Tiempo (días)	0.074	0.959	0.038
Temperatura (°C)	0.084	0.960	0.042
PBDE (ng/g m.s.)	0.931	0.168	-0.078
DBDPE (ng/g m.s.)	0.854	-0.041	-0.094
DP (ng/g m.s.)	0.912	0.169	-0.163



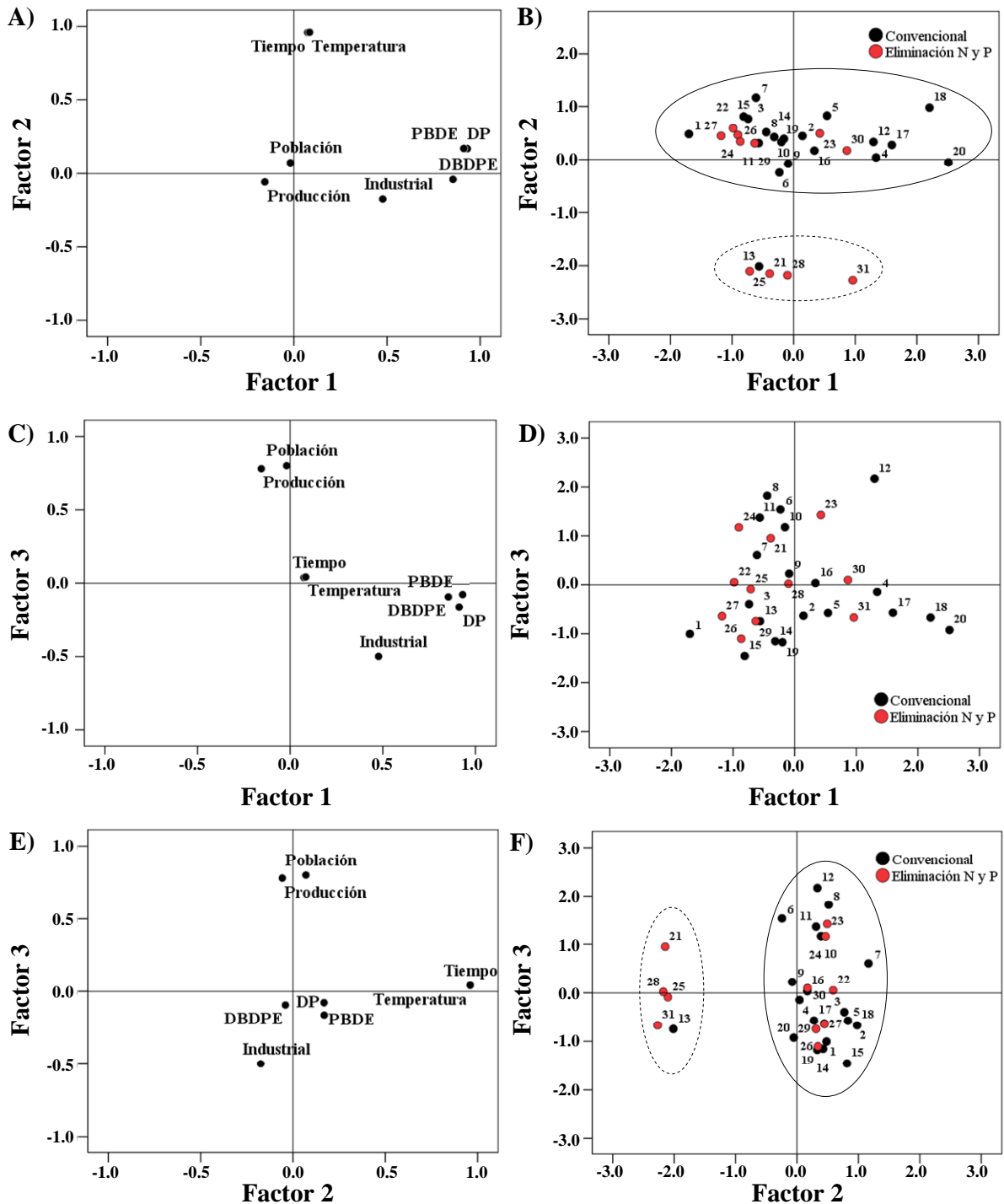
**Figura 5.8.** Grafico tridimensional de saturaciones en espacio factorial rotado.

En la figura 5.9 se representan los gráficos de dispersión de cada variable referida a cada factor (figura 5.9.A, C y E) y de cada muestra de acuerdo a su puntuación en cada factor (figura 5.9.B, D y F). Como se puede apreciar en la figura 5.9.A, las concentraciones de PBDE, DBDPE y DP están muy relacionadas. Los coeficientes de correlación de Pearson ( $p < 0.01$ ) entre estas variables son:  $r = 0.713$  para PBDE y DBDPE,  $r = 0.855$  para PBDE y DP y  $r = 0.741$  para DBDPE y DP. Además, existe una buena correlación entre las concentraciones de PBDE y DP y el porcentaje en el influente de las EDAR relativo a efluentes industriales. Estos resultados indican: i) un origen común para los niveles de PBDE, DBDPE y DP en los lodos, probablemente derivado de procesos de lixiviación de estos compuestos durante la utilización y disposición de los materiales de consumo que los contengan y ii) corroboran la utilización de mezclas de PBDE (DecaBDE) y DP en la industria española. Este hecho pone de manifiesto que la infusión de estas mezclas en los productos de consumo es una fuente de PBDE y DP en los influentes de EDAR. Además, el tipo de industria es un factor que condiciona este resultado. Así por ejemplo, las muestras 17, 18, 20 y 31 se pueden relacionar con industrias cuyas actividades incluyen el uso potencial de retardantes de llama, como son las industrias textiles, las de tratamiento de superficies o las de procesado galvanizado entre otras.

De acuerdo con el Factor 2, las muestras se agrupan en dos grupos: muestras sujetas a estabilización mesofílica anaeróbica (línea sólida), y muestras no estabilizadas o estabilizadas mediante tratamiento químico (línea discontinua) (figura 5.9.B). Ambos grupos presentan una distribución en gradiente con respecto al Factor 1, indicando que el tipo de tratamiento de la línea de lodos no influye sobre el contenido de PBDE, DBDPE y DP.

En las figuras 5.9. C y D se representa el Factor 1 con respecto al Factor 3. Este último considera las características de la planta (población equivalente y producción de lodo), sin embargo la correlación entre ambas ( $r = 0.341$ ;  $p = 0.06$ ) no llega a ser estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). Este hecho podría deberse tanto a que la población equivalente está sometida a una alta estacionalidad, como a la heterogeneidad relativa al tipo de agua tratada por

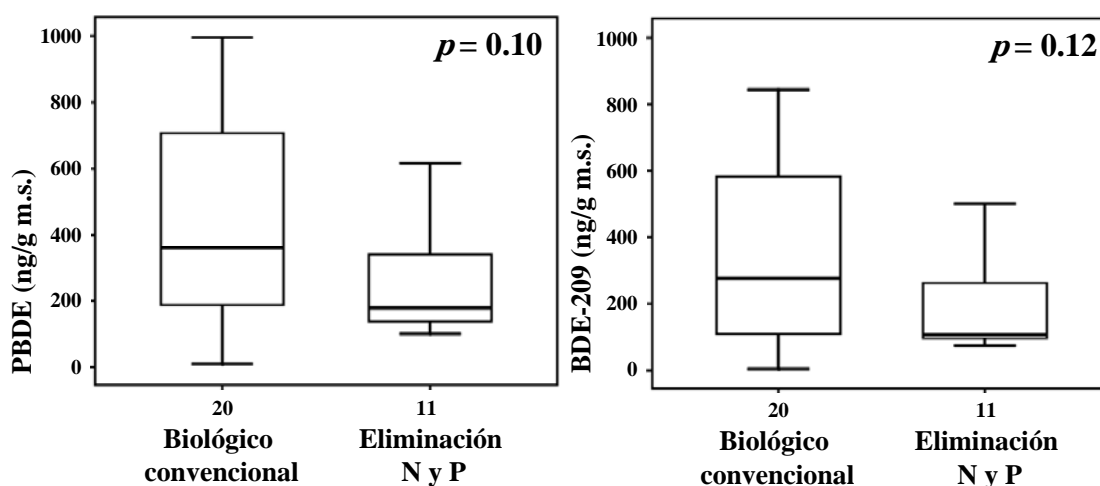
las EDAR. En la figura 5.9.D. se puede apreciar que no se establecen grupos de muestras relativos al Factor 3 en el Factor 1. Esto indica que la población y/o la producción de lodos no influye sobre el contenido de PBDE, DBDPE y DP en los dichos lodos.



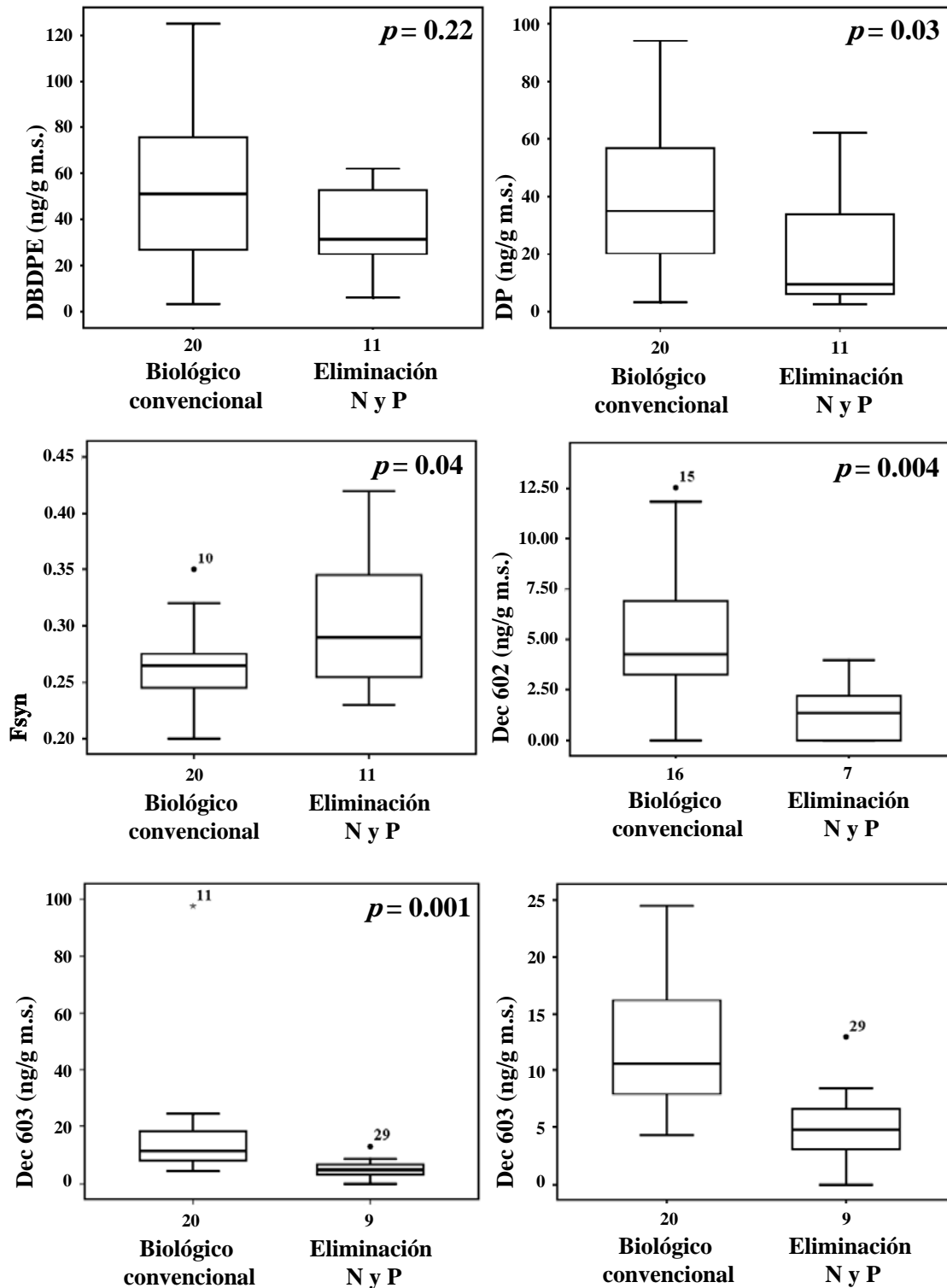
**Figura 5.9.** Resultados obtenidos del ACP. Gráficos de dispersión de cada variable referida a cada factor (A, C, y E) y de cada muestra de acuerdo a su puntuación en cada factor (B, D, F).

Como hemos comentado anteriormente el ACP revela que los tratamientos utilizados en la línea de lodos no influyen en el contenido de PBDE, DBDPE y DP de los mismos. Sin embargo este resultado no es extrapolable a la línea de aguas.

En las figuras 5.9 (B, D, F) las muestras se han representado en función del tratamiento utilizado en la línea de aguas: biológico convencional (aeróbico) o eliminación biológica de nitrógeno y fósforo (anaeróbico, seguido de anóxico y finalmente aeróbico). Analizando la figura 5.9.B no se pueden establecer tendencias relativas a la presencia de contaminantes en función del tratamiento de la línea de aguas. Sin embargo si evaluamos por separado las concentraciones obtenidas para cada analito, figura 5.10, podemos observar que las muestras provenientes de la eliminación biológica de N y P, presentan menores concentraciones que las obtenidas en aquéllas fruto del tratamiento biológico convencional. Esta diferencia es estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en el caso del DP, Dec 602 y Dec 604. Este hecho podría deberse a la presencia de Organismos Acumuladores de Fósforo (OAP), principalmente bacterias *Acinetobacter* (Majed et al., 2009), que acumulan P más allá de sus necesidades metabólicas de crecimiento cuando se combinan etapas anaeróbicas y aeróbicas. Estas bacterias utilizan carbono orgánico como fuente de energía (Jiang et al., 2004; Majed et al., 2009), por tanto es posible que degraden algunos compuestos orgánicos. Esta degradación se verá influenciada por la estabilidad que la deslocalización de la carga aromática confiere en función de la planaridad de los compuestos. De la misma forma se observa un enriquecimiento (estadísticamente significativo;  $p < 0.05$ ) en el isómero syn-DP en los lodos obtenidos de la eliminación biológica de N y P. Este isómero podría ser menos susceptible a sufrir degradación dado que los cuatro carbonos interiores del ciclooctano están más apantallados por los cloros que en el isómero anti-DP (Hoh et al., 2006), ver anexo I.







**Figura 5.10.** Diagramas de cajas y bigotes para los PBDE, DBDPE, DP,  $f_{syn}$ , Dec 602 y Dec 603 en función del tratamiento utilizado en la línea de aguas. El máximo de las cajas, las líneas situadas dentro y el mínimo de las mismas corresponden a los percentiles 75, 50 y 25 respectivamente. Las líneas de error de las cajas representan el máximo y el mínimo excluyendo los valores atípicos moderados (punto: superiores a 1.5 veces el rango intercuartílico (RI) desde los cuartiles 75 y 25) y extremos (asterisco: superiores a 3 veces el RI desde los cuartiles 75 y 25).

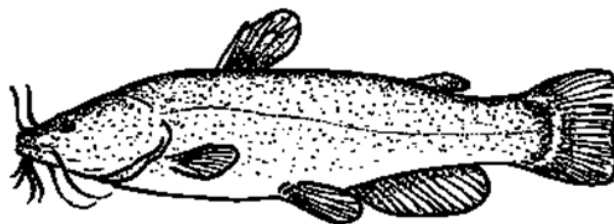
En resumen, este estudio demuestra la presencia de retardantes de llama halogenados: PBDE, DBDPE, DP, Dec 602, Dec 603, CP y Mirex en lodos de EDAR españolas. Los resultados confirman que la infusión de las mezclas comerciales DecaBDE y DP en los productos de consumo supone una fuente de estos retardantes en la corriente de entrada de las EDAR. Por otro lado la presencia de DBDPE, Dec 603, Dec 602 y CP, puede deberse a procesos de lixiviación ocurridos durante la utilización y desecho de materiales que los contengan.

Mientras que los procesos englobados en la línea de lodos parecen no influir en el contenido de PBDE, DBDPE y DP, las muestras sometidas a tratamiento de eliminación biológica de nitrógeno y fósforo en la línea de aguas presentan menores concentraciones de estos contaminantes.

## 5.2.- Niveles de PBDE y sus análogos metoxilados e hidroxilados en plasma de pez gato (*Ameiurus nebulosus*) del lago Ontario

Durante los últimos años la comunidad científica ha realizado numerosos esfuerzos para evaluar las fuentes y el comportamiento de los PBDE en el medio ambiente. Sin embargo existen aún ciertas lagunas de conocimiento relativas a los polibromodifenil éteres metoxilados (MeO-PBDE) y polibromodifenil éteres hidroxilados (OH-PBDE), los cuales son análogos de los PBDE. Como se ha comentado en el punto 1.3 (*Capítulo 1. Introducción*), la presencia de MeO- y OH-PBDE en el medio biótico puede deberse a: i) la bioacumulación con origen antrópico y/o natural y ii) procesos metabólicos sufridos por los PBDE, MeO-PBDE y/o OH-PBDE que previamente han sido bioacumulados. Sin embargo, en la actualidad existe un debate entre la comunidad científica, relativo al grado de contribución de las distintas fuentes de MeO- y OH-PBDE.

Este estudio se diseñó y desarrolló para evaluar la presencia de PBDE, MeO-PBDE y OH-PBDE en muestras biológicas y para analizar sus fuentes originales, con especial interés en aquellas relativas al origen antropogénico. Por ello se seleccionaron: i) una matriz biológica de agua dulce, tratando de evitar el aporte debido a la bioacumulación con origen natural marino, ii) una especie bentónica, con alta posición en la cadena trófica y alta población en la zona de estudio y iii) unos puntos de muestreo capaces de recoger la influencia de las actividades antrópicas. Se eligió el pez gato (*Ameiurus nebulosus*, ver figura 5.11) por ser una especie típicamente bentónica (US EPA, 2002) que habita en los fondos ricos en sedimentos y lodos y que tolera altos niveles de contaminación y de CO<sub>2</sub> y bajos niveles de oxígeno (Scarola, 1987; FishBase, 2001; Ross, 2001). De hecho, se han detectado algunos ejemplares alimentándose en efluentes de aguas residuales (Klaberg y Benson, 1975). Esta especie suele permanecer enterrada en los sedimentos de los fondos acuáticos durante largos periodos de tiempo, especialmente en aguas frías (Loeb 1964) como son las del lago Ontario.



**Figura 5.11.** Pez gato (*Ameiurus nebulosus*).

Según Klaberg y Benson, 1975, en condiciones normales esta especie se alimenta principalmente de vegetales (54 %), invertebrados (23 %), detritos (22 %) y peces (1 %). Sin embargo, estos mismos autores publicaron que peces recogidos cerca de efluentes de aguas residuales, presentaban en su estómago una gran cantidad de lodos y de organismos invertebrados asociados al lodo. Por este motivo, han sido muy utilizados para evaluar patrones de bioacumulación en estudios de campo en los Grandes Lagos (IJC, 1989).



**Figura 5.12.** Puntos de captura de los ejemplares analizados: A) Toronto Island, B) Tommy Thompson Park y C) Frenchman's Bay.

La presencia de contaminantes en peces de esta especie resulta un buen indicador de bioacumulación o metabolismo referido a fuentes geográficamente puntuales, ya que como no desarrollan migraciones ni por estaciones ni para la cría y sólo se movilizan hacia aguas más

profundas para hibernar o escapar de bajas temperaturas y hielos (US EPA, 2002), pueden recoger y/o metabolizar contaminantes presentes en su hábitat.

En la figura 5.12 se muestran los tres puntos de muestreo considerados en el presente estudio: Toronto Island, Tommy Thomson Park y Frenchman's Bay. Los dos primeros se seleccionaron por estar claramente influenciados por la ciudad de Toronto y el tercero, Frenchman's Bay, situado a 40 Km de Toronto, fue elegido como nivel de fondo. Las capturas se realizaron en octubre de 2006, mediante pesca electrónica. Se seleccionaron ejemplares adultos (entre 6 y 8 años) y por tanto sexualmente maduros (> 3 años, Scarola et al., 1987), obteniéndose finalmente un total de 117, cuyas características biológicas se resumen en la tabla 5.9.

La extracción de la sangre de la vena caudal se realizó *in situ*, recogiendo ésta en viales con heparina, para evitar la coagulación y centrifugándose inmediatamente después. Las muestras se mantuvieron en hielo y se trasladaron al laboratorio, donde el plasma fue separado y congelado con nitrógeno líquido. Finalmente se almacenaron a -80 °C hasta el momento de su análisis. Debido a la pequeña cantidad de plasma obtenido de cada ejemplar, las 117 muestras se combinaron para dar lugar a 19, diferenciando y clasificando entre sexos y puntos de muestreo.

**Tabla 5.9.** Resumen de las características biológicas de las muestras analizadas de acuerdo con los puntos de muestreo seleccionados.

	Frenchman's Bay (n=6) <sup>a</sup>		Toronto Island (n=7) <sup>a</sup>		Tommy Thomson Park (n=6) <sup>a</sup>	
	media	(min-max)	media	(min-max)	media	(min-max)
Longitud (cm)	32.3	(30.1 - 35.5)	33.2	(30.6 - 35.6)	27.6	(26.2 - 29.7)
Peso (g)	467.6	(365.7 - 546.0)	520.3	(430.0 - 645.1)	292.5	(230.7 - 387.2)
Peso gónadas (g)	3.11	(0.73 - 7.03)	3.66	(0.60 - 0.11)	2.28	(0.36 - 5.01)
GSI <sup>b</sup>	0.69	(0.15 - 1.29)	0.71	(0.11 - 1.36)	0.83	(0.12 - 1.59)
Peso hígado (g)	11.3	(9.2 - 13.6)	10.7	(8.3 - 14.0)	8.28	(6.4 - 10.6)
LSI <sup>c</sup>	2.42	(2.21 - 2.59)	2.16	(1.72 - 2.42)	2.82	(2.61 - 3.11)
Edad (años)	6.4	(6.0 - 6.8)	6.9	(6.1 - 7.5)	7.6	(7.3 - 7.6)
Porcentaje lipídico del plasma (%)	1.48	(0.99 - 1.91)	0.89	(0.64 - 1.14)	1.46	(1.04 - 2.33)

<sup>a</sup> número de muestras

<sup>b</sup> GSI = (Peso gónadas/ Peso) x 100

<sup>c</sup> LSI = (Peso hígado/ Peso) x 100

### 5.2.1.- Análisis de PBDE, MeO-PBDE y OH-PBDE en plasma de pez gato (*Ameiurus nebulosus*) del lago Ontario

En la tabla 5.10. se muestran de manera detallada las condiciones para la extracción, purificación, fraccionamiento y análisis instrumental de las muestras de plasma.

**Tabla 5.10.** Etapas de extracción, purificación, fraccionamiento, análisis instrumental y cuantificación de PBDE, MeO-PBDE y OH-PBDE en plasma de pez gato.

EXTRACCIÓN	FRACCIONAMIENTO Y PURIFICACIÓN	ANÁLISIS INSTRUMENTAL	CUANTIFICACIÓN
<p><b>1) Desnaturalización</b> ~2.7 g plasma + HCl (1 mL) + 2-propanol (6 mL)</p> <p><b>2) Extracción fase orgánica</b> Extracción líquido-líquido con 6 y 4 mL (hexano : metil ter-butil éter (1:1 v/v))</p> <p><b>3) Lavado</b> Fase orgánica + 4 mL KCl (1 %).</p> <p><b>4) Porcentaje de lípidos</b>  Reducción a sequedad y determinación del porcentaje de lípidos.</p> <p>Redisolución con hexano : metil terbutil éter (1:1 v/v).</p>	<p><b>1) Fraccionamiento</b>  Columna 1.5 g Florisil<sup>®</sup> (activada 450 °C durante 12 h y desactivada al 0.5 % con agua) + 2 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></p> <p>Elución fracción A (PBDE y MeO-PBDE) mediante: 11 mL hexano : diclorometano (3:1 v/v) 2 mL hexano : acetona (85:15 v/v)</p> <p>Elución fracción B (OH-PBDE) mediante: 4 mL hexano: acetona (85:15 v/v) 10 mL diclorometano : metanol (88:12 v/v)</p> <p><b>2) Derivatización</b>  Fracción B. Sequedad + 1 mL CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub> (2 h) + 10 mL hexano y concentración a 4 mL</p> <p><b>3) Tratamiento ácido</b> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado</p> <p><b>4) Columna sílice ácida</b> 1 g sílice ácida (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 33 % en peso)</p> <p><b>5) Columna sílice neutra</b> 1 g sílice neutra</p>	<p><b>PBDE</b></p> <p><b>HRGC:</b> Agilent 6890 GC <u>Gas portador:</u> He <u>Flujo volumétrico:</u> 1 ml/min constante <u>Columna:</u> DB -5MS (15 m; 0.25 mm d.i. y 0.10 µm espesor fase estacionaria) <u>Inyector:</u> Split/Splitless 280 °C <u>Volumen de inyección:</u> 1 µL <u>Horno:</u> 100 °C (2 min), 25 °C/min hasta 250 °C, 1.5 °C/min hasta 260 °C, 25 °C/min hasta 325 °C (10 min)</p> <p><b>HRMS:</b> Autospec Ultima (EI, resolución &gt; 10000, 10% valle) <u>Línea de transferencia:</u> 280 °C <u>Fuente:</u> 250 °C</p> <p><b>MeO-PBDE e OH-PBDE metilados</b></p> <p><b>HRGC:</b> Agilent 6890 GC <u>Gas portador:</u> He <u>Flujo volumétrico:</u> 1 ml/min constante <u>Columna:</u> DB -5MS (60 m; 0.25 mm d.i. y 0.25 µm espesor fase estacionaria) <u>Inyector:</u> Split/Splitless 280 °C <u>Volumen de inyección:</u> 1 µL <u>Horno:</u> 110 °C (1 min), 20 °C/min hasta 170 °C, 20 °C/min hasta 300 °C (15 min)</p> <p><b>HRMS:</b> Autospec Ultima (EI, resolución &gt; 10000, 10% valle) <u>Línea de transferencia:</u> 280 °C <u>Fuente:</u> 250 °C</p>	<p><b>PBDE:</b> Patrón Interno <b>MeO-PBDE:</b> Patrón Interno (dilución isotópica)</p> <p><u>Patrones de extracción:</u> <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-6'-MeO-BDE-100 y <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-6'-OH-BDE-100 DBDPE</p> <p><u>Patrón de inyección:</u> <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-6-MeO-BDE-47</p> <p><u>Rectas de calibrado:</u> <b>PBDE</b> Recta BFR-CVS, <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-6'-MeO-BDE-100 y <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-6-MeO-BDE-47 (Wellington Laboratories) <b>MeO-PBDE y OH-PBDE metilados</b> <sup>12</sup>C<sub>13</sub>-2'-MeO-BDE-3, <sup>12</sup>C<sub>13</sub>-2'-MeO-BDE-7, <sup>12</sup>C<sub>13</sub>-3'-MeO-BDE-7, <sup>12</sup>C<sub>13</sub>-2'-MeO-BDE-28, <sup>12</sup>C<sub>13</sub>-3'-MeO-BDE-28, <sup>12</sup>C<sub>13</sub>-4'-MeO-BDE-17, <sup>12</sup>C<sub>13</sub>-2'-MeO-BDE-68, <sup>12</sup>C<sub>13</sub>-6-MeO-BDE-47, <sup>12</sup>C<sub>13</sub>-3-MeO-BDE-47, <sup>12</sup>C<sub>13</sub>-5-MeO-BDE-47, <sup>12</sup>C<sub>13</sub>-4'-MeO-BDE-49, <sup>12</sup>C<sub>13</sub>-5'-MeO-BDE-100, <sup>12</sup>C<sub>13</sub>-4'-MeO-BDE-103, <sup>12</sup>C<sub>13</sub>-6'-MeO-BDE-99, <sup>12</sup>C<sub>13</sub>-5'-MeO-BDE-99, <sup>12</sup>C<sub>13</sub>-4'-MeO-BDE-90, <sup>12</sup>C<sub>13</sub>-4'-MeO-BDE-101, <sup>12</sup>C<sub>13</sub>-6-MeO-BDE-85, <sup>12</sup>C<sub>13</sub>-6-MeO-BDE-82, <sup>12</sup>C<sub>13</sub>-4-MeO-BDE-42, <sup>12</sup>C<sub>13</sub>-4-MeO-BDE-140, <sup>12</sup>C<sub>13</sub>-6-MeO-BDE-157, <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-6'-MeO-BDE-100 y <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-6-MeO-BDE-47 (Wellington Laboratories y Accustandard In.)</p>

### **Extracción**

Se realizaron dos pasos previos a la extracción. Primero las muestras de plasma (~ 2.5 g m.h.) se marcaron con los patrones de extracción ( $^{13}\text{C}_{12}$  6'-MeO-BDE-100 y  $^{13}\text{C}_{12}$  6'-OH-BDE-100) y seguidamente las proteínas se desnaturalizaron mediante la adición de ácido clorhídrico (1 mL) y 2-propanol (6 mL). La adición del ácido disminuye el pH de la solución formando grupos protonados que causan repulsiones dentro de la estructura de las proteínas, disminuyendo la estabilidad en disolución de las mismas, perdiendo su estructura nativa y precipitando (Garrido y Teijón, 2006; Voet, 2006). El alcohol a su vez compite en las interacciones de solvatación de la proteínas, estabilizando las partes hidrofóbicas y facilitando su precipitación (Bolen 2004; Michaux et al., 2008).

La fase orgánica se extrajo (extracción líquido-líquido) dos veces (6 y 4 mL) con una mezcla de hexano : metil ter-butil éter (1:1 v/v) y posteriormente se lavó con 4 mL de cloruro potásico (1 %). Finalmente se llevó a sequedad para la determinación gravimétrica del porcentaje de lípidos.

### **Fraccionamiento, derivatización y purificación**

El fraccionamiento se realizó por cromatografía de adsorción sólido-líquido en una columna de Florisil<sup>®</sup> eluida a presión atmosférica. La columna se preparó con 1.5 g de Florisil<sup>®</sup> acondicionado a 450 °C durante 12 horas y desactivado al 0.5 % en peso con agua, seguido de 2 g de sulfato sódico anhidro. Posteriormente se acondicionó con 10 mL de hexano : diclorometano (3:1 v/v). Se obtuvieron dos fracciones:

Fracción A: Elución de PBDE y MeO-PBDE mediante la adición de 11 mL de hexano: diclorometano (3:1 v/v) y 2 mL de hexano : acetona (85:15 v/v).

Fracción B: Elución de OH-PBDE mediante la adición de 4 mL de hexano : acetona (85:15 v/v) y 10 mL de diclorometano : metanol (88:12 v/v).

La fracción B se redujo a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se derivatizó mediante la adición de diazometano, preparado *in situ* (Fieser y Fieser, 1967). La derivatización se realizó durante 2 h, aunque estudios previos realizados por Athanasiadou et al., 2008, han demostrado que en 30 min se produce la metilación cuantitativa. El exceso de diazometano y éter se eliminó mediante la adición de 10 mL de hexano seguida de evaporación bajo corriente de nitrógeno y calentamiento por baño de agua (30 °C), hasta ~ 4 mL.

Ambas fracciones se purificaron en dos etapas: i) tratamiento ácido y ii) cromatografía de adsorción en sólido-líquido en columnas eluidas a presión atmosférica.

### **Tratamiento ácido**

Los lípidos presentes en los extractos de ambas fracciones (~ 4 mL en hexano) se eliminaron mediante la adición de 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, separando la fase orgánica y lavando la acuosa con 4 mL de hexano. Ambas fases orgánicas se combinaron (~ 8 mL en hexano) y redujeron hasta ~1 mL, bajo corriente de nitrógeno y calentamiento por baño de agua (30 °C).

### **Cromatografía de adsorción sólido-líquido en columna a presión atmosférica (sílice ácida y sílice neutra)**

Una primera columna cromatográfica fue preparada con 1 g de sílice ácida (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 33 % en peso) seguido de 0.5 g sulfato sódico anhidro y posteriormente eluida con 6 mL de ciclohexano : diclorometano (1:1 v/v) y 10 mL de diclorometano. Ambas eluciones se combinaron y redujeron hasta ~ 0.5 mL.

Una segunda columna fue preparada con 1 g de sílice neutra seguido de 0.5 g de sulfato sódico anhidro y eluida con 3 mL de ciclohexano, que se descartaron y 6 mL de diclorometano, que fueron recogidos y concentrados hasta sequedad bajo corriente de nitrógeno y calentamiento por baño de agua (30 °C). Ambas fracciones se redisolvieron con 50 µL de isooctano que contenía <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-6-MeO-BDE-47 como patrón de inyección.

### **Análisis instrumental**

A partir de una revisión bibliográfica se concluyó que los niveles de concentración esperados para PBDE, MeO-PBDE y OH-PBDE en plasma de pez gato, eran del orden de pg/g m.h. Por este motivo la determinación instrumental de las fracciones A (conteniendo PBDE y MeO-PBDE) y B (conteniendo OH-PBDE como MeO-PBDE) se realizó en un espectrómetro de masas de alta resolución, con analizador triple sector (EBE), trabajando en ionización electrónica. La separación cromatográfica de los distintos congéneres se realizó en un cromatógrafo de gases (Agilent 6890GC), equipado con columnas DB-5-MS (J&W Scientific, Folsom, CA). Para los PBDE se utilizó una columna de 15 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.10 µm de espesor de fase estacionaria, mientras que en el caso de los MeO-PBDE se recurrió a una columna de 60 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de fase estacionaria.

En las tablas 5.11 y 5.12 se recogen las masas seleccionadas en el registro selectivo de iones y los tiempos de retención obtenidos para PBDE y MeO-PBDE bajo las condiciones cromatográficas descritas en la tabla 5.10.



**Tabla 5.11.** Tiempos de retención y masas seleccionadas en el registro selectivo de iones realizado en el análisis de PBDE en plasma de pez gato (HRMS).

Grado de bromación	Compuesto	Tiempo de retención (min)	Iones <sup>a</sup>	
monoBDE	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-1	4.32	247.9836, <b>249.9816</b>	[M] <sup>+</sup> , [M+2] <sup>+</sup>
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-2	4.39		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-3	4.47		
diBDE	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-7	5.29	325.8942, <b>327.8921</b>	[M] <sup>+</sup> , [M+2] <sup>+</sup>
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-10	5.53		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-15	5.80		
triBDE	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-17	6.25	405.8027, <b>407.8006</b>	[M+2] <sup>+</sup> , [M+4] <sup>+</sup>
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-28	6.59		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-30	6.72		
tetraBDE	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-47	7.55	483.7132, <b>485.7111</b>	[M+2] <sup>+</sup> , [M+4] <sup>+</sup>
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-66	7.68		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-77	7.84		
pentaBDE	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-100	8.17	563.6216, <b>565.6196</b>	[M+4] <sup>+</sup> , [M+6] <sup>+</sup>
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-119	8.23		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-99	8.36		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-85	8.79		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-126	8.86		
hexaBDE	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-154	9.05	641.5321, <b>643.5301</b>	[M+4] <sup>+</sup> , [M+6] <sup>+</sup>
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-153	9.47		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-139	9.66		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-140	9.88		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-138	10.16		
heptaBDE	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-184	10.80	721.4405, <b>723.4386</b>	[M+6] <sup>+</sup> , [M+8] <sup>+</sup>
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-183	11.20		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-191	11.81		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-180	12.07		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-171	12.70		
octaBDE	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-201	14.12	799.3510, <b>801.3491</b>	[M+6] <sup>+</sup> , [M+8] <sup>+</sup>
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-197	14.70		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-203	14.99		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-196	15.19		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-205	15.63		
nonaBDE	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-208	16.73	879.2596, <b>881.2575</b>	[M+8] <sup>+</sup> , [M+10] <sup>+</sup>
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-207	16.84		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-206	17.08		
decaBDE	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -BDE-209	18.24	957.1701, <b>959.1681</b>	[M+8] <sup>+</sup> , [M+10] <sup>+</sup>

<sup>a</sup> iones cuantificadores (negrita) y cualificadores (normal).

**Tabla 5.12.** Tiempos de retención y masas seleccionadas en el registro selectivo de iones realizado en el análisis de MeO-PBDE y OH-PBDE metilados en plasma de pez gato (HRMS).

Grado de bromación	Compuesto	Tiempo de retención <sup>a</sup> (min)	Iones <sup>b</sup>	
monoMeO	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -2'-MeO-BDE-3	21.79	<b>277.9942</b> , 279.9923	[M] <sup>+</sup> , [M+2] <sup>+</sup>
diMeO	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -2'-MeO-BDE-7	30.64	355.9048, <b>357.9027</b>	[M] <sup>+</sup> , [M+2] <sup>+</sup>
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -3'-MeO-BDE-7	32.78		
triMeO	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -2'-MeO-BDE-28	42.44	<b>435.8133</b> , 437.8113	[M] <sup>+</sup> , [M+2] <sup>+</sup>
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -4'-MeO-BDE-17	44.29		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -3'-MeO-BDE-28	44.51		
tetraMeO	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -6-MeO-BDE-47	50.54	527.7620, <b>529.7599</b>	[M+2] <sup>+</sup> , [M+4] <sup>+</sup>
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -2'-MeO-BDE-68	49.35	513.7237, <b>515.7217</b>	[M+2] <sup>+</sup> , [M+4] <sup>+</sup>
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -6-MeO-BDE-47	50.54		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -3-MeO-BDE-47	52.44		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -5-MeO-BDE-47	52.88		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -4'-MeO-BDE-49	53.35		
<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -4-MeO-BDE-42	57.71			
pentaMeO	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -6'-MeO-BDE-100	56.25	<b>605.6725</b> , 607.6704	[M+4] <sup>+</sup> , [M+6] <sup>+</sup>
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -5'-MeO-BDE-100	57.91	<b>593.6323</b> , 595.6302	[M+4] <sup>+</sup> , [M+6] <sup>+</sup>
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -4'-MeO-BDE-103	58.46		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -6'-MeO-BDE-99	58.74		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -5'-MeO-BDE-99	61.44		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -4'-MeO-BDE-90	61.69		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -4'-MeO-BDE-101	61.91		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -6-MeO-BDE-85	62.87		
<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -6-MeO-BDE-82	63.95			
hexaMeO	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -4-MeO-BDE-140	68.32	<b>671.5427</b> , 673.5408	[M+4] <sup>+</sup> , [M+6] <sup>+</sup>
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> -6-MeO-BDE-157	73.49		

<sup>a</sup> iones cuantificadores (negrita) y cualificadores (normal).

### Evaluación de la calidad del análisis de PBDE, MeO-PBDE y OH-PBDE en plasma de pez gato (*Ameiurus nebulosus*)

#### Linealidad, repetitividad, reproducibilidad y límites de detección

Para asegurar la cuantificación fidedigna de los distintos analitos, se establecieron los siguiente criterios en los métodos optimizados: linealidad en el intervalo de cuantificación (> 0.99), repetitividad (RSD < 10 %) y reproducibilidad (RSD < 20 %), ver tabla 5.13. En la misma tabla se recogen los límites de detección, definidos como menor concentración que presenta una relación Señal / Ruido igual a 3.

#### Identificación

Se utilizaron tres criterios para asegurar la correcta identificación y cuantificación de los analitos: i) la diferencia entre el tiempo de retención del compuesto de interés y de su patrón no debe ser superior a 1 s, ii) la relación isotópica entre el ión cualificador y cuantificador del analito debe estar dentro del 15% del valor teórico, iii) la relación Señal / Ruido del ión cuantificador debe ser mayor a 5.

**Tabla 5.13.** Intervalo de concentración de la calibración (pg/  $\mu$ L), linealidad ( $R^2$ ), repetitividad (% RSD; n=5), reproducibilidad (% RSD; n=5) y límites de detección (LOD) de los métodos optimizados.

		Intervalo de concentración pg/ $\mu$ L	$R^2$	Repetitividad RSD (%)	Reproducibilidad RSD (%)	LOD S/N=3 (fg/g m.h)
PBDE	BDE-1	0.25 – 100	0.997	2.1	5.4	3.5
	BDE-2	0.25 – 100	0.998	3.5	3.7	5.4
	BDE-3	0.25 – 100	0.995	2.7	4.9	2.0
	BDE-7	0.25 – 100	0.998	3.0	7.8	9.8
	BDE-10	0.25 – 100	0.996	1.5	5.7	6.7
	BDE-15	0.25 – 100	0.997	2.4	8.7	5.1
	BDE-17	0.25 – 100	0.997	1.8	6.7	3.9
	BDE-28	0.25 – 100	0.997	1.5	5.4	1.2
	BDE-30	0.25 – 100	0.998	2.1	5.0	5.7
	BDE-47	0.50 – 200	0.999	1.0	4.6	9.0
	BDE-66	0.50 – 200	0.998	3.1	5.8	6.7
	BDE-77	0.50 – 200	0.997	4.8	3.7	5.7
	BDE-100	0.50 – 200	0.999	2.6	5.5	6.8
	BDE-119	0.50 – 200	0.998	2.8	6.7	7.8
	BDE-99	0.50 – 200	0.999	2.5	4.6	5.0
	BDE-85	0.50 – 200	0.997	2.0	5.9	6.3
	BDE-126	0.50 – 200	0.999	2.7	7.1	7.1
	BDE-154	0.50 – 200	0.997	2.8	4.2	5.1
	BDE-153	0.50 – 200	0.999	3.4	3.0	4.3
	BDE-139	0.50 – 200	0.998	2.9	6.4	5.1
	BDE-140	0.50 – 200	0.997	4.2	5.7	8.1
	BDE-138	0.50 – 200	0.997	2.0	4.8	5.9
	BDE-184	1.00 – 400	0.999	3.7	5.7	8.5
	BDE-183	1.00 – 400	0.998	5.4	7.2	2.1
	BDE-191	1.00 – 400	0.999	5.1	7.9	3.5
	BDE-180	1.00 – 400	0.996	3.1	8.8	4.5
	BDE-171	1.00 – 400	0.997	5.5	5.0	3.0
	BDE-201	1.00 – 400	0.998	3.2	5.9	7.6
	BDE-197	1.00 – 400	0.999	4.7	5.5	6.0
BDE-203	1.00 – 400	0.997	2.1	6.8	5.4	
BDE-196	1.00 – 400	0.996	2.8	3.4	6.7	
BDE-205	1.00 – 400	0.999	3.1	6.9	7.5	
BDE-208	2.50 – 1000	0.999	4.0	7.1	5.6	
BDE-207	2.50 – 1000	0.998	5.1	8.9	8.7	
BDE-206	2.50 – 1000	0.997	5.1	6.7	6.0	
BDE-209	2.50 – 1000	0.997	4.1	5.0	7.4	
MeO-PBDE	2'-MeO-BDE-3	5 – 500	0.999	3.7	6.7	7.8
	2'-MeO-BDE-7	5 – 500	0.997	2.7	5.0	9.7
	3'-MeO-BDE-7	5 – 500	0.999	1.6	5.6	10.8
	2'-MeO-BDE-28	5 – 500	0.996	2.7	2.1	6.8
	3'-MeO-BDE-28	5 – 500	0.999	1.8	5.9	5.3
	4'-MeO-BDE-17	5 – 500	0.995	2.0	4.6	6.7
	2'-MeO-BDE-68	5 – 500	0.997	2.3	5.7	12.5
	6-MeO-BDE-47	5 – 500	0.997	2.4	8.9	13.8
	3-MeO-BDE-47	5 – 500	0.998	2.9	5.1	8.9
	5-MeO-BDE-47	5 – 500	0.999	1.8	4.0	6.8
	4'-MeO-BDE-49	5 – 500	0.997	2.9	3.8	9.7
	5'-MeO-BDE-100	5 – 500	0.998	3.6	2.6	11.0
	4'-MeO-BDE-103	5 – 500	0.999	3.1	4.3	13.9
	6'-MeO-BDE-99	5 – 500	0.997	3.9	5.8	14.8
	5'-MeO-BDE-99	5 – 500	0.998	2.8	6.9	5.8
	4'-MeO-BDE-90	5 – 500	0.995	2.5	5.7	8.7
	4'-MeO-BDE-101	5 – 500	0.996	2.4	6.1	9.8

6-MeO-BDE-85	5 – 500	0.997	2.1	4.3	7.0
6-MeO-BDE-82	5 – 500	0.999	2.0	5.1	10.2
4-MeO-BDE-42	5 – 500	0.999	1.1	6.0	12.7
4-MeO-BDE-140	5 – 500	0.998	1.9	5.8	5.4
6-MeO-BDE-157	5 – 500	0.997	2.6	4.2	8.7

### Recuperación de los patrones de extracción

Se obtuvieron unas recuperaciones medias (tasas de recuperación del patrón de extracción calculadas a partir del patrón de inyección) de  $72 \pm 9$  % (media  $\pm$   $\delta$ ) para  $^{13}\text{C}_{12}$ -6'-MeO-BDE-100 y  $56 \pm 15$  % (media  $\pm$   $\delta$ ) para el  $^{13}\text{C}_{12}$ -6'-OH-BDE-100.

### Blancos

Se analizaron dos tipos de blancos: i) blancos de procedimiento, preparados y analizados bajo las mismas condiciones que las muestras (utilizando tierra de diatomea como matriz) y ii) blancos instrumentales, inyecciones de nonano realizadas entre las muestras durante el análisis instrumental para detectar un posible efecto memoria en el instrumento. No se encontraron niveles de PBDE, MeO-PBDE ni OH-PBDE en los blancos de procedimiento ni en los blancos instrumentales.

### Validación

Hasta donde el autor conoce no existe ningún material de referencia, plasma de peces de agua dulce, con niveles certificados para MeO-PBDE ni para OH-PBDE, ni se ha organizado ningún ejercicio intercomparativo en el que se evalúen estos compuestos.

### 5.2.2.- Niveles de PBDE, MeO-PBDE y OH-PBDE en plasma de pez gato (*Ameiurus nebulosus*) del lago Ontario

En la tabla 5.14 se resumen los resultados obtenidos para PBDE, MeO-PBDE y OH-PBDE en los tres puntos de muestreo considerados. Los resultados completos se describen en el punto 4.5 (*Capítulo 4. Discusión*) de esta memoria. El porcentaje lipídico del plasma no se correlaciona con las concentraciones de los analitos y por lo tanto las concentraciones se han expresado en masa húmeda (m.h).

Los congéneres cuyo tiempo de retención coincidió ( $\pm 1s$ ) con los de los patrones se cuantificaron como “identificados”, mientras que aquellos que mantenían la relación de iones de los patrones pero cuyos tiempos de retención no coincidían se cuantificaron como “desconocidos”.

#### **PBDE**

De los 36 congéneres de PBDE evaluados sólo se detectaron 6 (BDE-47, -100, -99, -153, -154 y -183). Estos congéneres se cuantificaron en todas las muestras con un intervalo de concentración para el total de PBDE que varía desde 3.3 hasta 9.0 ng/g m.h. Los valores de la media y la mediana para estas concentraciones se situaron en 5.0 y 4.9 ng/g m.h., respectivamente. Valters et al., 2005, publicaron niveles de PBDE y OH-PBDE en plasma de distintas especies de peces del río Detroit (los niveles de MeO-PBDE se encontraron por debajo de los límites de detección). Evaluaron, entre otras, dos muestras de pez gato preparadas a partir de 4 ejemplares, obteniendo una media para el total de PBDE (BDE-47, BDE-99, BDE-100, BDE-153, y BDE-154) de 1.7 ng/g m.h. Las posibles razones que pueden explicar esta diferencia se discuten más adelante.

Todas las muestras presentaron un patrón de congéneres similar, siendo mayoritarios los congéneres BDE-47 ( $39.1 \pm 8.1$  %; media  $\pm \delta$ ) y BDE-99 ( $35.5 \pm 5.2$  %; media  $\pm \delta$ ), seguidos del BDE-100 ( $12.7 \pm 2.7$  %; media  $\pm \delta$ ), BDE-153 ( $6.2 \pm 1.9$  %; media  $\pm \delta$ ), BDE-184 ( $5.7 \pm 2.6$  %; media  $\pm \delta$ ) y BDE-183 ( $0.8 \pm 0.4$  %; media  $\pm \delta$ ). Este patrón de congéneres coincide con el publicado por Valters et al., (2005) y también se puede relacionar con el descrito por La Guardia et al., (2006), para los preparados comerciales del tipo PentaBDE (40.5% BDE-47, 46.7% BDE-99, 10.5% BDE-100, 5.4% BDE-153 y 3.6% BDE-154; contribuciones medias para las mezclas DE 71 y Bromkal 70-5DE).

**Tabla 5.14.** Resumen de las concentraciones (ng/g m.h.) de PBDE, OH-PBDE y MeO-PBDE en los puntos de muestreo analizados. Sólo se incluyen congéneres detectados.

Compuestos		Frenchman's Bay (n = 6)		Toronto Island (n = 7)		Tommy Thomson Park (n = 6)	
		media	(min-max)	media	(min-max)	media	(min-max)
<b>PBDE</b>							
Tetra	BDE-47	2.21	(1.36 - 3.00)	1.53	(1.10 - 2.01)	2.12	(1.58 - 2.50)
Penta	BDE-100	0.75	(0.56 - 0.98)	0.74	(0.47 - 1.26)	0.43	(0.28 - 0.53)
	BDE-99	1.60	(1.15 - 2.05)	2.02	(1.16 - 3.28)	1.68	(1.39 - 1.90)
Hexa	BDE-153	0.36	(0.26 - 0.51)	0.4	(0.19- 1.03)	0.21	(0.15 - 0.29)
	BDE-154	0.26	(0.12 - 0.36)	0.43	(0.16 - 1.30)	0.22	(0.15 - 0.30)
Hepta	BDE-183	0.03	(0.01 - 0.04)	0.06	(0.02 - 0.15)	0.04	(0.03 - 0.06)
	Total PBDE	5.21	(3.78 - 6.02)	5.18	(3.33- 9.02)	4.69	(3.69 - 5.40)
<b>OH-PBDE</b>							
Tri	2'- OH-BDE-28	n.d.		0.009	(0.006 - 0.016)	0.013	(0.006 - 0.022)
	4'- OH-BDE-17	0.002	(n = 1)	0.018	(0.009 - 0.037)	0.033	(0.006 - 0.072)
	No identificados	0.075	(n = 1)	0.041	(0.001-0.14)	0.054	(0.016 - 0.106)
Tetra	2'-OH-BDE-68	n.d.		0.022	(0.013 - 0.034)	0.023	(0.009 - 0.052)
	6- OH-BDE-47	0.043	(0.01 - 0.15)	0.83	(0.18 - 2.55)	1.09	(0.26 - (2.77))
	5- OH- BDE-47	0.011	(n = 1)	n.d.		0.011	(n = 1)
	4'- OH-BDE-49	0.15	(0.07 - 0.35)	0.24	(0.060 - 0.50)	0.24	(0.055 - 0.453)
	4- OH-BDE-42	0.012	(0.008 - 0.018)	0.014	(0.009 - 0.026)	0.005	(n = 1)
Penta	No identificados	0.026	(0.014 - 0.043)	0.04	(0.002 - 0.10)	0.038	(0.010 - 0.107)
	4'- OH-BDE-101	0.044	(0.025 - 0.064)	0.063	(0.021 - 0.14)	0.029	(0.022 - 0.037)
Hexa	No identificados	n.d.		0.164	(0.118 - 0.211)	0.04	(0.022 - 0.070)
	No identificados	n.d.		0.029	(n = 1)	n.d.	
	Total identificados OH-PBDE	0.24	(n.d. - 0.51)	1.15	(0.31 - 3.10)	1.42	(0.37 - 3.36)
	Total no identificados OH-PBDE	0.03	(n.d. - 0.04)	0.13	(0.003-0.35)	0.11	(0.05 - 0.21)
	Total OH-PBDE	0.27	(n.d. - 0.55)	1.28	(0.33 - 3.34)	1.53	(0.42 - 3.58)
	Total ident/Total OH-PBDE	0.90	(0.87 - 0.92)	0.89	(0.75 - 1.00)	0.91	(0.86 - 0.95)
	Total OH-PBDE/ Total PBDE	0.05	(0.02 - 0.13)	0.25	(0.08 - 0.67)	0.35	(0.09 - 0.97)
<b>MeO-PBDE</b>							
Di	No identificados	n.d.		0.006	(n = 1)	n.d.	
Tri	2'- MeO-BDE-28	0.003	(n = 1)	n.d.		n.d.	
	4'- MeO-BDE-17	0.001	(n = 1)	n.d.		n.d.	
Tetra	2'-MeO-BDE-68	0.003	(0.001 - 0.004)	0.012	(0.002 - 0.021)	0.004	(0.002 - 0.008)
	6- MeO-BDE-47	0.008	(0.005 - 0.014)	0.028	(0.006 - 0.076)	0.036	(0.006 - 0.089)
	No identificados	n.d.		0.009	(n = 1)	n.d.	
Penta	4'- MeO-BDE-103	n.d.		0.002	(n = 1)	n.d.	
	Total MeO-PBDE identificados	0.01	(n.d. - 0.017)	0.037	(0.008 -0.097)	0.034	(0.008 - 0.089)
	Total MeO-PBDE	n.d.		0.016	(n = 1)	n.d.	
	Total MeO-PBDE	0.01	(n.d. - 0.017)	0.039	(0.008 - 0.097)	0.034	(0.008 - 0.089)
	Total ident/ Total MeO-PBDE	1.00		0.95	(0.64 - 1.00)	1.00	
	Total MeO-PBDE/ Total PBDE	0.002	(0.001 - 0.003)	0.008	(0.001 - 0.02)	0.007	(0.002 - 0.018)

n.d. = no detectados

**MeO-PBDE**

De los 20 congéneres de MeO-PBDE evaluados sólo se identificaron 5 (2'- MeO-BDE-28, 4'- MeO-BDE-17, 2'-MeO-BDE-68, 6- MeO-BDE-47 y 4'- MeO-BDE-103). Además se cuantificaron 3 picos como concentración no identificada. Las concentraciones identificadas y no identificadas se sumaron obteniéndose un intervalo de concentración para el total de MeO-PBDE que varía desde no detectado (n.d.) hasta 0.10 ng/g m.h. ( $0.03 \pm 0.03$  ng/g m.h.; media  $\pm \delta$ ) para las hembras y desde 0.01 hasta 0.09 ng/g m.h. ( $0.02 \pm 0.03$  ng/g m.h.; media  $\pm \delta$ ) para los machos. Estos niveles son menores que los publicados por Kierkegaard et al., (2004a) en lucios recogidos entre 1969 y 2000 en distintos lagos de Suecia. La suma de 2'-MeO-BDE-68 y 6- MeO-BDE-47 en los lucios disminuye desde 5.4 ng/g m.h. en 1966 hasta 0.5 ng/g m.h. en el año 2000. Hasta donde el autor conoce éste es el primer estudio que presenta niveles de MeO-PBDE en pez gato.

Se encontró un patrón de congéneres común en todas las muestras, tanto hembras como machos, recogidas en los tres puntos evaluados. Los congéneres mayoritarios fueron tetra bromados, 2'-MeO-BDE-68 y 6- MeO-BDE-47, coincidiendo con los datos publicados por Kierkegaard et al., (2004a), en lucios, donde estos compuestos se detectaron en todas las muestras. Ambos congéneres han sido también identificados en mamíferos marinos (Marsh et al., 2005; Stapleton et al., 2006), sin embargo, hasta donde el autor conoce éste es el primer estudio que identifica niveles de 2'- MeO-BDE-28 y 4'- MeO-BDE-103 en peces de agua dulce, aunque la contribución de estos congéneres al total de MeO-PBDE es muy baja y sólo se detectaron en 3 de las 19 muestras.

Para evaluar la importancia de la concentración debida a MeO-PBDE no identificados se calculó el cociente entre el total de MeO-PBDE identificados y el total de MeO-PBDE (suma de identificados y no identificados). De este modo se obtuvo un valor de  $0.98 \pm 0.08$  (media  $\pm \delta$ ), lo que significa que más del 90 % de la concentración reportada en los peces corresponde a congéneres para los que se dispuso de patrones, o lo que es lo mismo, está identificada.

**OH-PBDE**

De los 20 congéneres de OH-PBDE evaluados sólo se identificaron 8 (2'- OH-BDE-28, 4'- OH-BDE-17, 2'-OH-BDE-68, 6- OH-BDE-47, 5- OH- BDE-47, 4'- OH-BDE-49, 4- OH-BDE-42, 4'- OH-BDE-101). Además se cuantificaron 7 picos, como concentración no identificada. Como en el caso de los MeO-PBDE, las concentraciones identificadas y no identificadas se sumaron obteniéndose un intervalo de concentración para el total de OH-PBDE que varía desde n.d. hasta 3.6 ng/g m.h. ( $1.5 \pm 1.3$  ng/g m.h.; media  $\pm \delta$ ) para las hembras y desde 0.2 hasta 1.5 ng/g m.h. ( $0.7 \pm 0.5$  ng/g m.h.; media  $\pm \delta$ ) para los machos. Las concentraciones de OH-PBDE son entre 50 y 60 veces mayores que las obtenidas para MeO-PBDE.

Los niveles de OH-PBDE obtenidos en estas muestras son superiores a la media de OH-PBDE (12.8 pg/g m.h.; media del total OH-PBDE incluyendo 2'-OH-BDE-68, 6-OH-BDE-47, 4'-OH-BDE-49, 4-OH-BDE-42 y 2-OH-BDE-123) publicada por Valters et al., (2005) en el río Detroit. Este río está situado en una región altamente industrializada, por tanto cabría la posibilidad de esperar mayores concentraciones de OH-PBDE. Sin embargo este comportamiento está de acuerdo con los niveles de OH-PBDE (no se analizaron MeO-PBDE) encontrados por Ueno et al., (2008) en muestras abióticas (nieve, agua de lluvia y agua superficial de los lagos) en la zona de los Grandes Lagos, incluyendo el río Detroit y el lago Ontario. En dicho estudio los niveles máximos de concentración de OH-PBDE en nieve se encontraron en el lago Guelph, situado a 45 Km al norte del lago Ontario y a 65 km de dos de los puntos de muestreo de nuestro estudio (Toronto Island y Thommy Thompson Park). Los mismos autores encontraron niveles mayores de OH-PBDE en las aguas del lago Ontario comparadas con las del río Detroit. Ueno et al., (2008), sugieren que estas concentraciones podrían deberse a áreas densamente pobladas e identifican a las plantas de tratamiento de aguas y estabilización de los lodos como fuentes potenciales de OH-PBDE. Los tratamientos que se producen en las EDAR son altamente oxidantes, por tanto no es descartable que se produzcan OH-PBDE en sus efluentes (Hua et al., 2005), aunque una fracción de éstos ya podría encontrarse en el corriente de entrada de las plantas y podría deberse a varios procesos, entre ellos, la excreción animal y humana (Hakk et al., 2002 y 2006; Ueno et al., 2008).

Como en el caso de los MeO-PBDE se encontró un patrón de congéneres hidroxilados en todas las muestras, tanto hembras como machos, recogidos en los tres puntos de muestreo. Los congéneres mayoritarios fueron tetra bromados, 6-OH-BDE-47 y 4'-OH-BDE-49, detectados en 18 de las 19 muestras analizadas y cuyas concentraciones supusieron un  $76.8 \pm 13.6$  % (media  $\pm \delta$ ) del total de OH-PBDE. Este patrón se asemeja al publicado por Valters et al, (2005) donde la concentración resultante de 6-OH-BDE-47 y 4'-OH-BDE-49, supone un 75 % (media) del total de OH-PBDE. También se identificaron niveles de 2'-OH-BDE-28, 4'-OH-BDE-17, 2'-OH-BDE-68, 5-OH-BDE-47, 4-OH-BDE-42 y 4'-OH-BDE-101 en algunas muestras pero en mucha menor cantidad. El congénere 2'-OH-BDE-68 se ha detectado frecuentemente en peces (Asplund et al., 1999; Marsh et al., 2004)

### **Análisis de Componentes Principales (ACP)**

Con objeto de analizar las posibles relaciones entre las características biológicas de las muestras y las concentraciones de PBDE, MeO-PBDE y OH-PBDE, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) incluyendo las siguientes variables: longitud del pez (cm), peso del pez (g), peso de las gónadas (g), peso del hígado (p), edad (años), porcentaje lipídico del plasma (lípidos %) y las concentraciones de PBDE, MeO-PBDE y OH-PBDE obtenidas.

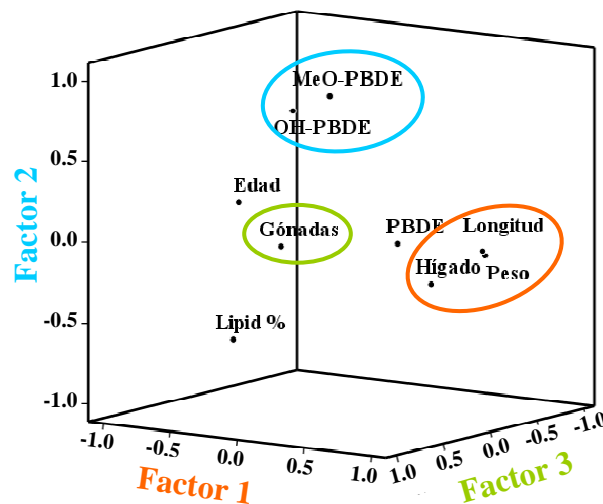
Los pasos previos al ACP: i) ajuste de las variables a la normalidad con la prueba de Kolmogorov-Smirnov ( $p > 0.05$  en todos los casos), ii) test de esfericidad de Barlett ( $p = 0.000$ ) y iii) estadístico de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) con un valor de 0.602, indican una buena adecuación de la muestra al análisis factorial.



Se obtuvieron tres factores con autovalor mayor que la unidad. El primer factor explica el 43.5 % de la varianza total y los dos siguientes un 19.6 % y un 14.6 % (un 77.7 % entre los tres). Como se muestra en la matriz de factores rotados (tabla 5.15) y en su representación tridimensional (figura 5.13), el primer factor incluye las variables longitud, peso, peso del hígado y edad. El segundo factor incluye las variables OH-PBDE y MeO-PBDE y el tercer factor está únicamente definido por el peso de las gónadas. En la figura 5.14 se representan los gráficos de dispersión de cada variable referida a cada factor (figura 5.14.A, C y E) y de cada muestra de acuerdo a su puntuación en cada factor (figura 5.14.B, D y F).

**Tabla 5.15.** Matriz de factores. Método de extracción por Análisis de Componentes Principales y rotación Varimax con normalización Kaiser.

	Factor		
	1	2	3
Longitud (cm)	<b>0.946</b>	-0.061	-0.181
Peso (g)	<b>0.958</b>	-0.024	-0.138
Peso gónadas (g)	0.188	0.078	<b>0.913</b>
Peso hígado (g)	<b>0.878</b>	-0.178	0.298
Porcentaje lipídico del plasma (%)	-0.476	-0.630	0.475
Edad (años)	<b>-0.850</b>	0.098	-0.119
PBDE (ng/g m.s.)	0.521	0.017	0.146
MeO-PBDE (ng/g m.s.)	-0.149	<b>0.829</b>	-0.089
OH-PBDE (ng/g m.s.)	-0.146	<b>0.795</b>	0.312



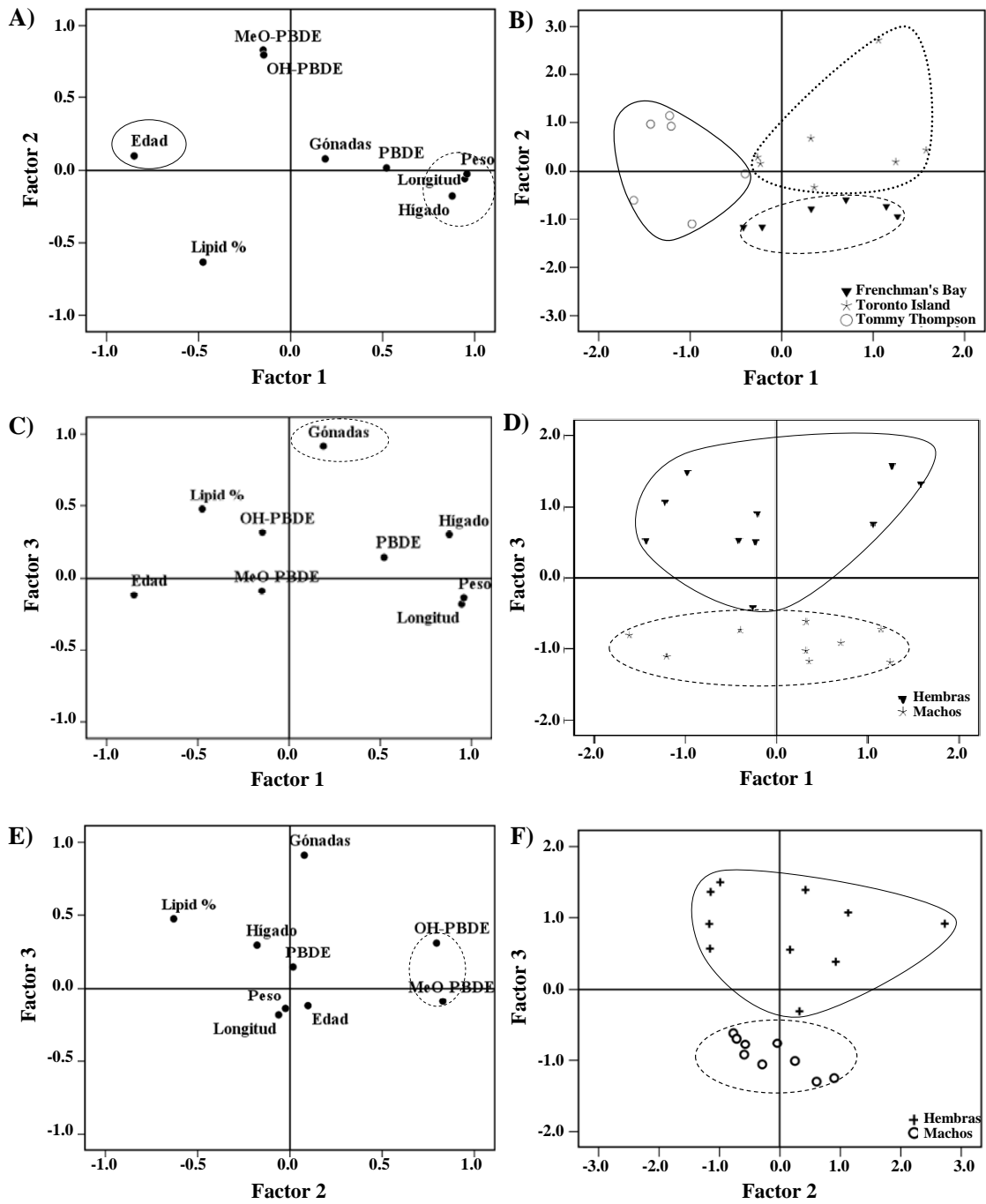
**Figura 5.13.** Gráfico tridimensional de saturaciones en espacio factorial rotado.

La figura 5.14.A muestra la relación entre el Factor 1 y el Factor 2. En el Factor 1 las variables: peso del pez, longitud del pez y peso del hígado, están positivamente correlacionadas ( $p < 0.01$ ;  $r = 0.980, 0.789$  y  $0.818$ ). A su vez estas variables se encuentran negativamente relacionadas con la edad ( $p < 0.01$ ;  $r = -0.749, -0.760$  y  $-0.738$ ). De la misma forma, en el Factor 2, las variables MEO-PBDE y OH-PBDE están positivamente correlacionadas ( $p < 0.05$ ;  $r$

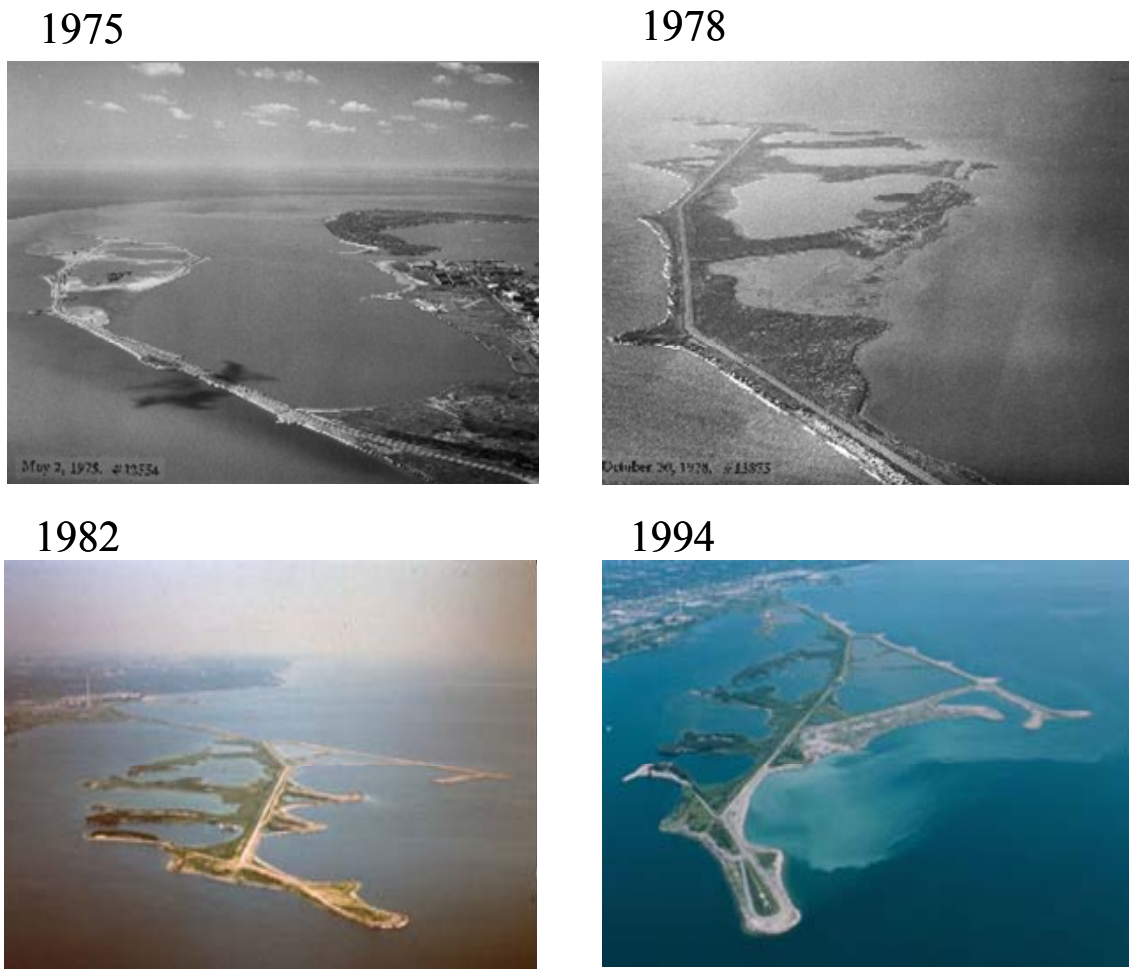
= 0.454). En esta figura las muestras se han representado en función del punto de muestreo (Frenchman's Bay, Toronto Island y Tommy Thompson Park) y como se puede apreciar las muestras de Tommy Thompson Park se sitúan en la parte negativa del Factor 1, indicando que los ejemplares capturados en este punto, aún siendo de mayor edad, presentan un tamaño menor que los obtenidos en Frenchman's Bay y Toronto Island. Tommy Thompson Park está situado en una península artificial construida con hormigón, tierras, arenas y sedimentos fruto del drenaje de los canales del puerto de Toronto, ver figura 5.15 (TPA, 2006; TTP, 2010). Las diferencias en el tamaño de los peces podrían deberse a la menor disponibilidad de nutrientes en este punto. En la figura 5.14.A se puede ver claramente cómo las muestras de Frenchman's Bay se sitúan en la parte negativa del Factor 2, señalando que presentan una menor concentración de MeO-PBDE y OH-PBDE en comparación con las obtenidas en los otros dos puntos. La figura 5.16 muestra las concentraciones medias y la desviación típica obtenidas para PBDE, MeO-PBDE y OH-PBDE en los tres puntos considerados. Como se puede observar, las concentraciones de MeO-PBDE y OH-PBDE descritas en Tommy Thompson Park y Toronto Island son mayores ( $p < 0.05$ ) que las obtenidas en Frenchman's Bay. Por el contrario, los niveles de PBDE encontrados no presentan diferencias estadísticamente significativas entre los tres puntos de muestreo. Este hecho pone de manifiesto que la ciudad de Toronto supone una fuente de MeO-PBDE y/o OH-PBDE en el medio acuático, los cuales son bioacumulados por el pez gato.

La figura 5.14.C y D muestran la relación entre el Factor 1 y el Factor 3. Las muestras se han representado en función del sexo. Las hembras se sitúan en la parte positiva del Factor 3, mientras que los machos lo hacen en la parte negativa del mismo, lo cual se debe a que las hembras gastan más energía en desarrollar las gónadas. Ambos grupos se distribuyen en gradiente con respecto al Factor 1, demostrando la heterogeneidad en cuanto a edad, tamaño, peso y peso del hígado en ambos sexos.

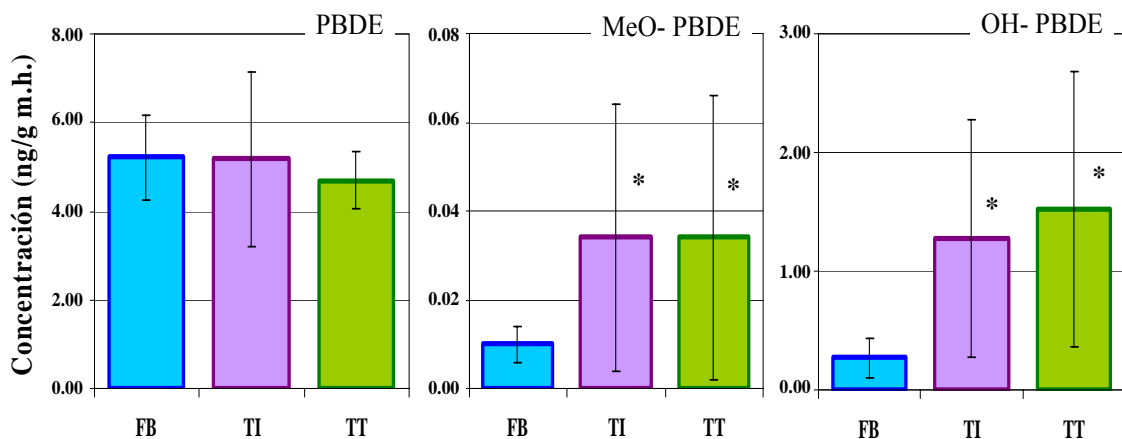
La figura 5.14.E y F representan la relación del Factor 2 y el Factor 3. Las muestras se han representado en función del sexo. Tanto los machos como las hembras se sitúan en la parte positiva y negativa del Factor 2, por lo tanto no existen diferencias entre ambos sexos en cuanto a la concentración de MeO-PBDE y OH-PBDE.



**Figura 5.14.** Resultados obtenidos del ACP. Gráficos de dispersión de cada variable referida a cada factor (A, C, y E) y de cada muestra de acuerdo a su puntuación en cada factor (B, D y F).



**Figura 5.15.** Vistas aéreas 1975-1994 de Tommy Thompson Park. (TTP, 2010).



**Figura 5.16.** Concentraciones de PBDE, MeO-PBDE y OH-PBDE (ng/g m.h.; nótese las diferentes escalas.) obtenidas en los tres puntos de muestreo: Frenchman's Bay (FB), Toronto Island (TI) y Tommy Thompson Park (TT). La altura de la barra representa la media y las barras de error señalan la desviación típica. \* Significación estadística ( $p < 0.05$ ).

**Fuentes de MeO-PBDE y OH-PBDE en plasma de pez gato (*Ameiurus nebulosus*)**

La presencia de MeO-PBDE y OH-PBDE puede deberse a dos motivos: i) bioacumulación con origen en fuentes naturales o antropogénicas y ii) metabolismo.

*Bioacumulación de MeO-PBDE y OH-PBDE de origen natural*

Como se ha comentado en el punto 1.3 (*Capítulo 1. Introducción*) de esta memoria, numerosos estudios han descrito la presencia de congéneres de MeO-PBDE y OH-PBDE como productos de síntesis de organismos marinos (Fu et al., 1995; Handayani et al., 1997; Cameron et al., 2000; Vetter et al., 2001b; Marsh et al., 2004; Kierkegaard et al., 2004a; Teuten et al., 2005; Malmvörn et al., 2005 y 2008). Estos congéneres de origen natural siempre tienen el grupo metoxílico o hidroxílico en la posición orto (Marsh et al., 2004), mientras que los MeO-PBDE y OH-PBDE producidos mediante metabolismo de PBDE presentan congéneres metoxi o hidroxil sustituidos en posiciones orto, meta y para (Örn y Klasson-Wehler, 1998; Malmberg et al., 2005; Marsh et al., 2006; Qiu et al., 2007b). Por lo tanto, la presencia de congéneres MeO-PBDE y OH-PBDE en meta y para puede demostrar metabolismo de PBDE. Hasta ahora no se han encontrado fuentes naturales de MeO-PBDE o OH-PBDE en agua dulce, sin embargo parte de las concentraciones de los congéneres orto hidroxilados y orto metoxilados encontrados en este estudio (2'-OH-BDE-28, 2'-OH-BDE-68, 6-OH-BDE-47, 2'-MeO-BDE-28, 2'-MeO-BDE-68 y 6-MeO-BDE-47) podrían deberse a fuentes aún no identificadas o al transporte atmosférico desde el medio marino (Ueno et al., 2008)

*Bioacumulación de MeO-PBDE y OH-PBDE de origen antropogénico*

Otras fuentes potenciales de MeO-PBDE y OH-PBDE descritas en el punto 1.3 (*Capítulo 1. Introducción*) de esta memoria, pueden ser la formación de estos productos a partir de reacciones con radicales hidroxílicos (OH<sup>•</sup>) y metílicos (CH<sub>3</sub><sup>•</sup>) en la atmósfera, o con (OH) formados por reacciones de la luz ultravioleta con la materia orgánica disuelta en el agua (Haglund et al., 1997; Ueno et al., 2008). Con los datos obtenidos en este estudio resulta imposible calcular el porcentaje de concentración de MeO-PBDE y OH-PBDE debido a estas fuentes. Sin embargo aparecen dos indicios que sugieren un origen antropogénico relacionado con la ciudad de Toronto: i) el aumento de la concentración de MeO- y OH-PBDE en las muestras recogidas cerca de la ciudad (Toronto Island y Tommy Thompson Park) en comparación con las de Frenchman's Bay y ii) la variación en el cociente obtenido entre la concentración de 6-OH-BDE-47 y 4'-OH-BDE-49.

Como se ha discutido anteriormente, las muestras obtenidas cerca de la ciudad de Toronto (Toronto Island y Tommy Thompson Park) presentan valores mayores ( $p < 0.05$ ) de MeO- y OH-PBDE en comparación con las obtenidas en Frenchman's Bay. Además, las muestras de Frenchman's Bay presentan un valor medio del cociente entre la concentración de 6-OH-BDE-47 y 4'-OH-BDE-49 de  $0.2 \pm 0.1$  (media  $\pm \delta$ ), mientras que este valor para las muestras recogidas en Toronto Island y Tommy Thompson Park es de  $4.2 \pm 1.5$  (media  $\pm \delta$ ). Qui et al., (2007b) reportaron un valor para este cociente de 0.4 en ratones expuestos a una

mezcla comercial de PBDE (DE-71). La similitud entre este valor y el obtenido en Frenchman's Bay, sugiere que la presencia de OH-PBDE en muestras obtenidas en este punto podría deberse al metabolismo de PBDE. Por otro lado, el cociente encontrado en las muestras obtenidas en Toronto (Toronto Island y Tommy Thompson Park) indica un mayor porcentaje de bioacumulación en estos peces.

### *Metabolismo*

Según Wan et al., (2009) el metabolismo se debe refutar mediante correlaciones significativas entre los precursores y sus productos o metabolitos. En nuestro estudio no encontramos correlaciones significativas entre el total de PBDE y los totales de MeO-PBDE o OH-PBDE. Sin embargo, las concentraciones totales de estos últimos (MeO-PBDE y OH-PBDE) sí se correlacionaron ( $p < 0.05$ ;  $r = 0.454$ ). La inter-conversión entre ambos, formación de MeO-PBDE a partir de OH-PBDE (Allard et al., 1987; Haglund et al., 1997) y el proceso inverso (Wan et al., 2009), han sido demostrados y podrían ser el origen de este hecho. Sin embargo, cuando se habla de metabolismo conviene tener en cuenta que cada precursor puede producir distintos productos y por tanto, la posibilidad de un origen metabólico para los MeO- y OH-PBDE encontrados en nuestro estudio se debe evaluar para cada congénere. Algunas de las rutas metabólicas propuestas se describen en el punto 1.3 (*Capítulo 1. Introducción*).

Se obtuvieron correlaciones positivas entre las concentraciones de 4'-OH-BDE-17, 2'-OH-BDE-68 y 6-OH-BDE-47 ( $p < 0.01$ ;  $r > 0.646$ ), lo que puede indicar un origen común para estos congéneres. De hecho, Qui et al., (2007b) propuso rutas metabólicas para la formación de 4'-OH-BDE-17, 2'-OH-BDE-68 y 6-OH-BDE-47 en ratones que han ingerido BDE-47. Sin embargo las concentraciones obtenidas en plasma de pez gato para estos congéneres hidroxilados no se correlacionan con los niveles de BDE-47 encontrados. Otras posibles rutas metabólicas para la formación de 2'-OH-BDE-68 pueden ser: i) derivatización metabólica directa del BDE-68, ii) epoxidación del BDE-49 seguida del desplazamiento del átomo de bromo situado en la posición 2' y ii) pérdida de bromos e hidroxilación, o viceversa, del BDE-90. Estas rutas están representadas en la figura 1.7 (*Capítulo 1. Introducción*). Aunque se evaluó la presencia de 36 PBDE, la mezcla comercial utilizada para el análisis de estos compuestos no incluía los congéneres BDE-68 ni BDE-90, por lo tanto no se puede correlacionar la presencia de este metabolito con la de sus congéneres precursores. Sin embargo, el hecho de que Valters et al., (2005) también encontrara 2'-OH-BDE-68 en plasma de peces del río Detroit y que, por el contrario, no se detectara en ratones ni ratas expuestas a mezclas comerciales de PBDE (Qui et al., 2007b; Marsh et al., 2006), sugiere bioacumulación desde fuentes antropogénicas y/o naturales para este compuesto.

Se encontró una buena correlación entre los congéneres 4-OH-BDE-42 y 4'-OH-BDE-101 ( $p < 0.01$ ;  $r = 0.819$ ). La presencia de 4'-OH-BDE-101 puede deberse a la epoxidación del BDE-99 seguida del desplazamiento del átomo de bromo situado en la posición 4'. De la misma forma, Qui et al., (2007b) propusieron la formación metabólica de 4-OH-BDE-42 a partir del BDE-47 y demostraron que determinadas concentraciones de metabolitos de PBDE pueden

deberse a la pérdida de bromos e hidroxilación de PBDE con alto grado de bromación. Por lo tanto y dado que las concentraciones de 4-OH-BDE-42 y 4'-OH-BDE-101 se encuentran positivamente correlacionadas ( $p < 0.05$ ,  $r > 0.522$ ) con los niveles de BDE-100, -153, -154 y -183 obtenidos en nuestro estudio, la presencia de estos OH-PBDE podría deberse a la pérdida de bromos de los congéneres BDE-100, -153, -154 y -183 e hidroxilación de los compuestos formados, o viceversa. La pérdida de bromos e hidroxilación del BDE-47 ha sido también propuesto, como origen de la presencia de 2'-OH-BDE-28 y 4'-OH-BDE-17 en heces (Marsh et al., 2006) y plasma (Qui et al., 2007b) de ratones expuestos a BDE-47. Por lo tanto las concentraciones encontradas en nuestro estudio para estos OH-PBDE podrían también deberse a este origen. Sin embargo, no existe ninguna correlación entre los niveles encontrados para 2'-OH-BDE-28 y 4'-OH-BDE-17 y las concentraciones de BDE-47, que sustente esta hipótesis.

En resumen, este estudio demuestra la presencia de PBDE, MeO-PBDE y OH-PBDE en peces gato (*Ameiurus nebulosus*) del lago Ontario. Los resultados indican que el origen los MeO- y OH-PBDE se debe principalmente a la bioacumulación de los mismos y en menor grado al metabolismo de PBDE. Hasta donde el autor conoce, no existen fuentes naturales de MeO- ni OH-PBDE en agua dulce y por lo tanto, se puede suponer un origen antropogénico para las concentraciones bioacumuladas de estos compuestos. En este sentido, los resultados también sugieren que, entre otros, la excreción humana y los procesos oxidativos que se producen en las EDAR pueden constituir fuentes potenciales de MeO- y OH-PBDE.





## **CAPÍTULO 6.- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS**



## CAPÍTULO 6.- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

### 6.1.- Conclusiones

A continuación se recogen las conclusiones más importantes de este trabajo. Éstas se han clasificado de acuerdo con los objetivos y el plan de trabajo propuestos (*Capítulo 2.- Objetivos y plan de trabajo*).

#### 6.1.1.- Retardantes de llama halogenados en lodos de depuradora

1. Se han puesto a punto distintas metodologías de análisis que permiten la determinación fidedigna de PBDE, DBDPE y Decloranes (DP, Mirex, Dec 602, 603, 604, 1,5-DPMA, aCl<sub>10</sub>DP, aCl<sub>11</sub>DP) en lodos de depuradora. Los métodos descritos, incluyendo etapas de extracción, purificación y análisis instrumental, se aplicaron a un total de 120 muestras de lodos para PBDE, evaluando en 31 de ellas la presencia de retardantes emergentes: DBDPE y Decloranes (DP, Mirex, Dec 602, 603, 604, 1,5-DPMA, aCl<sub>10</sub>DP, aCl<sub>11</sub>DP). La recuperación media obtenida para los patrones de extracción fue de  $77 \pm 19 \%$  (media  $\pm \delta$ ).
2. Se detectaron niveles de PBDE, DBDPE, Mirex, Dec 602, 603, DP y CP en las muestras, demostrando la presencia de estos compuestos en lodos españoles. Se obtuvo un patrón de concentración similar en todas las muestras: PBDE (ng/g m.s.) > DBDPE (ng/g m.s.) > DP (ng/g m.s.) >> Dec 603 (pg/g m.s.) > Dec 602 (pg/g m.s.) > Mirex (pg/g m.s.) > CP (pg/g m.s.). Hasta donde el autor conoce, éste es el primer trabajo que presenta concentraciones de DP, Dec 602, Dec 603 y CP en lodos de depuradora.
3. Se obtuvo una buena correlación entre las concentraciones de PBDE, DBDPE y DP, y entre los niveles de PBDE y DP y el porcentaje en el influente de las EDAR relativo a efluentes industriales. Estos resultados indican: i) un origen común para los niveles de PBDE, DBDPE y DP en los lodos, debido probablemente a procesos de lixiviación de estos compuestos durante la utilización y desecho de los materiales de consumo que los contengan y ii) corroboran la utilización de mezclas de PBDE (DecaBDE) y DP en la industria española. La infusión de mezclas DecaBDE y DP en los productos de consumo se revela como una fuente de PBDE y DP en el agua de entrada de las EDAR.
4. Las concentraciones obtenidas para Dec 602, 603 y CP en lodos tienen origen en los procesos de lixiviación ocurridos durante la utilización y desecho de productos de consumo, aunque parte de los niveles de Dec 602 podrían deberse a fenómenos de transporte atmosférico y deposición.

5. Los procesos englobados en la línea de fangos de las depuradoras parecen no influir en el contenido de PBDE, DBDPE y DP en los lodos. Sin embargo, los lodos sometidos a tratamiento de eliminación biológica de nitrógeno y fósforo en la línea de aguas presentan menores concentraciones de retardantes de llama. Estas diferencias son estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) sólo para DP, Dec 602 y 603. Esta degradación podría deberse a la utilización de carbono orgánico por parte de los organismos acumuladores de fósforo (OAP) y estaría influenciada por la estabilidad que la deslocalización de la carga aromática confiere en función de la planaridad en los compuestos analizados. De la misma forma, se observa un enriquecimiento ( $p < 0.05$ ) en el isómero *syn*-DP en los lodos sujetos a este tratamiento, lo que podría deberse al apantallamiento de los carbonos interiores del ciclooctano en el *syn*-DP.
6. La población equivalente y la producción anual de lodos de las EDAR no influye sobre el contenido de retardantes de llama.
7. Considerando que la aplicación agrícola de los lodos supone la mayor ruta de gestión de este residuo en Europa (~50% de los lodos generados en 2010) alcanzando valores máximos en España (~70% en 2010), la presencia de estos contaminantes en lodos suscita gran preocupación y hace patente la necesidad de: i) evaluar los mecanismos de movilidad de estos compuestos una vez el lodo es aplicado al suelo y ii) realizar estudios periódicos sobre retardantes de llama en lodos, que no sólo evalúen su evolución temporal, sino que además consideren la presencia de nuevos productos químicos.

### **6.1.2.- PBDE, MeO-PBDE y OH-PBDE en plasma de pez gato (*Ameiurus nebulosus*) del lago Ontario.**

8. Se ha optimizado la metodología de análisis de MeO-PBDE, OH-PBDE y PBDE en plasma de peces de agua dulce. El método descrito, incluyendo la extracción del plasma, purificación, fraccionamiento y análisis instrumental de 20 MeO-PBDE, 20 OH-PBDE y 36 PBDE, se aplicó a 19 muestras compuestas a partir del plasma obtenido en 117 ejemplares de pez gato (*Ameiurus nebulosus*). La recuperación media obtenida para los patrones de extracción fue de  $64 \pm 12$  % (media  $\pm$   $\delta$ ). Hasta donde el autor conoce, éste es el primer trabajo que presenta conjuntamente concentraciones de PBDE, MeO-PBDE, y OH-PBDE en esta especie.
9. Se detectaron niveles de PBDE, MeO-PBDE y OH-PBDE en el plasma, demostrando la presencia de estos compuestos en el pez gato.
10. Se estimaron las fuentes potenciales de MeO-PBDE y OH-PBDE en las muestras, concluyendo que el mayor aporte de estos compuestos en el plasma se debe a la

bioacumulación de los mismos con un origen antropogénico. Se estima que la contribución del metabolismo de PBDE en el pez gato es baja.

## **6.2.- Perspectivas futuras**

Fruto de las conclusiones descritas en el punto anterior, se proponen los siguientes trabajos de investigación:

1. Evaluación continua de retardantes de llama en los lodos de depuradora como herramienta eficaz para identificar nuevos compuestos cuya presencia en los lodos puede ser perjudicial para la salud humana y el medio ambiente. También se hace patente la necesidad de analizar los mecanismos de movilización de estos compuestos en las tres principales rutas de gestión de los lodos: aplicación agrícola, incineración y disposición en vertedero.
2. A partir del análisis de MeO-PBDE y OH-PBDE en muestras bióticas, las EDAR se han revelado como fuentes importantes de estos compuestos en el medio ambiente y por tanto sería necesario analizar la presencia y el comportamiento de MEO-PBDE y OH-PBDE en estas instalaciones.
3. Por último, se propone la evaluación de los compuestos descritos en otras matrices, tanto abióticas (suelo, aire y material particulado del agua) como bióticas (plantas, animales y humanos), para poder comprender los mecanismos de movilización de estos compuestos en el medio ambiente y evaluar la bioacumulación y biomagnificación de aquellos retardantes emergentes, para los que estas características no han sido aún descritas.



## **CAPÍTULO 7.- BIBLIOGRAFÍA**





**CAPÍTULO 7.- BIBLIOGRAFÍA****A**

- Alaee, M., Arias, P., Sjodin, A., Bergman, A., 2003. An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. *Environ. Int.* 29, 683-689.
- Alcock, R.E., Sweetman, A., Jones, K.C., 1999. Assessment of organic contaminant fate in waste water treatment plants. I: Selected compounds and physicochemical properties. *Chemosphere* 38, 2247-2262.
- Allard, A.S., Remberger, M., Neilson, A.H., 1987. Bacterial O-methylation of halogen-substituted phenols. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 839-845.
- Aparicio, I., Santos, J.L., Alonso, E., 2009. Limitation of the concentration of organic pollutant assessment of sludge for agricultural purpose: a case study in south Spain. *Waste Management* 29, 1747-1753.
- Arias, P.A., 2001. Brominated Flame Retardants: An Overview. Presented at the Second International Workshop on Brominated Flame Retardants BFR 2001, Stockholm, 3-4.
- Asplund, L., Athanasiadou, M., Sjodin, A., Bergman, A., Borgeson, H., 1999. Organohalogen substances in muscle, egg and blood from healthy Baltic salmon (*Salmo salar*) and Baltic salmon that produced offspring with the M74 syndrome. *Ambio.* 28, 67-76.
- Athanasiadou, M., Cuadra, S.N., Marsh, G., Bergman, A., Jakobsson, K., 2008. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and bioaccumulative hydroxylated PBDE metabolites in young humans from Managua, Nicaragua. *Environ. Health Perspect.* 116, 400-408.

**B**

- Bergman, A., 1989. Brominated flame retardants in a global environmental perspectives. Proceedings Workshop on Brominated Aromatics Flame Retardants. Skokloster, Sweden 13-23.
- Bienek, D., Bahadir, M., Korte, F., 1989. Formation of heterocyclic hazardous compounds by thermal degradation of organic compounds. *Heterocycles.* 28, 719-722.
- BIPM, 2003. Oficina Internacional de Pesos y Medidas por sus siglas en francés Bureau International des Poids et Mesures. Resolution 10 of the 22<sup>nd</sup> meeting of the CGPM. <http://www.bipm.org/en/CGPM/db/22/10/> (consultado el 9 de noviembre de 2010).
- Birnbaum, L.S. y Staskal, D.F., 2004. Brominated flame retardants: cause for concern? *Environ. Health Perspect.* 112, 9-17.
- Bjorklund, J., Sporning, S., Wiberg, K., Haglund, P., von Holst, C., 2006. New strategies for extraction and clean-up of persistent organic pollutants from food and feed samples using selective pressurized liquid extraction. *Trends Analyt Chem.* 25, 318-325.
- BSEF, 2000. Bromine Science and Environmental Forum. An introduction to Brominated Flame Retardants, <http://www.bsef-site.com/docs/bromine.pdf> (consultado el 13 de agosto de 2006).
- BSEF, 2003. Bromine Science and Environmental Forum Major brominated flame retardants volume estimates, [http://www.bsef-site.com/docs/BFR\\_vols\\_2001.doc](http://www.bsef-site.com/docs/BFR_vols_2001.doc) (consultado el 13 de agosto de 2006).
- Bolen, D.W., 2004. Effects of naturally occurring osmolytes on protein stability and solubility: issues important in protein crystallization. *Methods* 34, 312-322

## C

- Cameron, G.M., Stapleton, B.L., Simonsen, S.M., Brecknell, D.j., Garson, M., 2000. New Sesquiterpene and Brominated Metabolites from the Tropical Marine Sponge *Dysidea* sp. *Tetrahedron*. 56, 5247-5252.
- Casanovas, J., Ramos. L., Llorens. J., Fernández. M., Fraisse. D., Gavinelli. M., Cristofori. C., González. MJ., Jimenez. B., Rivera. J., Espadaler. I., Eljarrat. E., 2006. Dioxinas y Furanos. Problemática ambiental y metodología analítica. Series monográficas, Ministerio de Obras Públicas, Transportes y Medio Ambiente.
- Clarke, B.O., Porter, N.A., Symons, R.K., Marriot, P.J., Stevenson, G.J., Blackbeard, J.R., 2010. Investigating the distribution of polybrominated diphenyl ethers through an Australian wastewater treatment plant. *Sci. Total. Environ.* 408, 1604 – 1611.
- CMABFRIP, 1997a. Chemical Manufactures Association Bromination Flame Retardant Industry Panel. Octabromodiphenyl Oxide (OBDPO): Determination of the water solubility. Project No. 439C-110. Wildlife International, Ltd.
- CMABFRIP, 1997b. Chemical Manufactures Association Bromination Flame Retardant Industry Panel. Decabromodiphenyl oxide (DBDPO): Determination of water solubility. Project No. Wildlife International, Ltd.
- COP4, 2009. Fourth Meeting of the Conference of the Parties to the Stockholm Convention. Decisions SC-4/13, 14 y 18. International Institute for Sustainable Development (IISD). Earth Negotiations Bulletin.

## D

- Davis, R. y Freason, M., 1987. *Mass Spectrometry*. John Wiley.
- Dearth, M.A. y Hites, R.A., 1991. Complete analysis of technical chlordane using negative ionization mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 25, 245-254.
- de Boer, J., y Cofino, W.P., 2002. First world-wide interlaboratory study on polybrominated diphenylethers (PBDEs). *Chemosphere* 46, 625-633.
- de Boer, J., y Wells, D.E., 2006. Pitfalls in the analysis of brominated flame retardants in environmental, human and food samples – including results of three international interlaboratory studies. *Trends in Analytical Chemistry* 25, 364-371.
- de la Torre, A., Guerra. P., Martínez. M.A., Eljarrat. E., Barceló. D., 2007a. Identificación inequívoca y cuantificación a nivel de ultratrazo de retardantes de llama bromados mediante LC-QqQ linear ion trap-MS. II Reunión nacional de dioxinas, furanos y compuestos orgánicos persistentes relacionados. A Coruña, España.
- de la Torre, A., Martínez, M.A., Sanz, P., Concejero, M.A., 2007b. NCI-MS vs EI-MS for PBDEs analysis in Spanish sewage sludges. Fourth International Workshop on Brominated Flame Retardants BFR. <http://bfr2010.com/abstract-download/2007/P003.pdf> (consultado el 9 de noviembre de 2010).
- de la Torre, A., Pacepavicius, G., Shen, L., Reiner, E., Jiménez, B., Alae, M., Martínez, M.A., 2010. Dechlorane Plus and related compounds in Spanish air. *Organohalogen Compounds*, 72.
- Dever, J.L., Carlson, R.D., 1972. Process for preparing halogenated cyclopentadiene diadducts of furan. Assignee: Hooker Chemical Corporation, Niagara Falls, N.Y. United States Patent Office, Pat n. 3687983. <http://www.freepatentsonline.com/3687983.pdf> (consultado el 9 de noviembre de 2010).

- de Voogt, P., 1994. Chromatographic clean-up methods for the determination of persistent organic compounds in aqueous environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry* 13, 389-397.
- de Wit, C.A., 2002. An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere* 46, 583-624.
- Directiva 76/769/CEE del Consejo, de 27 de julio de 1976, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros que limitan la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos. DO L 262 de 27.9.1976, 201-203.
- Directiva 85/467/CEE del Consejo de las Comunidades Europeas, de 1 de octubre de 1985, que modifica por sexta vez (bifenilos policlorados / terfenilos policlorados) la Directiva 76/769/CEE, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros que limitan la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos. DO L 269 de 11.10.1985, 56-58.
- Directiva 86/278/CEE del Consejo de las Comunidades Europeas, de 12 de junio de 1986, relativa a la protección del medio ambiente y, en particular, de los suelos, en la utilización de los lodos de depuradora en agricultura. DO L 181 de 4.7.1986, 2-12.
- Directiva 91/271/CEE del Consejo de las Comunidades Europeas, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas. DO L 135 de 30.05.1991, 40-52.
- Directiva 2002/95/CE del Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea, de 27 de enero de 2003 sobre restricciones a la utilización de determinadas sustancias peligrosas en aparatos eléctricos y electrónicos. DO L 37 de 13.2.2003, 19-23.
- Directiva 2002/96/CE del Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea, de 27 de enero de 2003 sobre residuos de aparatos eléctricos y electrónicos (RAEE). DO L 37 de 13.2.2003, 24-38.
- Directiva 2003/11/CE del Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea, de 6 de febrero de 2003, por la que se modifica por la vigesimocuarta vez la Directiva 76/769/CEE del Consejo relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros que limitan la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos (éter de pentabromodifenilo, y éter de octabromodifenilo). DO L 42 de 15.2.2003, 45-46.

## E

- ECB, European Chemicals Bureau, 2007. Review on production processes of decabromodiphenyl ether (DecaBDE) used in polymeric applications in electrical and electronic equipment, and assessment of the availability of potential alternatives to DecaBDE. Institute of Health and Consumer Protection, Joint Research Centre, EUR 22693EN. [http://ecb.jrc.it/documents/Existing-Chemicals/Review\\_on\\_production\\_process\\_of\\_decaBDE.pdf](http://ecb.jrc.it/documents/Existing-Chemicals/Review_on_production_process_of_decaBDE.pdf) (consultado el 9 de noviembre de 2010).
- ECJRC, 2009. European Commission Joint Research Centre. European Union Risk Assessment Report Hexachlorocyclopentadiene (HCCP). [http://ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/Existing-Chemicals/RISK\\_ASSESSMENT/DRAFT/R401\\_0512\\_env.pdf](http://ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/Existing-Chemicals/RISK_ASSESSMENT/DRAFT/R401_0512_env.pdf) (consultado el 9 de noviembre de 2010).
- EEA, 2009. European Environment Agency. Urban Waste Water Treatment - Assessment published. <http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/urban-waste-water-treatment/urban-waste-water-treatment-assessment-1>. (consultado el 9 de noviembre de 2010).

- EFRA, 2006. European Flame Retardants Association. How do flame retardants work, <http://www.cefic-efra.com/Content/Default.asp?PageName=openfile&DocRef=2006-02-21-00001> (consultado el 9 de noviembre de 2010).
- Eljarrat, E. y Barcelo, D., 2004. Sample handling and analysis of brominated flame retardants in soil and sludge samples. *Trends Analyt Chem.* 23, 727-736.
- Eljarrat, E., Labandeira, A., Martínez, M.A., Fabrellas, B., Barceló, D., 2005. Occurrence of the "new" brominated flame retardant, decabromodiphenyl ethane, in sewage sludge from Spain. *Organohalogen Compd.* 67, 459 - 461.
- Eljarrat, E., Marsh, G., Labandeira, A., Barceló, D., 2008. Effect of sewage sludges contaminated with polybrominated diphenylethers on agricultural soils. *Chemosphere* 71, 1079 - 1086.
- Environment Canada, 1977. Mirex in Canada; Technical Report 77-1; Report of the Task Force on Mirex to the Joint Department of Environment and the National Health and Welfare Committee on Environmental Contaminants; Ottawa, Canada.
- Environment Canada, 2006. Ecological Screening Assessment Report on Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs). Canadian Environmental Protection Act, 1999.
- EP, 2008a . Parlamento Europeo. Parlamento Europeo (C-14/06) y Reino de Dinamarca (C-295/06) contra la Comisión de las Comunidades Europeas. Directiva 2002/95/EC – Aparatos eléctricos y electrónicos – Restricciones a la utilización de determinadas sustancias peligrosas - Decabromodiphenil éter (DecaBDE) – Decisión 2005/717/CE de la Comisión –Exención del DecaBDE de la prohibición de utilización – Recurso de anulación- Competencias de ejecución de la Comisión – Infracción de la disposición habilitadora.). Sentencia del Tribunal de Justicia (Gran Sala) de 1 de abril de 2008. Recopilación de Jurisprudencia 2008 página I-01649.
- Esteban, L., 2003. La espectrometría de masas en imágenes. ACK Comunicación.
- European Communities, 2001. European Union Risk Assessment Report. Diphenyl ether, pentabromo derivate (pentabromodiphenyl ether). CAS No.: 32534-81-9. EINECS No.: 251-084-2. United Kingdom on behalf of the European Union.
- European Communities, 2002. European Union Risk Assessment Report. Bis(pentabromopheny) ether. CAS No.: 1163-19-5. EINECS No.: 214-604-19. United Kingdom on behalf of the European Union.
- European Communities, 2003. European Union Risk Assessment Report. Diphenyl ether, octabromo derivate (octabromomodiphenyl ether). CAS No.: 32536-52-0. EINECS No.: 251-087-9. France and United Kingdom on behalf of the European Union.
- EU, 2000. European Union. Working document on sludge, 3rd Draft. Brussels [http://ec.europa.eu/environment/waste/sludge/pdf/sludge\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/environment/waste/sludge/pdf/sludge_en.pdf) (consultado el 9 de noviembre de 2010).

## **F**

- Fabrellas, B., Solís, A., Álvarez, A., Larrazabal, D., y Martínez, M. A., 2004. Los retardantes de llama bromados como compuestos orgánicos persistentes. Distribución en el medio ambiente y exposición en humanos. Editorial Ciemat.
- Fieser, L.F. y Fieser, M., 1967. Reagents for organic Synthesis. John Wiley and Sons.
- FishBase, 2001. Key facts on Brown Bullhead. <http://www.fishbase.org> (consultado el 9 de noviembre de 2010).

Focant J.f., Pirard, C., de Pauw, E., 2004. Automated sample preparation-fractionation for the measurement of dioxins and related compounds in biological matrices: a review. *Talanta* 63, 1101-1113.

Fu, X., Schmitz, F.J., Govindan, M., Abbas, S.A., Hanson, K.M., Horton, P.A., Crews, P., Laney, M., Schatzman, R.C., 1995. Enzyme inhibitors: new and known polybrominated phenols and diphenyl ethers from four Indo-Pacific Dysidea sponges. *J. Nat. Prod.* 58, 1384-1391.

## G

GAIN, 2010. Geneva Association Information Newsletter. International Association for the Study of insurance Economics, The Geneva Association. Information Bulletin of the World Fire Statistics 26.

Garrido, A. y Teijón, J.M., 2006. Fundamentos de Bioquímica metabólica. Editorial Tébar.

Gauthier, L.T., Hebert, C.E., Weseloh, D.V., Letcher, R.J., 2007. Current-use flame retardants in the eggs of herring gulls (*Larus argentatus*) from the Laurentian Great Lakes. *Environ. Sci. Technol.* 41, 4561-4567.

Gauthier, L.T., Potter, D., Hebert, C.E., Letcher, R.J., 2009. Temporal trends and spatial distribution of non-polybrominated diphenyl ether flame retardants in the eggs of colonial populations of Great Lakes herring gulls. *Environ. Sci. Technol.* 43, 312 - 317.

Gerecke, A.C., Hartmann, P.C., Heeb, N.V., Kohler, H.E., Giger, W., Schmid, P., Zennegg, M., Kohler, M., 2005. Anaerobic degradation of Decabromodiphenyl ether. *Environ. Sci. Technol.* 39, 1078 – 1083.

Gerecke, A.C., Giger, W., Hartmann, P.C., Heeb, N.V., Kohler, H.E., Schmid, P., Zennegg, M., Kohler, M., 2006. Anaerobic degradation of brominated flame retardants in sewage sludge. *Chemosphere* 64, 311 – 317.

Gevao, B., Muzaini, S., Helaleh, M. 2008. Occurrence and concentrations of polybrominated diphenyl ethers in sewage sludge from three wastewater treatment plants in Kuwait. *Chemosphere* 71, 242 - 247.

Grabner, R.S., 1993. N-containing flame retardants: An alternative. Handout at OECD Workshop on Brominated Flame Retardants, Neuchâtel, Switzerland.

Green, J., 1996. Mechanism of Flame Retardancy and Smoke Suppression- A Review. *Journal of Fire Science.* 14, 426-442.

Guerra, P., de la Torre, A., Martínez, M. A., Eljarrat, E., Barcelo, D., 2008. Identification and trace level determination of brominated flame retardants by liquid chromatography/quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22, 916-924.

Guerra, P., de la Torre, A., Martínez, M. A., Eljarrat, E., Barceló. D., 2007. Simultaneous determination of HBCD stereoisomers and TBBPA and related compounds by HPLC-QqQLIT MS. VII Reunión Científica de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines. Granada, España.

## H

Haglund, P.S., Zook, D.R., Buser, H.R., Hu, J., 1997. Identification and Quantification of Polybrominated Diphenyl Ethers and Methoxy-Polybrominated Diphenyl Ethers in Baltic Biota. *Environ. Sci. Technol.* 31, 3281-3287.

- Hakk, H., Larsen, G., Klasson Wehler, E., 2002. Tissue disposition, excretion and metabolism of 2,2', 4,4', 5-pentabromodiphenyl ether (BDE-99) in the male Sprague-Dawley rat. *Xenobiotica* 32, 369–382.
- Hakk, H., Huwe, J., Low, M., Rutherford, D., Larsen, G., 2006. Tissue disposition, excretion and metabolism of 2,2',4,4',6-pentabromodiphenyl ether (BDE-100) in male Sprague-Dawley rats. *Xenobiotica* 36, 79–94.
- Hale, R.C., La Guardia, M.J., Harvey, E.P., Gaylor, M.O., Mainor, T.M., Duff, W.H., 2001. Flame retardants. Persistent pollutants in land-applied sludges. *Nature* 412, 140 - 141.
- Hale, R.C., Alae, M., Manchester-Neesvig, J.B., Stapleton, H.M., Ikonomou M.G., 2003. Polybrominated diphenyl ether flame retardants in North America environment. *Environ. Int.* 29, 771 - 779.
- Handayani, D., Edrada, R.A., Proksch, P., Wray, V., Witte, L., Van Soest, R.W., Kunzmann, A., Soedarsono, 1997. Four new bioactive polybrominated diphenyl ethers of the sponge *Dysidea herbacea* from West Sumatra, Indonesia. *J. Nat. Prod.* 60, 1313-1316.
- Harner, T. y Shoeib, M., 2002. Measurements of octanol-air partition coefficients (K<sub>oa</sub>) for polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): Predicted partitioning in the environment. *J. Chem. Eng. Data.* 47, 228-232.
- Harrad, S., Ibarra, C., Diamond, M., Melymuk, L., Robson, M., Douwes, J., Roosens, L., Dirtu, A.C., Covaci, A., 2008. Polybrominated diphenyl ethers in domestic indoor dust from Canada, New Zealand, United Kingdom and United States. *Environ. Int.* 34, 232 - 238.
- Harrison, A. J., 1983. *Chemical Ionization Mass Spectrometry*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Heeb, N.V., Schweizer, W.B., Kohler, M., Gerecke, A.C., 2005. Structure elucidation of hexabromocyclododecanes a class of compounds with a complex stereochemistry. *Chemosphere* 61, 65-73.
- Hess, P., de Boer, J., Cofino, W.P., Leonards, P.E.G., Wells, D.E., 1995. Critical review of the analysis of non- and mono-ortho-chlorobiphenyls. *Journal of Chromatography A*, 703, 417-465.
- Herodotus. *The History of Herodotus*, translate by George Rawlinson. The internet classics archive. <http://classics.mit.edu/Herodotus/history.html> (consultado el 9 de noviembre de 2010).
- Hindersinn, R.R. y Wagner, G.M., 1967. Fire retardancy. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology* 7, 1-64.
- Hindersinn, R.R. y Marciniak, H.W., 1968. Fire retardant halogen-containing vinyl polymer containing perhalopentacyclododecanes. Assignee: Hooker Chemical Corporation, Niagara Falls, N.Y.) United States Patent Office, Pat n. 3392136. <http://www.freepatentsonline.com/3392136.pdf> (consultado el 09 de noviembre de 2010).
- Hindersinn, R.R., 1990. Historical aspects of polymer fire retardance. Nelson Gordon L. Fire and Polymers hazards identification and prevention. New York, American Chemical Society ACS symposium series 425, 87-96.
- Hoh, E., Zhu, L., Hites, R.A., 2006. Dechlorane plus, a chlorinated flame retardant, in the Great Lakes. *Environ. Sci. Technol.* 40, 1184-1189.
- Houde, M., Pacepavicius, G., Darling, C., Fair, P.A., Alae, M., Bossart, G.D., Solomon, K.R., Letcher, R.J., Bergman, Å., Marsh, G., Muir, D., 2009. Polybrominated diphenyl ethers and their hydroxylated analogs in plasma of bottlenose dolphins (*Tursiops Truncatus*) from the United States east coast. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 2061-2068.

- Hovander, L., Malmberg, T., Athanasiadou, M., Athanassiadis, I., Rahm, S., Bergman, A., Wehler, E.K., 2002. Identification of hydroxylated PCB metabolites and other phenolic halogenated pollutants in human blood plasma. *Arch. Environ. Contam Toxicol.* 42, 105-117.
- Hua, W., Bennett, E.R., Letcher, R.J., 2005. Triclosan in waste and surface waters from the upper Detroit River by liquid chromatography-electrospray-tandem quadrupole mass spectrometry. *Environ. Int.* 31, 621-630.
- Hutzinger, O. y Thoma, H., 1987. Polybrominated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans: the flame retardant issue. *Chemosphere* 16, 1877-1880.

## I

- IJC, 1989. International Joint Commission. Guidance on characterization of toxic substances problems in areas of concern in the Great Lakes Basin. Report of the Great Lakes Water Quality Board, Windsor, ON.
- Icardo, C.S. y Scharf, D.J., 1983. Flame retardant polymer composition. Assignee: Occidental Chemical Corporation, Niagara Falls, N.Y.) United States Patent Office, Pat n. 4388429. <http://www.freepatentsonline.com/4388429.pdf> (consultado el 9 de noviembre de 2010).
- INE, 2006. Instituto Nacional de Estadística. Figuras de población en España relativas a 2006. Real Decreto 1358/2005, del 18 de noviembre.

## J

- JE, 2004. Jefatura del Estado. Instrumento de Ratificación del Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes, hecho en Estocolmo el 22 de mayo de 2001. BOE 2004 de 23 de junio, 151, 22737-22754.
- Jiang, F., Beck, M.B., Cummings, R.G., Rowless, K., Russel, D., 2004. Estimation of costs of phosphorus removal in wastewater treatment facilities: Construction de novo. *Water Policy Working Paper #2004-010*. [http://www.h2opolicycenter.org/pdf\\_documents/water\\_workingpapers/2004-010.pdf](http://www.h2opolicycenter.org/pdf_documents/water_workingpapers/2004-010.pdf) (consultado el 9 de noviembre de 2010).
- Ju, J.H., Lee, I.S., Sim, W.J., Eun, H., Oh, J.E., 2009. Analysis and evaluation of chlorinated persistent organic compounds and PAHs in sludge in Korea. *Chemosphere* 74, 520-528.
- Julander, A., Westberg, H., Engwall, M., van Bavel, B., 2005. Distribution of brominated flame retardants in different dust fractions in air from an electronics recycling facility. *Sci. Total Environ.* 350, 151-160.

## K

- Kaiser, K.L.E., 1978. Raise and fall of Mirex. *Environ. Sci. Technol.* 12, 520-528.
- Kajiwara, N., Noma, Y., Takigami, H., 2008. Photolysis studies of Technical Decabromodiphenyl ethat (DecaBDE) and ethane (DeBDethane) in plastics under natural sunlight. *Environ. Sci. Technol.* 42, 4404-4409.
- Karlsson, M., Julander, A., van Bavel, B., Hardell, L., 2007. Levels of brominated flame retardants in blood in relation to levels in household air and dust. *Environ. Int.* 33, 62-69.

- Kierkegaard, A., Burreau, S., Marsh, G., Klasson Wehler, E., De Wit, C.A., Asplund, L., 2001. Metabolism and distribution of 2,2',4,4'-tetrabromo[<sup>14</sup>C]diphenyl ether in pike (esox lucius) after dietary exposure. *Organohalogen Compd.* 52, 58-61.
- Kierkegaard, A., Bignert, A., Sellstrom, U., Olsson, M., Asplund, L., Jansson, B., De Wit, C.A., 2004a. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and their methoxylated derivatives in Pike from Swedish waters with emphasis on temporal trends, 1967-2000. *Environ. Pollut.* 130, 187-198.
- Kierkegaard, A., Bjorklund, J., Friden, U., 2004b. Identification of the flame retardant decabromodiphenyl ethane in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 38, 3247-3253.
- Kitson, F.J., Larsen, B.S., Mc Ewen, C.N., 1996. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry, a practical guide.* Academic press.
- Klaberg, D.P. y Benson, A., 1975. Food habitats of *Ictalurus nebulosus* in acid polluted water of northern West Virginia. *Tans. Am. Fish Soc.* 105. 541-547
- Knoth, W., Mann, W., Meyer, R., Nebhuth, J., 2007. Polybrominated diphenyl ethers in sewage sludge in Germany. *Chemosphere* 67, 1831 – 1837.
- Kolic, T.M., Shen, L., Macpherson, K., Fayez, L., Gobran, T., Helm, P.A., Marvin, C.H., Arsenault, G., Reiner, E.J., 2009. The analysis of halogenated flame retardants by GC-HRMS in environmental samples. *J. Chromatogr. Sci.* 47, 83-91.
- Konstantinov, A., Arsenault, G., Chittim, B., Kolic, T., Mac Pherson, K., Mc Alees, A., Mc Crindle, R., Potter, D., Reiner, E., Tashiro, C., Yeo, B., 2006. Characterization of mass-labeled [<sup>13</sup>C<sub>14</sub>]-decabromodiphenylethane and its use as a surrogate standard in the analysis of sewage sludge samples. *Chemosphere* 64, 245 - 249.
- Kuniyoshi, M., y Ymaada, K.H., 1985. Biological active diphenyl ether from the green alga *Cladophora fascicularis*. *Experientia* 25, 2177-2186.

## L

- Lacorte, S. y Ikonomou, M.G., 2009. Occurrence and congener specific profiles of polybrominated diphenyl ethers and their hydroxylated and methoxylated derivatives in breast milk from Catalonia. *Chemosphere.* 74, 412-420.
- La Guardia, M.J., Hale, R.C., Harvey, E., 2006. Detailed polybrominated diphenyl ether (PBDE) congener composition of the widely used Penta-, Octa-, and Deca-PBDE technical flame-retardant mixtures. *Environ. Sci. Technol.* 40, 6247 - 6254.
- Larsen, E.R., 1978. Flame retardants, halogenated flame retardants. 3<sup>rd</sup> ed. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology.* 10, 373-394.
- Law, K., Halldorson, T., Danell, R., Stern, G., Gewurtz, S., Alae, M., Marvin, C., Whittle, M., Tomy, G., 2006. Bioaccumulation and trophic transfer of some brominated flame retardants in a Lake Winnipeg (Canada) food web. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2177 - 2186.
- Letcher, R.J., D'Sa, I., Valters, K., Marsh, G., Li, H., Bennett, E., Alae, M., 2003. Polybrominated diphenyl ethers and hydroxylated and methoxylated analogues in Detroit River fish. *Organohalogen Compd.* 62, 29-32.
- Ley 10/1998, de 21 de abril, de residuos. BOE. 1998, 96, 13372-13384.
- Loeb, H.A., 1964. Submergence of brown bullheads in bottom sediments. *New York an Gme Journal,* 11, 119-124.



López, M. y Grau, J.M., 2005. Metales pesados, materia orgánica y otros parámetros de la capa superficial de los suelos agrícolas y de pastos de la España Peninsular: Resultados globales. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Ministerio de Educación y Ciencia.

Luo, X.J., Zhang, X.L., Liu, J., Wu, J.P., Luo, Y., Chen, S.J., Mai, B.X., Yang, Z.Y., 2009. Persistent halogenated compounds in waterbirds from an e-waste recycling region in South China. *Environ. Sci. Technol.* 43, 306 - 311.

## M

Majed, N., Matthaus, C., Diem, M., Gu, A.Z., 2009. Evaluation of intracellular polyphosphate dynamics in enhanced biological phosphorus removal process using Raman microscopy. *Environ. Sci. Technol.* 43, 5436-5442.

Malmberg, T., 2004. Identification and characterisation of hydroxylated PCB and PBDE metabolites in blood -congener specific synthesis and analysis. Ph.D. thesis, Stockholm University, Sockholm Swedem.

Malmberg, T., Athanasiadou, M., Marsh, G., Brandt, I., Bergman, A., 2005. Identification of hydroxylated polybrominated diphenyl ether metabolites in blood plasma from polybrominated diphenyl ether exposed rats. *Environ. Sci. Technol.* 39, 5342-5348.

Malmvärn, A., Marsh, G., Kautsky, L., Athanasiadou, M., Bergman, A., Asplund, L., 2005. Hydroxylated and methoxylated brominated diphenyl ethers in the red algae *Ceramium tenuicorne* and blue mussels from the Baltic Sea. *Environ. Sci. Technol.* 39, 2990-2997.

Malmvärn, A., Zebuhr, Y., Kautsky, L., Bergman, K., Asplund, L., 2008. Hydroxylated and methoxylated polybrominated diphenyl ethers and polybrominated dibenzo-p-dioxins in red alga and cyanobacteria living in the Baltic Sea. *Chemosphere* 72, 910-916.

Marciniak, H.W., Carlon, R.D., Dever, J.L., 1975. Fire retardant polymer compositions. Assignee: Hooker Chemical Corporation, Niagara Falls, N.Y.) United States Patent Office, Pat n. 3891599. <http://www.freepatentsonline.com/3891599.pdf> (consultado el 9 de noviembre de 2010).

MARM, 2009a. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM). Plan Nacional Integrado de Residuos para el período 2008-2015. BOE 2009 de 26 de febrero, 49, 19893- 20016.

MARM, 2009b. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM). Dirección General del Agua. Banco Público de Indicadores Ambientales: Depuración de aguas residuales urbanas. [http://www.mma.es/secciones/calidad\\_contaminacion/indicadores\\_ambientales/banco\\_publico\\_ia/pdf/AGUDepuracion.pdf](http://www.mma.es/secciones/calidad_contaminacion/indicadores_ambientales/banco_publico_ia/pdf/AGUDepuracion.pdf) (consultado el 9 de noviembre de 2010).

Marsh, G., Athanasiadou, M., Bergman, A., Asplund, L., 2004. Identification of hydroxylated and methoxylated polybrominated diphenyl ethers in Baltic Sea salmon (*Salmo salar*) blood. *Environ. Sci. Technol.* 38, 10-18.

Marsh, G., Athanasiadou, M., Athanassiadis, I., Bergman, A., Endo, T., Haraguchi, K., 2005. Identification, quantification, and synthesis of a novel dimethoxylated polybrominated biphenyl in marine mammals caught off the coast of Japan. *Environ. Sci. Technol.* 39, 8684-8690.

Marsh, G., Athanasiadou, M., Athanassiadis, I., Sandholm, A., 2006. Identification of hydroxylated metabolites in 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether exposed rats. *Chemosphere* 63, 690-697.

- Mc Donald, R.W., Cratney, W.J., Crewe, N., Paton, D., 1992. A history of octachlorodibenzo-p-dioxin, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran, and 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl contamination in Howe Sound, British Columbia. *Environ. Sci. Technol.* 26, 1544-1550.
- Mc Kinney, M.A., Cesh, L.S., Elliott, J.E., Williams, T.D., Garcelon, D.K., Letcher, R.J., 2006. Brominated flame retardants and halogenated phenolic compounds in North American west coast bald eaglet (*Haliaeetus leucocephalus*) plasma. *Environ. Sci. Technol.* 40, 6275-6281.
- Mc Lafferty, F.W., y Turecek, F., 1993. Interpretation of mass spectra, 4<sup>th</sup> edition, University Science Books, Mill Valley, CA.
- MDCH, 2010. Michigan Department of Community Health. PBBs (Polybrominated Biphenyls) in Michigan, Frequently Asked Questions. [http://www.michigan.gov/documents/mdch\\_PBB\\_FAQ\\_92051\\_7.pdf](http://www.michigan.gov/documents/mdch_PBB_FAQ_92051_7.pdf). (consultado el 9 de noviembre de 2010).
- Meerts, I.A., Letcher, R.J., Hoving, S., Marsh, G., Bergman, A., Lemmen, J.G., van der, B.B., Brouwer, A., 2001. In vitro estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PDBEs, and polybrominated bisphenol A compounds. *Environ. Health Perspect.* 109, 399-407.
- Michaux, C., Pomroy, N.C., Privé, G.G., 2008. Refolding SDS-Denatured proteins by the addition of amphipathic cosolventes. *J.Mol. Biol.*, 375, 1477-1488.
- Mileu Ltd, WRc y RPA para la Comisión Europea, 2010 a. Environmental, economic and social impacts of the use of sewage sludge on land. Final Report. Part III: Project Interim Reports. [http://ec.europa.eu/environment/waste/sludge/pdf/part\\_iii\\_report.pdf](http://ec.europa.eu/environment/waste/sludge/pdf/part_iii_report.pdf) (consultado el 9 de noviembre de 2010).
- Mileu Ltd, WRc y RPA para la Comisión Europea, 2010 b. Environmental, economic and social impacts of the use of sewage sludge on land. Summary Report 2. Baseline Scenario, Analysis of Risk and Opportunities. [http://ec.europa.eu/environment/waste/sludge/pdf/part\\_ii\\_report.pdf](http://ec.europa.eu/environment/waste/sludge/pdf/part_ii_report.pdf) (consultado el 9 de noviembre de 2010).
- MMA, 2000. Libro blanco del agua en España. Dirección General de Obras Hidráulicas y Calidad de Aguas. Secretaría de Estado de Aguas y Costas.
- Morrison, R.T. y Boyd, R.N., 1998. Química Orgánica, quinta edición. New York University. Pearson Educación.
- Muir, D., Howard, P.H., Meylan, W., 2009. Identification of new, possible PB&T substances important in the Great Lakes region by screening of chemicals in commerce. Report to US EPA Great Lakes National Program Office, WSTD Contribution No. 09-045. <http://www.epa.gov/greatlakes/p2/PBTRreport.pdf> (consultado el 9 de noviembre de 2010).

## N

- Nametz, R.C., 1970. Flame-retarding synthetic Textiles Fibers. *Ind. Eng. Chem.* 62, 44-53.
- North, K.D., 2004. Tracking Polybrominated Diphenyl Ether Releasees in a Wastewater Treatment Plant Effluent, Palo Alto, California. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4484 - 4488.

## O

- Örn, U. y Klasson-Wehler, E., 1998. Metabolism of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether in rat and mouse. *Xenobiotica.* 28, 199-211.

OSE, 2010. Observatorio de Sostenibilidad de España. Informe sobre sostenibilidad en España 2009.

OxyChem, 2010. Dechlorane Plus manual. [http://www.oxy.com/Our\\_Businesses/chemicals/Documents/dechlorane\\_plus/dechlorane\\_plus.pdf](http://www.oxy.com/Our_Businesses/chemicals/Documents/dechlorane_plus/dechlorane_plus.pdf) (consultado el 9 de noviembre de 2010).

## P

Pettersson, A., van, B.B., Engwall, M., Jimenez, B., 2004. Polybrominated diphenylethers and methoxylated tetrabromodiphenylethers in cetaceans from the Mediterranean Sea. *Arch. Environ. Contam Toxicol.* 47, 542-550.

Pettigrew, A., 1993. Halogenated flame retardants. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical technology* 10, 954-976.

PNA, 2006. Plan Nacional de Aplicación del Convenio de Estocolmo y el Reglamento 850/2004, sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes. Subdirección General de Calidad del Aire y Prevención de Riesgos del Ministerio de Medio Ambiente. [http://www.mma.es/secciones/calidad\\_contaminacion/quimicos/pops/pdf/pn\\_estocolmo\\_nov06.pdf](http://www.mma.es/secciones/calidad_contaminacion/quimicos/pops/pdf/pn_estocolmo_nov06.pdf) (consultado el 9 de noviembre de 2010).

PNLD-I, 2001. Plan Nacional de Lodos de Depuradoras de Aguas Residuales-EDAR (2001-2006). BOE 2001 de 29 octubre, 166, 25297-25304.

## Q

Qiu, X., Marvin, C.H., Hites, R.A., 2007a. Dechlorane plus and other flame retardants in a sediment core from Lake Ontario. *Environ. Sci. Technol.* 41, 6014-6019.

Qiu, X., Mercado-Feliciano, M., Bigsby, R.M., Hites, R.A., 2007b. Measurement of polybrominated diphenyl ethers and metabolites in mouse plasma after exposure to a commercial pentabromodiphenyl ether mixture. *Environ. Health Perspect.* 115, 1052-1058.

Qiu, X. y Hites, R., 2008. Dechlorane plus and other flame retardants in tree bark from the northeastern United States. *Environ. Sci. Technol.* 42, 31 - 36.

Qiu, X., Bigsby, R.M., Hites, R.A., 2009. Hydroxylated metabolites of polybrominated diphenyl ethers in human blood samples from the United States. *Environ. Health Perspect.* 117, 93-98.

## R

Rahman, F., Langford, K. H., Scrimshaw, M. D., Lester, J. N., 2001. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants. *Sci. Total Environ.* 275, 1-17.

Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de los lodos de depuración del sector agrario.

Ren, G., Yu, Z., Ma, S., Li, H., Peng, P., Sheng, G., Fu, J., 2009. Determination of dechlorane plus in Serum from electronic dismantling workers in south China. *Environ. Sci. Technol.* 43, 9453-9457.

Ricklund, N., Kierkegaard, A., McLachland, M., 2008. An international survey of decabromodiphenyl ethane (deBDethane) and decabromodiphenyl ether (decaBDE) in sewage sludge samples. *Chemosphere* 73, 1799 - 1804.

Ross, S.T., 2001. *Inland Fishes of Mississippi*. Mississippi Department of Wildlife, Fisheries and Parks.

## S

- Sánchez-Brunete, C., Miguel, E., Tadeo, J., 2009. Analysis of polybrominated diphenyl ethers in sewage sludge by matrix solid-phase dispersion and isotope dilution GC-MS. *J. Sep. Sci.* 32, 109 – 117.
- Scarola, J.F., 1987. Freshwater fishes of New Hampshire. New Hampshire Fish and Game Department, Concord, NH, USA.
- Shen, L., Reiner, E.J., Macpherson, K.A., Kolic, T.M., Sverko, E., Helm, P.A., Bhavsar, S.P., Brindle, I.D., Marvin, C.H., 2010. Identification and screening analysis of halogenated norbornene flame retardants in the Laurentian Great Lakes: Dechloranes 602, 603, and 604. *Environ. Sci. Technol.* 44, 760-766.
- Shih, Y.H. y Wang, C.K., 2009. Photolytic degradation of polybromodiphenyl ethers under UV-lamp and solar irradiations. *J. Hazard. Mater.* 165, 34 – 38.
- Shin, M., Duncan, B., Seto, P., Falleta, P., Lee, D.Y., 2010. Dynamics of selected pre-existing polybrominated diphenylethers (PBDEs) in municipal wastewater sludge under anaerobic conditions. *Chemosphere* 78, 1220 – 1224.
- Sinkkonen, S., Rantalainen, A.L., Paasivirta, J., Lahtipera, M., 2004. Polybrominated methoxy diphenyl ethers (MeO-PBDEs) in fish and guillemot of Baltic, Atlantic and Arctic environments. *Chemosphere* 56, 767-775.
- Smith, L.M., Stalling, D.L., Johnson, J.L., 1984. Determination of part-per-trillion levels of polychlorinated dibenzofurans and dioxins in environmental samples. *Anal. Chem.* 56, 1830-1842.
- Song, M., Chu, S., Letcher, R.J., Seth, B., 2006. Fate, partitioning, and mass loading of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) during the treatment processing of municipal sewage. *Environ. Sci. Technol.* 40, 6241 – 6246.
- Stapleton, H.M., Dodder, N.G., Kucklick, J.R., Reddy, C.M., Schantz, M.M., Becker, P.R., Gulland, F., Porter, B.J., Wise, S.A., 2006. Determination of HBCD, PBDEs and MeO-BDEs in California sea lions (*Zalophus californianus*) stranded between 1993 and 2003. *Mar. Pollut. Bull.* 52, 522-531.
- Stenzel, J.I. y Markley, B.J., 1997. Pentabromodiphenyl oxide: Determination of the water solubility. Project No. 439C-109. Wildlife International, Ltd.
- Sverko, E., Tomy, G.T., Marvin, C.H., Zaruk, D., Reiner, E.J., Helm, P.A., Hill, B., McCarry, B.E., 2008. Dechlorane plus levels in sediment of the lower Great Lakes. *Environ. Sci. Technol.* 42, 361-366.
- Sverko, E., Reiner, E., Tomy, G.T., McCrindle, R., Shen, L., Arsenault, G., Zaruk, D., McPherson, K., Marvin, C.H., Helm, P.A., McCarry, B.E., 2010. Compound structurally related to Dechlorane plus in sediment and biota from Lake Ontario (Canada). *Environ. Sci. Technol.* 44, 574-579.

## T

- Takahashi, S., Sakai, S., Watanabe, I., 2006. An intercalibration study on organobromine compounds: Results on polybrominated diphenylethers and related dioxin-like compounds. *Chemosphere* 64, 234-244.
- Teuten, E.L., Xu, L., Reddy, C.M., 2005. Two abundant bioaccumulated halogenated compounds are natural products. *Science* 307, 917-920.
- Thoma, H., Hauschulz, G., Knorr, E., Hutzinger, O., 1987. Polybrominated dibenzofurans (PBDFs) and dibenzodioxins (PBDDs) from the pyrolysis of neat brominated diphenylethers. *Chemosphere* 16, 277-285.

- Thompson, M. y Wood, R., 1993. The international harmonized protocol for the proficiency testing of (chemical) analytical laboratories. *Pure & Appl. Chem.* 65, 2123 – 2144.
- Tittlemier, S.A., Halldorson, T., Stern, G.A., Tomy, G.T., 2002. Vapor pressures, aqueous solubilities, and Henry's law constants of some brominated flame retardants. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1804-1810.
- Tomy, G.T., Pleskach, K., Ismail, N., Whittle, D.M., Helm, P.A., Sverko, E., Zaruk, D., Marvin, C.H., 2007. Isomers of Dechlorane Plus in Lake Winnipeg and Lake Ontario food webs. *Environ. Sci. Technol.* 41, 2249-2254.
- TPA, Toronto Port Authority, 2006. Western channel Maintenance Dredging. Canadian Environmental Assessment Registry (06-01-19783). <http://www.acee-ceaa.gc.ca/052/details-eng.cfm?pid=19783> (consultado el 9 de noviembre de 2010).
- Troitzsch, J.H., 1979. The mode of action of flame retardants in plastics. Translated from *Kunststoffe, German Plastics.* 69, 557-562.
- Troitzsch, J.H., 1983. Methods for the fire protection of plastics and coatings by flame retardant and intumescent materials. *Progress in Organic Coatings.* 11, 41-69.
- Troitzsch, J.H., 1990. International plastics flammability handbook: principles, regulations, testing and approval. Hanser Publishers, 2<sup>nd</sup> ed. Munich, Germany.
- Troitzsch, J.H., 1998. Overview of flame retardants. *Chemica Oggi* 16.
- TTP, 2010. History of Tommy Thompson Park. Toronto and Region Conservation Authority. <http://www.tommythompsonpark.ca/home/history.dot> (consultado el 9 de noviembre de 2010)

## U

- UBA, 1999. Bericht des Umweltbundesamtes. Die polybromierten Diphenylether (PBDE) als wichtige Vertreter bromhaltiger Flammschutzmittel -Sach- stand und Mabnahmcorschläge. Federal Environmental Agency, Germany.
- Ueno, D., Darling, C., Alae, M., Pacepavicius, G., Teixeira, C., Campbell, L., Letcher, R.J., Bergman, A., Marsh, G., Muir, D., 2008. Hydroxylated polybrominated diphenyl ethers (OH-PBDEs) in the abiotic environment: surface water and precipitation from Ontario, Canada. *Environ. Sci. Technol.* 42, 1657-1664.
- UNEP, 2001. United Nations Environment Programme. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs). <http://chm.pops.int/> (consultado el 9 de noviembre de 2010).
- U.S. EPA, 1976. United States Environmental Protection Agency. A study for flame retardants in textiles. EPA-560/1-76-001: NTIS PB-251-44.
- U.S. EPA, 2002. Species Profile: Brown Bullhead, [http://www.epa.gov/region1/ge/thesite/restofriver/reports/final\\_era/B%20-%20Focus%20Species%20Profiles/EcoRisk\\_Profile\\_brown\\_bullhead.pdf](http://www.epa.gov/region1/ge/thesite/restofriver/reports/final_era/B%20-%20Focus%20Species%20Profiles/EcoRisk_Profile_brown_bullhead.pdf) (consultado el 9 de noviembre de 2010).
- U.S. EPA, 2004. United States Environmental Protection Agency. Robust Summaries and Test Plans: Dechlorane Plus CAS NO. 13560-89-9.
- U.S. EPA, 2010. United States Environmental Protection Agency Toxic Substances Control Act (TSCA). <http://www.epa.gov/oppt/iur/tools/data/2002-vol.html> (consultado el 9 de noviembre de 2010).
- U.S. NRC, 1978. Kepone, mirex, hexachlorocyclopentadiene - an environmental assessment., Washington DC, US Department of Commerce.
- Ulsamer, A.G., Osterberg, R.E., McLaughlin, J.R., 1980. Flame retardant chemicals in textiles. *Clin Toxicol.* 17, 101-131.

## V

- van Babel, B., Dam, M., Tysklind, M., Lindström, G., 2001. Levels of polybrominated diphenyl ethers in marine mammals. *Organohalogen Compd.* 52, 99-103.
- Valters, K., Li, H., Alaei, M., D'Sa, I., Marsh, G., Bergman, A., Letcher, R.J., 2005. Polybrominated diphenyl ethers and hydroxylated and methoxylated brominated and chlorinated analogues in the plasma of fish from the Detroit River. *Environ. Sci. Technol.* 39, 5612-5619.
- Vetter, W., 2001a. A GC/ECNI-MS method for the identification of lipophilic anthropogenic and natural brominated compounds in marine samples. *Anal. Chem* 73, 4951-4957.
- Vetter, W., Scholz, E., Gaus, C., Muller, J.F., Haynes, D., 2001b. Anthropogenic and natural organohalogen compounds in blubber of dolphins and dugongs (*Dugong dugon*) from northeastern Australia. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 221-231
- Vetter, W., Stoll, E., Garson, M.J., Fahey, S.J., Gaus, C., Muller, J.F., 2002. Sponge halogenated natural products found at parts-per-million levels in marine mammals. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2014-2019.
- Vetter, W. y Jun, W., 2003. Non-polar halogenated natural products bioaccumulated in marine samples. II. Brominated and mixed halogenated compounds. *Chemosphere.* 52, 423-431.
- Voet, D., 2006. *Bioquímica*. Editorial Médica Panamericana, 3° Edición. ISBN: 10-950-06-2301-3.

## W

- Wania, F. y Dugani, C.B., 2003. Assessing the long-range transport potential of polybrominated diphenyl ethers: a comparison of four multimedia models. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 1252-1261.
- Wang, Y., Zhang, Q., Lv, J., Li, A., Liu, H., Li, G., Jiang, G., 2007. Polybrominated diphenyl ethers and organochlorine pesticides in sewage sludge of wastewater treatment plants in China. *Chemosphere* 68, 1683-1691.
- Wang, D.G., Yang, M., Qi, H., Sverko, E., Ma, W.L., Li, Y.F., Alaei, M., Reiner, E.J., Shen, L., 2009. An Asia-specific source of Dechlorane Plus: Concentrations, isomers profiles, and other related compounds. *Environ. Sci. Technol.* 44, 6608 - 6613.
- Watanabe, I. y Tatsukawa, R., 1990. Anthropogenic brominated aromatics in the Japanese environment. *Proceedings Workshop on Brominated Aromatics Flame Retardants*. Swedish National Chemicals Inspectorate, Solna, Sweden.
- WHO, 1984. World Health Organization. Mirex. *Environmental Health Criteria* 44.
- WHO, 1994a. World Health Organization. Polybrominated biphenyls. *Environmental Health Criteria* 152.
- WHO, 1994b. World Health Organization. Brominated diphenyl ethers. *Environmental Health Criteria* 162.
- WHO, 1995. World Health Organization. Tetrabromobisphenol A and derivatives. *Environmental Health Criteria* 172.
- WHO, 1997. World Health Organization. Flame retardants: A General Introduction. *Environmental Health Criteria* 192.
- Wong, A., Duan-Lei, Y., Alaei, M., Wania, F., 2001. Vapor pressures of the polybrominated diphenyl ethers. *J. Chem. Eng. Data.* 46, 239-242.

**X**

**Y**

Yu, Z., Zheng, K., Ren, G., Zheng, Y., Ma., S., Peng, P., Wu, M., Sheng, G., Fu, J., 2010. Identification of hydroxylated octaand nona-bromodiphenyl ethers in human serum from electronic waste dismantling workers. *Environ. Sci. Technol.* 44, 3979-3985.

**Z**

Zhu, L. y R. Hites, R., 2006. Brominated flame retardants in tree bark from North America. *Environ. Sci. Technol.* 40, 3711 - 3716.

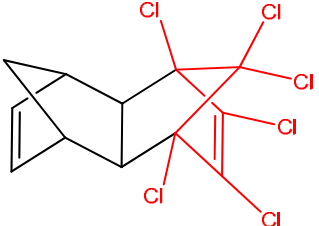
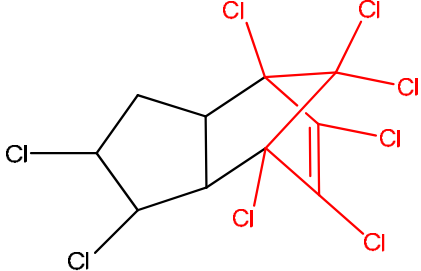
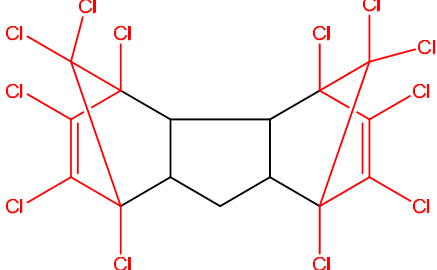
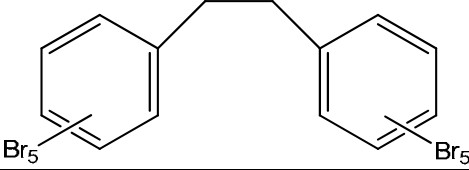
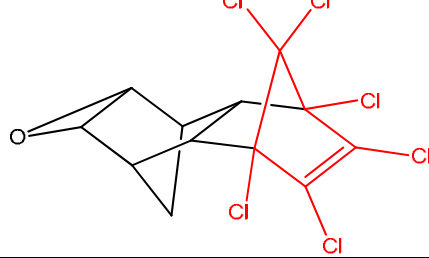
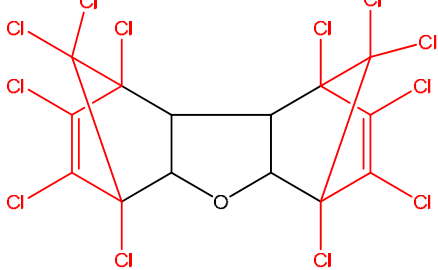




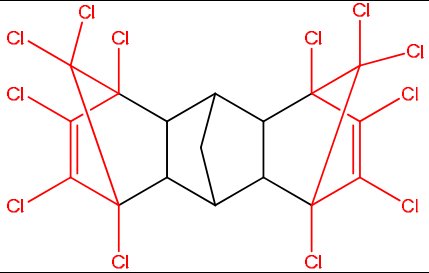
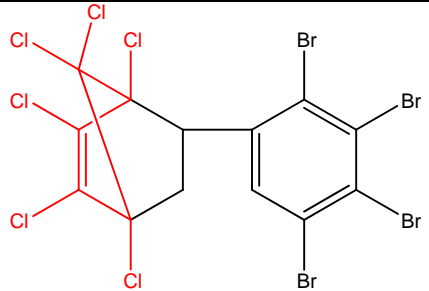
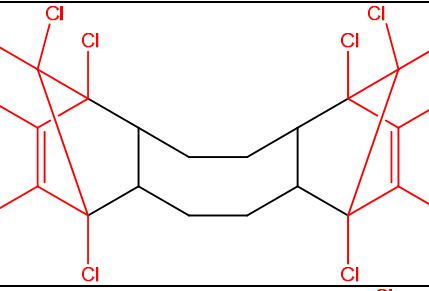
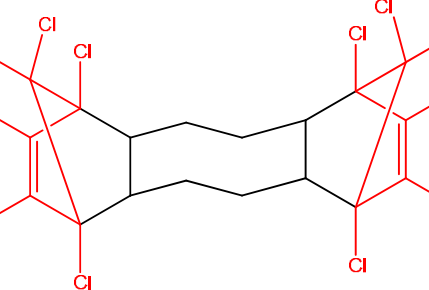
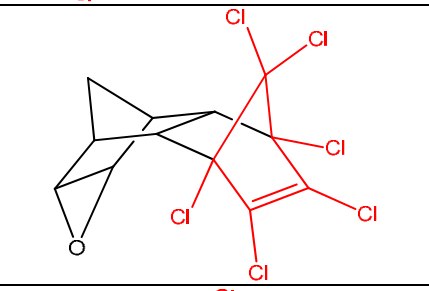
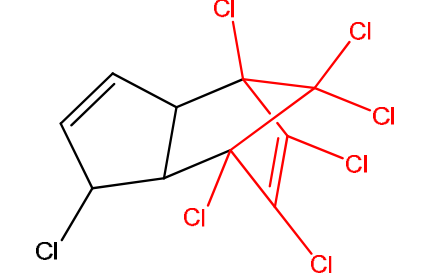
**ANEXOS.-**

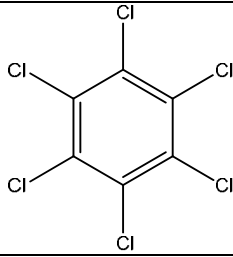
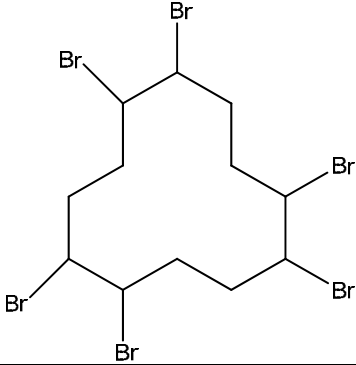
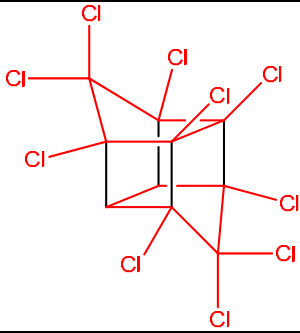
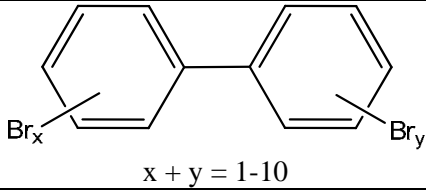
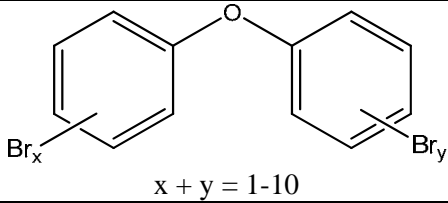
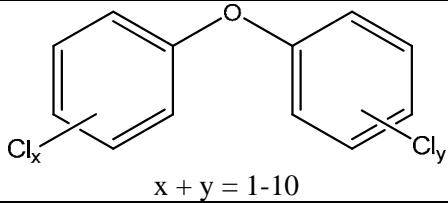
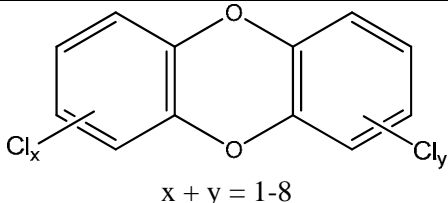


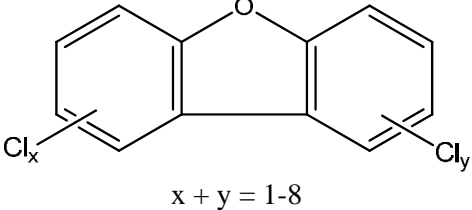
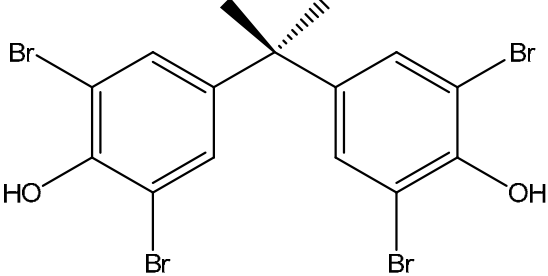
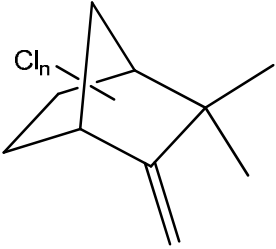
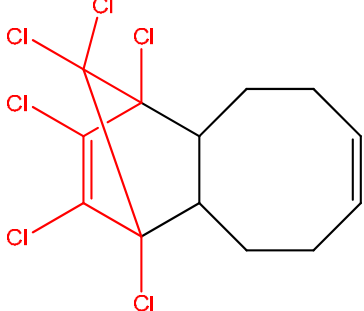
## ANEXO I.- COMPUESTOS DESCRITOS

NOMBRE	ESTRUCTURA	CAS N°
Aldrina		309-00-2
Clordano		57-74-9
Clordano Plus (CP)		
DBDPE		84852-53-9
Dieldrina		60-57-1
Dec 602		31107-44-5

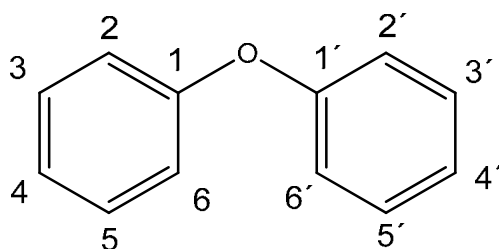
Anexo I.- Compuestos analizados

Dec 603		13560-91-4
Dec 604		34571-16-9
Declorane 605 <i>syn</i> -DP		13560-89-9
Declorane 605 <i>anti</i> -DP		13560-89-9
Endrina		72-20-8
Heptacloro		76-44-8

<p>HCB</p>		<p>118-74-1</p>
<p>HBCDD</p>		<p>25637-99-4</p>
<p>Mirex</p>		<p>2385-85-5</p>
<p>PBB</p>	 <p><math>x + y = 1-10</math></p>	<p>13654-09-6 (decaBB)</p>
<p>PBDE</p>	 <p><math>x + y = 1-10</math></p>	<p>1163-19-5 (BDE-209)</p>
<p>PCB</p>	 <p><math>x + y = 1-10</math></p>	
<p>PCDD</p>	 <p><math>x + y = 1-8</math></p>	

PCDF	 <p style="text-align: center;"><math>x + y = 1-8</math></p>	
TBBPA		79-94-7
Toxafeno		8001-35-2
1,5-DPMA		

## ANEXO II.-NOMBRE Y NÚMERO DE LOS PBDE ANALIZADOS



Grado de bromación	Nombre	Número
1	2-Bromodifenil éter <sup>b</sup>	BDE-1
	3-Bromodifenil éter <sup>b</sup>	BDE-2
	4-Bromodifenil éter <sup>b</sup>	BDE-3
2	2,4-Dibromodifenil éter <sup>b</sup>	BDE-7
	2,6-Dibromodifenil éter <sup>b</sup>	BDE-10
	4,4'-Dibromodifenil éter <sup>b</sup>	BDE-15
3	2,2',4-Tribromodifenil éter <sup>a,b</sup>	BDE-17
	2,2',4'-Tribromodifenil éter <sup>a,b</sup>	BDE-28
	2,2,6-Tribromodifenil éter <sup>b</sup>	BDE-30
4	2,2',4,4'-Tetrabromodifenil éter <sup>a,b</sup>	BDE-47
	2,3',4,4'-Tetrabromodifenil éter <sup>a,b</sup>	BDE-66
	3,3',4,4'-Tetrabromodifenil éter <sup>a,b</sup>	BDE-77
5	2,2',3,4,4'-Pentabromodifenil éter <sup>a,b</sup>	BDE-85
	2,2',4,4',5-Pentabromodifenil éter <sup>a,b</sup>	BDE-99
	2,2',4,4',6-Pentabromodifenil éter <sup>a,b</sup>	BDE-100
	2,3',4,4',6-Pentabromodifenil éter <sup>a,b</sup>	BDE-119
	3,3',4,4',5-Pentabromodifenil éter <sup>b</sup>	BDE-126
6	2,2',3,4,4',5'-Hexabromodifenil éter <sup>a,b</sup>	BDE-138
	2,2',3,4,4',6-Hexabromodifenil éter <sup>b</sup>	BDE-139
	2,2',3,4,4',6'-Hexabromodifenil éter <sup>b</sup>	BDE-140
	2,2',4,4',5,5'-Hexabromodifenil éter <sup>a,b</sup>	BDE-153
	2,2',4,4',5',6-Hexabromodifenil éter <sup>a,b</sup>	BDE-154
	2,2',3,3',4,4',6-Heptabromodifenil éter <sup>b</sup>	BDE-171
7	2,2',3,4,4',5,5'-Heptabromodifenil éter <sup>b</sup>	BDE-180
	2,2',3,4,4',5',6-Heptabromodifenil éter <sup>a,b</sup>	BDE-183
	2,2',3,4,4',6,6'-Heptabromodifenil éter <sup>a,b</sup>	BDE-184
	2,3,3',4,4',5',6-Heptabromodifenil éter <sup>a,b</sup>	BDE-191
	2,2',3,3',4,4',5,6'-Octabromodifenil éter <sup>a,b</sup>	BDE-196
8	2,2',3,3',4,4',6,6'-Octabromodifenil éter <sup>a,b</sup>	BDE-197
	2,2',3,3',4,5',6,6'-Octabromodifenil éter <sup>b</sup>	BDE-201
	2,2',3,4,4',5,5',6-Octabromodifenil éter <sup>b</sup>	BDE-203
	2,3,3',4,4',5,5',6-Octabromodifenil éter <sup>b</sup>	BDE-205
9	2,2',3,3',4,4',5,5',6-Nonabromodifenil éter <sup>a,b</sup>	BDE-206
	2,2',3,3',4,4',5,6',6-Nonabromodifenil éter <sup>a,b</sup>	BDE-207
	2,2',3,3',4,5,5',6',6-Nonabromodifenil éter <sup>b</sup>	BDE-208
10	Decabromodifenil éter <sup>a,b</sup>	BDE-209

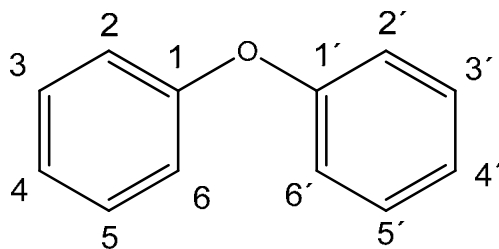
<sup>a</sup> Congéneres analizadazos en lodos de EDAR

<sup>b</sup> Congéneres analizados en plasma de Pez Gato





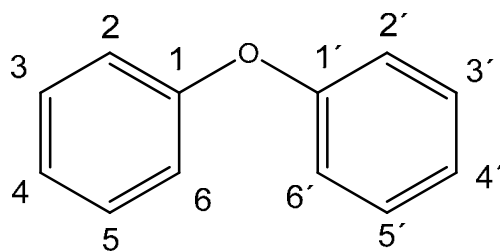
### ANEXO III. NOMBRE Y NÚMERO DE LOS MeO-PBDE ANALIZADOS



Grado de Bromación	Nombre	Número
1	2'-metoxi-4-bromodifenil éter	2'-MeO-BDE-3
2	2'-metoxi-2,4-dibromodifenil éter 3'-metoxi-2,4-dibromodifenil éter	2'-MeO-BDE-7 3'-MeO-BDE-7
3	4'-metoxi-2,2',4-tribromodifenil éter 2'-metoxi-2,4,4'-tribromodifenil éter 3'-metoxi-2,4,4'-tribromodifenil éter	4'-MeO-BDE-17 2'-MeO-BDE-28 3'-MeO-BDE-28
4	4-metoxi-2,2',3,4'-tetrabromodifenil éter 6-metoxi-2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter 3-metoxi-2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter 5-metoxi-2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter 4'-metoxi-2,2',4,5'-tetrabromodifenil éter 2'-metoxi-2,3',4,5-tetrabromodifenil éter	4-MeO-BDE-42 6-MeO-BDE-47 3-MeO-BDE-47 5-MeO-BDE-47 4'-MeO-BDE-49 2'-MeO-BDE-68
5	6'-metoxi-2,2',3,3',4-pentabromodifenil éter 6'-metoxi-2,2',3,4,4'-pentabromodifenil éter 4'-metoxi-2,2',3,4',5-pentabromodifenil éter 6'-metoxi-2,2',4,4',5-pentabromodifenil éter 5'-metoxi-2,2',4,4',5-pentabromodifenil éter 5'-metoxi-2,2',4,4',6-pentabromodifenil éter 4'-metoxi-2,2',4,5,5'-pentabromodifenil éter 4'-metoxi-2,2',4,5',6-pentabromodifenil éter	6-MeO-BDE-82 6-MeO-BDE-85 4'-MeO-BDE-90 6'-MeO-BDE-99 5'-MeO-BDE-99 5'-MeO-BDE-100 4'-MeO-BDE-101 4'-MeO-BDE-103
6	4-metoxi-2,2',3,4,4',6-hexabromodifenil éter 6-metoxi-2',3,3',4,4',5-hexabromodifenil éter	4-MeO-BDE-140 6-MeO-BDE-157



## ANEXO IV. NOMBRE Y NÚMERO DE LOS OH-PBDES ANALIZADOS



Grado de Bromación	Nombre	Número
1	2'-hidroxi-4-bromodifenil éter	2'-OH-BDE-3
2	2'-hidroxi-2,4-dibromodifenil éter 3'-hidroxi-2,4-dibromodifenil éter	2'-OH-BDE-7 3'-OH-BDE-7
3	4'-hidroxi-2,2',4'-tribromodifenil éter 2'-hidroxi-2,4,4'-tribromodifenil éter 3'-hidroxi-2,4,4'-tribromodifenil éter	4'-OH-BDE-17 2'-OH-BDE-28 3'-OH-BDE-28
4	4-hidroxi-2,2',3,4'-tetrabromodifenil éter 6-hidroxi-2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter 3-hidroxi-2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter 5-hidroxi-2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter 4'-hidroxi-2,2',4,5'-tetrabromodifenil éter 2'-hidroxi-2,3',4,5'-tetrabromodifenil éter	4-OH-BDE-42 6-OH-BDE-47 3-OH-BDE-47 5-OH-BDE-47 4'-OH-BDE-49 2'-OH-BDE-68
5	6'-hidroxi-2,2',3,3',4'-pentabromodifenil éter 6'-hidroxi-2,2',3,4,4'-pentabromodifenil éter 4'-hidroxi-2,2',3,4',5'-pentabromodifenil éter 6'-hidroxi-2,2',4,4',5'-pentabromodifenil éter 5'-hidroxi-2,2',4,4',5'-pentabromodifenil éter 5'-hidroxi-2,2',4,4',6'-pentabromodifenil éter 4'-hidroxi-2,2',4,5,5'-pentabromodifenil éter 4'-hidroxi-2,2',4,5',6'-pentabromodifenil éter	6-OH-BDE-82 6-OH-BDE-85 4'-OH-BDE-90 6'-OH-BDE-99 5'-OH-BDE-99 5'-OH-BDE-100 4'-OH-BDE-101 4'-OH-BDE-103
6	4-hidroxi-2,2',3,4,4',6'-hexabromodifenil éter 6-hidroxi-2',3,3',4,4',5'-hexabromodifenil éter	4-OH-BDE-140 6-OH-BDE-157



**ANEXO V.- OTROS TRABAJOS PUBLICADOS****2010**

Martínez, M.A., de la Torre, A., Concejero, M.A., Navarro, I., Sanz, P., 2010. Presencia de compuestos orgánicos persistentes en vertederos de residuos sólidos urbanos. *Residuos* 117, 44-51.

Sanz, P., de la Torre, A., Concejero, M.A., Navarro, I., Martínez, M.A., 2010. Evaluación de la presencia de sustancias PBT en residuos tóxicos y peligrosos. *Residuos* 116 (2010) 2-9.

Alonso, E., de la Torre, E., Martínez, M.A., Tarazona, J.V., 2010. Quantifying emission coefficients and release estimations for the discharge of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) through municipal sewers in Spain. Enviado a *Environmental Science and Pollution Research*.

Babín, M.M., Martínez, M.A., Sanz, P., Cañas, I., Concejero, M.A., de la Torre, A., Tarazona, J.V., 2010. Characterization of persistent-bioaccumulable-toxic (PBTs) substances in hazardous waste: Integration of chemical analysis and in vitro fish cells response. *Toxicological and Environmental Chemistry* 92, 223-242.

de la Torre, A., Concejero, M.A., Sverko, E., Shen, L., Martínez, M.A., Reiner, E., Alae, M., 2010. Effect of source temperature on the ECNI/MS spectra of Dechlorane Plus isomers. *Organohalogen compounds* 72.

de la Torre, A., Pacepavicius, G., Shen, L., Reiner, E., Jiménez, B., Alae, M., Martínez, M.A., 2010. Dechlorane Plus and related compounds in Spanish air. *Organohalogen compounds* 72.

de la Torre, A., Shen, L., Reiner, E., Alae, M., Martínez, M.A., 2010. New halogenated norbornene flame retardants in sewage sludge from Spain. *Organohalogen compounds*, 72.

Concejero, M.A., de la Torre, A., Sanz, P., Martínez, M.A., 2010. Background and seasonal variation levels of POPs in Spanish atmosphere. *Organohalogen compounds* 72.

Sanz, P., Concejero, M.A., de la Torre, A., Navarro, I., Martínez, M.A., Martínez, K., Rivera-Austrui, J., Llerena, J.J., Abad, E., Rivera, J., 2010. PCDD/Fs, DL-PCBs, HCB and PAHs emissions in secondary aluminum casting plants: Evaluation in the frame of Spanish Dioxin Inventory. *Organohalogen compounds* 72.

Fernández, C., Pro, J., Torrijos, M., Babín, M.M., de la Torre, A., Concejero, M.A., Martínez, M.A., Tarazona, J.V., Carbonell, G., 2010. Effects assessment of municipal solid waste compost amendments on terrestrial organisms by using a terrestrial microcosm. SETAC Europe 20th Annual Meeting.

Carbonell, G., Martínez, M.A., Porcel, M.A., Torrijos, M., Jiménez, B., Sanz, P., Sáez, M., de la Torre, A., Fernández, C., Tarazona, J.V., 2010. Fate of organic and inorganic contaminants from Municipal Solid Waste compost amendments on soil. A semi-field study. SETAC Europe 20th Annual Meeting.

**2009**

de la Torre, A., Pacepavicius, G., Martínez, M.A., Darling, C., Muir, D., Alae, A., 2009. Methoxylated and Hydroxylated polybrominated diphenyl ethers in Brown Bullhead (*Ameiurus Nebulosus*) plasma from Lake Ontario. *Organohalogen compounds* 71, 2105-2110.

de la Torre, A., Sverko, E., Alae, M., Martínez, M.A., 2009. Detection of an "emerging" flame retardant, Dechlorane Plus, in Spanish Sewage Sludge. *Organohalogen compounds* 71, 1209-2102.

Concejero, M.A., de la Torre, A., Sanz, P., Martínez, M.A., 2009. PBTs levels in industrial waste samples. *Organohalogen compounds* 71, 1143-1147.

Guerra, P., de la Torre, A., Martínez, M.A., Eljarrat, E., Barceló, D., 2009. Identification and trace level determination of brominated flame retardants by liquid chromatography/quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22, 1-9.

Concejero, M.A., de la Torre, A., Sanz, P., Martínez, M.A., 2009. PCDD/Fs, PCBs and HCB in leachate and compost from different Spanish landfills. *Organohalogen compounds* 70, 1772.

Concejero, M.A., de la Torre, A., Sanz, P., Martínez, M.A., 2009. PCDD/Fs, PCBs and HCB in leachate and compost from different Spanish landfills. *Organohalogen compounds* 70, 1772.

de la Torre, A., Concejero, M.A., Sanz, P., Martínez, M.A., 2009. *New flame retardants in Spanish biosolids*. 20<sup>th</sup> International Conference on Toxic Organic Pollutant (TOP).

de la Torre, A., Concejero, M.A., Navarro, I., Sanz, P., Martínez, M.A., 2009. Flame retardants in Spanish sewage sludge used as fertilizer. II Jornadas de investigadores en formación en Ciencias de la Tierra (IIJIFCT), IGME. NIPO: 474-09-066-X.

Concejero, M.A., de la Torre, A., Navarro, I., Sanz, P., Martínez, M.A., 2009. Presence of POPs in Industrial waste samples. IX Reunión Científica de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines (SECyTA).

## 2008

de la Torre, A., Concejero, M.A., Sanz, P., Martínez, M.A., 2008. Waste characterization: occurrence and concentration of PCDD/Fs, PCBs, PBDEs and HCB. *Organohalogen compounds* 70, 1776.

de la Torre, A., Sanz, P., Martínez, M.A., 2008. Presence of PBDEs and DBDPE in leachate and compost from different Spanish landfills. *Organohalogen compounds* 70, 1958-1961.

Concejero, M.A., de la Torre, A., Sanz, P., Martínez, M.A., 2008. PCDD/Fs, PCBs and HCB in leachate and compost from different Spanish landfills. *Proceedings of the 28th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, Birmingham. Organohalogen Compounds Vol 70 (2008) p. 1772-1775*

de la Torre, A., Concejero, M.A., Sanz, P., Martínez, M.A., 2008. Analysis of BFRs in Spanish Biosolids: PBDEs and DBDPE. *Proceedings of the 7th Bienal Conference on Monitoring and Measurement of the Environment. EnviroAnalysis 2008*.

Babín, M.M., Martínez, M.A., Sanz, P., Concejero, M.A., de la Torre, A., Tarazona, J.V., 2008. Assessment of the different in Vitro cells responses to complex mixtures of dioxins and dioxin-like PCBs and PCDFs. 15th International Congress on In Vitro Toxicology, Stockholm 2008, p 76.

de la Torre, A., Guerra, P., Eljarrat, E., Martínez, M.A., Barceló, D., 2008. Development optimization and validation of a GC-HRMS method to analyse PBDEs in environmental samples. 12 Jornadas de Análisis Instrumental JAI

Alonso, E., de la Torre, A., Sanz, P., Martínez, M.A., 2008. Modelling the emission of Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) from Spanish urban areas. 18th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). REF TU010

Concejero, M.A., de la Torre, M.A., Sanz, P., Martínez, M.A., 2008. HCB, PBDE, PCDD, PCDF and PCB levels in sewage sludge from WWTP which flow into Spanish-Portuguese rivers. 1<sup>th</sup> Thematic Workshop of the EU Project RISKBASE. Monitoring and assessment of river pollutants: a step towards the implementation of risk based management plans. Case Studies of Portuguese river basins. 133.

López, M.J., Barro, J.R., Rodríguez, A., Alonso, A.M., Lobo, C., Martínez, M.A., Sobrados, L., Sanz, P., Domínguez, C., Ramón-Laca, C., Villén, L., Concejero, M.A., de la Torre, A., Navarro, I., Guerrero, A.M., Yébenes, L., Martínez, M.J., Plaza, A., Iribarren, I., 2008. Sewage sludge characterization program in the framework of the national plan in Spain. Third International Meeting on Environmental Biotechnology and Engineering (3IMEBE).

## 2007

de la Torre, A., Concejero, m.A., Sanz, P., Martínez, M.A., 2007. Presencia del decabromodifenil etano en lodos de depuradora españoles: optimización del método MS/MS. II Reunión nacional de dioxinas, furanos y compuestos orgánicos persistentes relacionados, 68-70

de la Torre, A., Guerra, P., Martínez, M.A., Eljarrat, E., Barceló, D., 2007. Identificación inequívoca y cuantificación a nivel ultratrazo de retardantes de llama bromados mediante LC-QqQ Linear Ion Trap-MS. II Reunión nacional de dioxinas, furanos y compuestos orgánicos persistentes relacionados, 91-93

Guerra, P., de la Torre, A., Eljarrat, E., Barceló, D., 2007. Simultaneous determination of HBCD stereoisomers and Tetrabromobisphenol A and related compounds by liquid chromatography tandem mass spectrometry.VII Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and related Techniques (SECyTA), 137

de la Torre, A., Concejero, M.A., Sanz, P., Martínez, M.A., 2007. Optimization of a MS/MS method for DBDPE: application to spanish sewage sludges. Organohalogen Compounds 69, 2702-2705.

Alonso, E., de la Torre, A., Martínez, M.A., Tarazona, J.V., 2007. Polybrominated difenil ethers (PBDEs) emission from Spanish urban sewage treatment plants. Organohalogen Compounds 69, 2694-2697.

de la Torre, A., Martínez, M.A., Sanz, P., Concejero, M.A., 2007. NCI-MS vs EI-MS for PBDEs analysis in Spanish sewage sludges. 4<sup>th</sup> International Workshop on Brominated Flame Retardants.

## 2006

de la Torre, A., Martínez, M. A., Sanz, P., 2006. Brominated flame retardants: a real environmental problem. VI Congreso internacional de la ANQUE “Química y desarrollo sostenible”.

de la Torre, A., Martínez, M. A., Sanz, P., 2006.Optimisation of polybrominated difenil ethers analysis by GC-NCI-MS. VI Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and related Techniques (SECyTA).

de la Torre, A., Martínez, M.A., Sanz, P., 2006. Analysis of polybrominated difenil ethers in environmental samples. 12<sup>th</sup> symposium on sample handling for environmental and biological analysis (IAEAC).

Martínez, M.A., Sanz, P., Ruiz, M.L., de la Torre, A., Concejero, M.A., Navarro, I., Fabrellas, B., 2006. Los compuestos orgánicos persistentes. Problemática y situación de estos peligrosos contaminantes ambientales. *Tecnoambiente* n° 163, 40-44. ISSN:1133-4665.

Eljarrat, E., Martínez, M.A., Sanz, P., Torre, A., Concejero, M.A., Barceló, D., 2006. PCDD, PCDF and dioxin-like PCB levels in fish samples from risk zones along the Ebro river basin, Spain. *Organohalogen Compounds* 68, 2109-2112.

Sanz, P., Concejero, M. A., Martínez, M. A., Navarro, I., de la Torre, A., 2006. Determination of PCDD/F levels in Spanish sewage sludge for being applied as raw in composting and agriculture. *Organohalogen Compounds* 68, 1099-1102.

Martínez, M. A., de la Torre, A., Sanz, P., Navarro, I., Concejero, M. A., 2006. Ocurrence of brominated flame retardants in sewage sludges from Spain: higher brominated difenil ethers contribution. *Organohalogen Compounds* 68, 1804-1807.

## **2005**

Martínez, M. A., Fabrellas, B., Navarro, I., de la Torre, A., Ramos, B., 2005. Final destination of some persistent organic pollutants (polybrominated difenil ethers): the house dust. 6° Congreso Ibérico y 3° Iberoamericano de Contaminación y Toxicología Ambiental, 92.

Fabrellas, B., Martínez, M.A., Ramos, B, Ruiz, M. L., Navarro, I., de la Torre, A., 2005. Results of an European survey based on PBDES analysis in household dust. *Organohalogen Compounds* 67 452-454.

Fabrellas, B., Ruiz, M.L., Martínez, M. A., de la Torre, A., 2005. Estudio de los resultados de la participación del Sector Cementero Español en el Inventario Nacional de Dioxinas y Furanos. Ed. CIEMAT. ISBN: 84-7834-506-X.

Fabrellas, B., Ruiz, M.L., Martínez, M.A. de la Torre, A., 2005. Inventario Español de dioxinas: evaluación de las emisiones de dioxinas y furanos generados en el sector cementero español durante el período 2000-2003. La influencia del uso de combustibles alternativos. *Cemento y Hormigón* 873, 60-69.