

UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A  
DISTANCIA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS ANALÍTICAS



TESIS DOCTORAL

ANÁLISIS Y EVALUACIÓN DE CONTAMINANTES  
ORGÁNICOS PERSISTENTES CLÁSICOS Y  
EMERGENTES EN EL ESPACIO NATURAL DE  
DOÑANA Y SU ENTORNO

JUAN MUÑOZ ARNAZ

Licenciado en Ciencias Químicas

MADRID, 2013

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS ANALÍTICAS

FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS DOCTORAL

ANÁLISIS Y EVALUACIÓN DE CONTAMINANTES  
ORGÁNICOS PERSISTENTES CLÁSICOS Y  
EMERGENTES EN EL ESPACIO NATURAL DE  
DOÑANA Y SU ENTORNO

Directoras:

Dra. Begoña Jiménez Luque

Dra. Pilar Fernández Hernando

JUAN MUÑOZ ARNAZ

MADRID, 2013

**Dña. PILAR FERNÁNDEZ HERNANDO**, Catedrática de Universidad del Departamento de Ciencias Analíticas de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Educación a Distancia.

**Hace constar:**

Que el presente trabajo titulado: **“Análisis y Evaluación de Contaminantes Orgánicos Persistentes Clásicos y Emergentes en el Espacio Natural de Doñana y su Entorno”**, ha sido realizado en el Departamento de Ciencias Analíticas de la Universidad Nacional de Educación a Distancia por el Licenciado **JUAN MUÑOZ ARNAZ** para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas.

Y para que conste, firma el presente informe, en Madrid, a dieciocho de octubre de dos mil trece.



Fdo.: Pilar Fernández Hernando

C/ Senda del Rey nº 9  
28040, Madrid

Tel: 00 34 91 398 73 96  
Fax: 00 34 91 398 83 79

<http://www.uned.es/dpto-ciencias-analiticas>

**D<sup>a</sup>. BEGOÑA JIMÉNEZ LUQUE, DOCTORA EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS E INVESTIGADOR CIENTÍFICO DEL  
INSTITUTO DE QUÍMICA ORGÁNICA GENERAL**

**CERTIFICA:**

Que el trabajo aquí presentado bajo el título: **“Análisis y Evaluación de Contaminantes Orgánicos Persistentes Clásicos y Emergentes en el Espacio Natural de Doñana y su Entorno”**, que constituye la memoria que presenta D. **Juan Muñoz Arnanz** para optar al grado de Doctor, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Análisis Instrumental y Química Ambiental del Instituto de Química Orgánica General (IQOG-CSIC). Así mismo, manifiesta que el trabajo descrito en la presente memoria reúne, en su opinión, todos los requisitos para su defensa y aprobación, por lo que autoriza su presentación para que sea defendido como **Tesis Doctoral**.

Y para que conste, firma el presente certificado en Madrid, a 18 de Octubre de 2013.

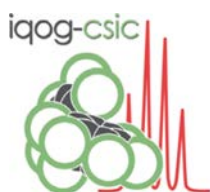


Fdo.: Dra. Begoña Jiménez Luque

# ANÁLISIS Y EVALUACIÓN DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES CLÁSICOS Y EMERGENTES EN EL ESPACIO NATURAL DE DOÑANA Y SU ENTORNO

Memoria para obtener el título de Doctor por la Universidad  
Nacional de Educación a Distancia (UNED)

## Directora del trabajo



Dra. Begoña Jiménez Luque  
Dpto. Análisis Instrumental y Química Ambiental  
Instituto de Química Orgánica General (IQOG)  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)



## Codirectora del trabajo



Dra. Pilar Fernández Hernando  
Dpto. Ciencias Químicas  
Facultad de Ciencias  
Universidad Nacional de Educación a Distancia

# *ÍNDICE*



# ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	I
TABLAS Y FIGURAS.....	V
CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	1
CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN GENERAL.....	9
2.1. Contaminantes organohalogenados, COP y Convenio de Estocolmo .....	11
2.1.1. PCBs .....	15
2.1.1. DDT .....	19
2.1.1. PCDDs y PCDFs .....	23
2.1.1. PBDEs.....	29
2.1.1. DP.....	34
2.2. Análisis de COP.....	40
2.2.1. Metodologías de tratamiento de muestra .....	40
2.2.2. Técnicas de análisis instrumental.....	43
2.3. Espacio Natural de Doñana .....	48
2.4. Las aves como organismos bioindicadores de contaminación .....	52
2.4.1. La cigüeña blanca como especie bioindicadora .....	53
2.4.2. Utilización de huevos como aproximación no destructiva ni invasiva .....	55
Referencias .....	57



<b>CAPÍTULO 3: ANÁLISIS Y DETERMINACIÓN DE DDT EN EL ENTORNO DE DOÑANA.....</b>	<b>69</b>
<b>3.1. Introducción.....</b>	<b>71</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>75</b>
<b>3.2. Desarrollo y optimización de un método de cromatografía de gases multidimensional en su modalidad <i>heart-cutting</i> para la determinación del <i>o,p'</i>-DDT .....</b>	<b>78</b>
<b>Artículo Científico:</b> Optimization of a heart-cutting multidimensional gas chromatography-based method for the assessment of enantiomeric fractions of <i>o,p'</i> -DDT in environmental samples.....	<b>81</b>
<b>3.3. Presencia reciente del DDT tras 30 Años de prohibición en España. Estudio en suelos de cultivo del suroeste de España .....</b>	<b>86</b>
<b>Artículo Científico:</b> New DDT inputs after 30 years of prohibition in Spain. A case study in agricultural soils from south-western Spain ...	<b>89</b>
 <b>CAPÍTULO 4: CONTAMINANTES EMERGENTES EN DOÑANA:</b>	
<b>PBDES Y DP.....</b>	<b>101</b>
<b>4.1. Introducción.....</b>	<b>103</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>107</b>
<b>4.2. Predominancia del BDE-209 y otros polibromodifenil éteres de alto grado de bromación en huevos de cigüeña blanca (<i>Ciconia ciconia</i>) de España .....</b>	<b>109</b>
<b>Artículo Científico:</b> Predominance of BDE-209 and other higher brominated diphenyl ethers in eggs of white stork ( <i>Ciconia ciconia</i> ) colonies from Spain.....	<b>112</b>
<b>4.3. Declorano plus y posibles productos de degradación en huevos de cigüeña blanca en España.....</b>	<b>120</b>

<b>Artículo Científico:</b> Dechlorane plus and possible degradation products in white stork eggs from Spain.....	123
<b>CAPÍTULO 5: EVOLUCIÓN DE COP Y DP EN DOÑANA .....</b>	<b>129</b>
<b>5.1. Introducción.....</b>	<b>131</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>133</b>
<b>5.2. Diferencias en niveles y comportamiento de contaminantes clásicos y emergentes en huevos de cigüeña blanca de España comparados en el intervalo 1999-2011 .....</b>	<b>135</b>
<b>Artículo Científico:</b> Dissimilar outcomes for emerging and legacy contaminants in white stork eggs from Spain (1999-2001) .....	139
<b>CAPÍTULO 6: DISCUSIÓN INTEGRADORA.....</b>	<b>191</b>
<b>CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES.....</b>	<b>207</b>

# *ABREVIATURAS*



# ABREVIATURAS

<b>AhR</b>	Receptor de hidrocarburos aromáticos
<b>BDE</b>	Brominated diphenyl ether (Difenil éter bromado. Cada uno de los congéneres de PBDEs)
<b>CO</b>	Compuestos organohalogenados
<b>COP</b>	Contaminante/s orgánico/s persistente/s
<b>CYP450</b>	Citocromo P450
<b>DDD</b>	Dichloro-diphenyl-dichloroethane (Dicloro-difenil-dicloroetano)
<b>DDE</b>	Dichloro-diphenyl-dichloroethene (Dicloro-difenil-dicloroetano)
<b>DDT</b>	Dichloro-diphenyl-trichloroethane (Dicloro-difenil-tricloroetano)
<b>DDTs</b>	Conjunto de DDT+DDE+DDD
<b>DP</b>	Dechlorane plus (Declorano plus)
<b>DNP</b>	Doñana National Park (Parque Nacional de Doñana)
<b>d.w.</b>	Dry weight (Peso seco)
<b>ECD</b>	Electron capture detection (Detección de captura de electrones)
<b>EI</b>	Electron impact (Impacto electrónico)
<b>END</b>	Espacio Natural de Doñana
<b>EPA</b>	Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Medioambiental)
<b>GC</b>	Gas chromatography (Cromatografía de gases)
<b>GC x GC</b>	Comprehensive two-dimensional gas chromatography (Cromatografía de gases completa en dos dimensiones)
<b>GMP</b>	General monitoring plan (Plan global de monitorización)
<b>HRMS</b>	High resolution mass spectrometry (Espectrometría de masas de alta resolución)
<b>IARC</b>	International Agency for Research on Cancer (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer)
<b>IL</b>	Ionic liquid (Líquido iónico)
<b>IUPAC</b>	International Union of Pure and Applied Chemistry (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada)
<b>Kow</b>	Coefficiente de reparto octanol-agua
<b>LC</b>	Liquid chromatography (Cromatografía de líquidos)
<b>LOD</b>	Limit of detection (Límite de detección)

<b>LOQ</b>	Limit of quantification (Límite de cuantificación)
<b>LRMS</b>	Low resolution mass spectrometry (Espectrometría de masas de baja resolución)
<b>MIP</b>	Molecularly imprinted polymer (Polímero de impresión molecular)
<b>MDGC</b>	Multidimensional gas chromatography (Cromatografía de gases multidimensional)
<b>MS</b>	Mass spectrometry (Espectrometría de masas)
<b>MSPD</b>	Matrix solid phase dispersion (Dispersión de la matriz en fase sólida)
<b>NCI</b>	Negative chemical ionization (Ionización química negativa)
<b>PBT</b>	Persistent, bioaccumulative and toxic (Persistente, bioacumulativo y tóxico)
<b>PBDEs</b>	Polybrominated diphenyl ethers (Polibromodifenil éteres)
<b>PCBs</b>	Polychlorinated biphenyls (Bifenilos policlorados)
<b>PCDDs</b>	Polychlorodibenzo- <i>p</i> -dioxins (Policlorodibenzo- <i>p</i> -dioxinas)
<b>PCDFs</b>	Polychlorodibenzofuranes (Policlorobenzofuranos)
<b>PCDD/Fs</b>	Suma de dioxinas y furanos
<b>p.f.</b>	Peso fresco
<b>POPs</b>	Persistent organic pollutants (Contaminantes orgánicos persistentes)
<b>PTV</b>	Programmed temperature vaporization injector (Inyector de vaporización a temperatura programada)
<b>SD</b>	Standard deviation (Desviación estándar)
<b>REACH</b>	Registration, evaluation, authorization and restriction of chemicals (Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de sustancias y mezclas químicas)
<b>RSD</b>	Relative standard deviation (Desviación estándar relativa)
<b>TEF</b>	Toxic equivalency factor (Factor de equivalencia tóxica)
<b>TEQ</b>	Toxic equivalent quantity (Equivalente tóxico total)
<b>UNESCO</b>	United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura)
<b>UNEP</b>	United Nations Environment Programme (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente)
<b>WHO</b>	World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)
<b>w.w.</b>	Wet weight (Peso Fresco)

## *TABLAS Y FIGURAS*





# TABLAS

<b>TABLA 2.1.</b> Relación de los COP incluidos en el Convenio de Estocolmo a partir del año 2001 .....	<b>14</b>
<b>TABLA 2.2.</b> Resumen de los grupos homólogos de PCBs y sus características .....	<b>17</b>
<b>TABLA 2.3.</b> Valores de propiedades físico-químicas de algunos PCBs .....	<b>17</b>
<b>TABLA 2.4.</b> Resumen de algunas propiedades físico-químicas del <i>p,p'</i> -DDT, <i>p,p'</i> -DDE y <i>p,p'</i> -DDD .....	<b>22</b>
<b>TABLA 2.5.</b> Resumen de posibles fuentes de producción de PCDD/Fs.....	<b>24</b>
<b>TABLA 2.6.</b> Resumen de los grupos homólogos de PCDDs y PCDFs y sus características .....	<b>25</b>
<b>TABLA 2.7.</b> Valores de algunas propiedades físico-químicas para la 2,3,7,8-TCDD y OCDD.....	<b>26</b>
<b>TABLA 2.8.</b> Valores de TEF propuestos por la WHO para peces, aves y mamíferos.....	<b>28</b>
<b>TABLA 2.9.</b> Resumen de los grupos homólogos de PBDEs y sus características .....	<b>30</b>
<b>TABLA 2.10.</b> Valores de propiedades físico-químicas de algunos congéneres de PBDEs .....	<b>31</b>
<b>TABLA 2.11.</b> Resumen de la composición, nombres comerciales, usos mayoritarios y demanda de las principales mezclas técnicas de PBDEs .....	<b>33</b>
<b>TABLA 2.12.</b> Valores de algunas propiedades físico-químicas del DP .....	<b>36</b>
<b>TABLA 2.13.</b> Esquema de procedimientos más habitualmente utilizados en cada una de las etapas del tratamiento de muestra para el análisis de COP .....	<b>42</b>
<b>TABLA 2.14.</b> Resumen de los analizadores de LRMS y HRMS más frecuentemente empleados en el análisis de COP y otros xenobióticos .....	<b>46</b>

## FIGURAS

FIGURA 2.1. Estructura química general de los PCBs.....	16
FIGURA 2.2. Estructuras y nombres IUPAC de los isómeros $p,p'$ y $o,p'$ del DDT, DDE y DDD .....	21
FIGURA 2.3. Estructuras químicas generales de las PCDD/Fs .....	23
FIGURA 2.4. Estructura química general de los PBDEs .....	30
FIGURA 2.5. Estructura química general y nombre IUPAC del DP .....	35
FIGURA 2.6. Estructuras de los diastereoisómeros <i>syn</i> y <i>anti</i> del DP .....	35
FIGURA 2.7. Estructuras de compuestos relacionados con el DP .....	39
FIGURA 2.8. Localización y configuración del Espacio Natural de Doñana .....	49
FIGURA 2.9. Pareja de cigüeña blanca en nido .....	54

*Capítulo 1*  
*Antecedentes y Objetivos*



# ANTECEDENTES

---

El acelerado crecimiento demográfico en el mundo, acompañado del correspondiente aumento de la demanda de alimentos, así como del mantenimiento de un estilo de vida asociado a un alto grado de consumo de productos y bienes materiales ha traído como consecuencia, inevitable, un drástico incremento de la síntesis de productos químicos. La mayor parte de estos productos químicos son xenobióticos por ser compuestos sintetizados por el hombre y no existentes en la naturaleza. A su vez, los xenobióticos tienden a ser contaminantes ambientales toda vez que su presencia puede conllevar algún daño o desequilibrio, irreversible o no, en el medio ambiente o en los seres vivos.

De entre el vasto número de xenobióticos que pueden considerarse como contaminantes ambientales, los compuestos organohalogenados (CO) ocupan un espacio prominente por su diversidad y abundancia y muy especialmente por sus posibles efectos tóxicos. Estos compuestos se han utilizado y aun hoy se utilizan en una gran variedad de aplicaciones como biocidas, fluidos dieléctricos y refrigerantes, retardantes de llama, disolventes, plastificantes, fluidos hidráulicos, agentes desengrasantes y de limpieza, compuestos intermedios de síntesis química, etc.

Las características especiales de los CO se deben fundamentalmente a las propiedades fisicoquímicas de la unión carbono-halógeno (F, Cl, Br, I). Este enlace lleva asociado unas altas entalpías de disociación y unos altos momentos dipolares, ambos decrecientes al aumentar la masa molecular del halógeno ( $F > Cl > Br > I$ ). Consecuencias directas de la naturaleza de dicho enlace son la hidrofobicidad y lipofilia que presentan estos compuestos, lo cual, desde un punto de vista biológico, se traduce en una mayor resistencia a la biodegradación como consecuencia de su reducida biodisponibilidad al poder encontrarse secuestrados en tejidos grasos de los seres vivos. Igualmente y también debido a su lipofilia se observa cómo los CO con mucha frecuencia exhiben una tendencia a la biomagnificación en las cadenas tróficas.

La mayor producción de CO corresponde a compuestos clorados, seguida de los bromados y en menor medida a la de fluorados o iodados. La producción a gran escala de

este tipo de compuestos desde el primer cuarto del siglo XX sumada a la generación de otros CO que surgen como subproductos o productos colaterales en procesos de combustión o químicos/industriales, se ha traducido en la liberación y vertido en el medio ambiente de cantidades ingentes de los mismos.

En 1962, la obra publicada por Rachel Carson, *Silent Spring*, centró el foco de atención en las posibles consecuencias perniciosas que estos compuestos podían producir en los seres vivos, incluyendo al hombre, derivadas del uso indiscriminado de insecticidas organoclorados y en particular del dicloro-difenil-tricloroetano o DDT. Tras intensos debates públicos no exentos de una gran controversia, el DDT fue prohibido en E.E.U.U. en 1972. Desde entonces, comenzó a instalarse especialmente en los países desarrollados una creciente conciencia global en cuanto al uso y emisión de contaminantes, lo que se tradujo en importantes esfuerzos científicos encaminados a su investigación y control en el medio ambiente. Así, desde los años 70 se han desarrollado ejercicios de monitorización en diferentes matrices inicialmente favorecidos por el desarrollo del detector de captura de electrones, inventado por James Lovelock en 1961, que acoplado a la cromatografía de gases, permitió alcanzar niveles de sensibilidad suficiente para la detección de trazas de CO que se revelaron diseminadas en todos los compartimentos ambientales. Posteriormente, la espectrometría de masas como técnica de detección acoplada a la cromatografía de gases y de líquidos se fue haciendo cada vez más popular y disponible en los laboratorios analíticos, lo que permitió igualar, o incluso superar la sensibilidad necesaria en la detección de este tipo de sustancias, a la par que incrementó notablemente la selectividad en el análisis e identificación de las mismas.

De forma paralela, a medida que aumentó el conocimiento sobre el comportamiento y la presencia de estos compuestos en el medioambiente, se hizo necesario a nivel nacional e internacional la monitorización, clasificación, caracterización y regulación de sustancias químicas que podían ser contaminantes. Ejemplos de esto son: la Ley de Control de Sustancias Químicas en Japón (1973), el Acta de Control de Sustancias Tóxicas en E.E.U.U. (1976), la Legislación de Sustancias Existentes de la Comunidad Europea (1981) – hoy ampliamente superada por el Reglamento REACH imperante en la Unión Europea desde el año 2009 –, o la Lista de Sustancias Domésticas en Canadá (1986).

De manera más específica, en 1997 los gobiernos de E.E.U.U. y Canadá desarrollaron la clasificación PBT (Persistent, Bioaccumulative and Toxic) para la valoración de sustancias químicas peligrosas, implantando una legislación específica en la que se incluyó una lista inicial de 12 clases de compuestos, de los cuales únicamente tres no eran CO: mercurio, benzo[a]pireno y los compuestos organoplúmbicos.

Sin embargo, el máximo exponente de cooperación y acuerdo internacional se plasmó en la creación del Convenio de Estocolmo en 2001, auspiciado por el programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). Dicho convenio estableció una lista inicial de 12 clases de compuestos químicos –todos ellos CO- bajo la denominación de COP (Compuestos Orgánicos Persistentes) o POPs (en inglés, Persistent Organic Pollutants), para los que se establecieron prohibiciones o restricciones globales en cuanto a su producción y uso, y reducción de sus emisiones accidentales con el fin de proteger la salud del ser humano y el medio ambiente frente a los mismos.

La monitorización medioambiental se convierte en la principal herramienta para evaluar la efectividad de las medidas reguladoras de sustancias contaminantes, así como para seguir incrementando el conocimiento de las fuentes, distribución, comportamiento, dinámica e impacto de dichas sustancias en el medio ambiente. Así por ejemplo, basándose en las guías establecidas por el Plan Global de Monitorización (GMP, Global Monitoring Plan) apoyado por UNEP (United Nations Environment Programme- Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente), el Convenio de Estocolmo sugiere el aire y la leche materna como matrices prioritarias para la monitorización de COP y, de este modo, para poder obtener datos comparables de diferentes partes del planeta y evaluar la eficacia de las medidas reguladoras actualmente en marcha. Pero alternativamente al GMP, es posible encontrar en la literatura numerosos estudios de monitorización de COP y otros contaminantes en diversas matrices abióticas y bióticas que permiten cuantificar y valorar el grado de contaminación en diferentes ecosistemas. En este sentido, la biomonitorización, empleando muestras biológicas de distintas especies para la monitorización de COP cobra una especial relevancia, puesto que permite la evaluación del grado de contaminación total procedente de los diferentes compartimentos ambientales a los que un organismo seleccionado se expone en un determinado ecosistema. Adicionalmente,

en ocasiones la biomonitorización permite la evaluación de los posibles efectos derivados de los contaminantes a los que dicho organismo se halle sometido.

Por otra parte, el Espacio Natural de Doñana (END) está considerado como la mayor reserva ecológica para las aves en Europa y una parte del mismo (el Parque Nacional) en 1994 fue declarado por la UNESCO Patrimonio de la Humanidad. Sin embargo y pese a la ausencia de asentamientos permanentes y al alto grado de protección con el que cuenta, no es ajeno a la contaminación derivada de actividades humanas. Más allá del gravísimo accidente conocido como el *Desastre de Aznalcollar* acaecido en 1998, y relacionado con actividades mineras próximas al Parque que provocaron una severa contaminación en el área de Doñana por metales pesados y metaloides, altos niveles de contaminación por compuestos organohalogenados fueron puestos de relieve por diferentes autores en los años 70 y 80 del siglo pasado. La discontinuidad de estos estudios, salvo en contadas excepciones, sumada al traslado del foco de atención a finales de los años 90 a la contaminación por metales pesados, se ha traducido en una clara falta de información hoy en día en relación al tipo y grado de contaminación por diferentes tipos de compuestos organohalogenados en este área de especial interés y protección por albergar una gran biodiversidad de especies, muchas de ellas amenazadas.

En base a todas estas consideraciones establecidas se han planteado los objetivos que a continuación se describen para la presente tesis doctoral.



## OBJETIVOS

---

La presente tesis doctoral plantea como objetivo principal profundizar y actualizar el grado de conocimiento sobre la contaminación por determinados compuestos organohalogenados, muchos de ellos COP, en el área de Doñana, seleccionando para ello matrices representativas del medio físico y biológico. Algunos de estos compuestos, actualmente regulados dentro del Convenio de Estocolmo, responden en principio a un uso antiguo o histórico tales como los bifenilos policlorados (PCBs), el dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) y sus principales metabolitos (DDTs), o las policlorodibenzo-*p*-dioxinas (PCDDs) y policlorobenzofuranos (PCDFs). Otros, en cambio, son actualmente considerados como emergentes correspondiendo con su uso más reciente, tales como los polibromodifenil éteres (PBDEs) y el declorano plus (DP) y sus posibles productos de degradación.

Para abordar como primer objetivo el estudio de la presencia de DDT, en concreto en el medio físico o abiótico, se investigó la posible contaminación por este pesticida en suelos de cultivos de localidades pertenecientes y circundantes al END en los años 2007 y 2008. Esta investigación se justificó en base al marcado carácter agrícola de las actividades desarrolladas en este área, y a los antecedentes de niveles de concentración elevados de dicho pesticida, prohibido desde 1977 en España pero encontrado en Doñana y su entorno hasta épocas muy recientes. Todas las formas isómeras del DDT y de sus principales metabolitos ambientales así como la abundancia de cada forma enantiomérica del *o,p*<sup>2</sup>-DDT fueron analizadas y cuantificadas en los suelos con objeto de intentar evaluar un uso en el tiempo relativamente cercano o pasado del mismo. Para poder abordar este último aspecto, se planteó el desarrollo y optimización de un método de cromatografía de gases multidimensional en su modalidad *heart-cutting*.

Un segundo objetivo específico fue el empleo de la cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) como organismo bioindicador para evaluar los niveles y tendencias de la contaminación por todos los compuestos organohalogenados seleccionados para esta tesis doctoral en el END. Para ello, mediante una aproximación no destructiva y

mínimamente invasiva, se analizaron estos xenobióticos en colecciones de huevos infértiles de colonias de cigüeña blanca del END obtenidas durante los años 1999, 2001 y 2010, comparando la evolución de los valores de concentraciones en este intervalo de años. Con objeto de hacer un estudio comparativo respecto a zonas potencialmente más contaminadas por una influencia urbana y/o industrial, esta evolución del nivel general de contaminación se comparó con la experimentada por esta misma especie residente en un área, a priori, sometida a mayores fuentes de emisión de CO como es la región de Madrid. Para ello, colecciones de huevos infértiles de estas aves residentes en dicha región fueron obtenidas en los años 2005 y 2011 y analizadas para los mismos contaminantes organohalogenados.

*Capítulo 2*  
*Introducción General*



## 2.1. CONTAMINANTES ORGANOHALOGENADOS, COP y CONVENIO DE ESTOCOLMO

---

Todos los contaminantes ambientales estudiados en la presente tesis doctoral son compuestos organohalogenados, es decir, sustancias químicas orgánicas que en sus estructuras moleculares poseen uno o varios átomos de un elemento halógeno (generalmente Cl o Br). Adicionalmente, la mayor parte de ellos y en concreto los bifenilos policlorados (PCBs), el dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), las policlorodibenzo-*p*-dioxinas (PCDDs), los policlorobenzofuranos (PCDFs) y algunos polibromodifenil éteres (PBDEs) pertenecen al grupo conocido como Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP). Una vez liberados en el medio ambiente y debido a sus propiedades fisicoquímicas, los COP muestran las siguientes características comunes:

### Toxicidad alta

La cual, en el caso de algunos COP, se presenta incluso a muy bajas concentraciones. Los mecanismos tóxicos de actuación pueden ser distintos para cada familia de contaminante, e incluso pueden ser congénere-dependientes. Algunos efectos específicos derivados de su toxicidad son: alergias, daños en los sistemas nervioso central y periférico, alteraciones en los sistemas reproductivo y endocrino, y afecciones carcinogénicas y del desarrollo fetal.

### Persistencia elevada

Debida en gran medida a la fortaleza del enlace carbono-halógeno y a su resistencia a las degradaciones química, biológica y fotoquímica, lo cual implica vidas medias de degradación para algunos de ellos de incluso décadas, en función de la matriz que los contenga.

Semivolatilidad

La cual favorece procesos de volatilización que les confiere capacidad para desplazarse, principalmente a través del aire y del agua, y depositarse a grandes distancias. Aunque dicho desplazamiento también se produce a través de los seres vivos que pueden actuar como biovectores.

Bioacumulación  
y  
biomagnificación

Debidas a su carácter lipofílico y por ende a su tendencia a almacenarse en los tejidos grasos de los seres vivos. Suelen presentar coeficientes de reparto octanol-agua ( $\log K_{ow}$ ) superiores a 5 y con factores de bioacumulación (BAF) o de bioconcentración (BCF) superiores a 5.000 (Muir y Howard 2006).

Durante las últimas décadas se han invertido importantes esfuerzos económicos y científicos en el estudio de los COP, lo que se ha traducido en un valioso avance en el conocimiento de sus propiedades, toxicidad y comportamiento en el medio ambiente (Jones y de Voogt 1999; Scheringer 2004). Así, se sabe que son contaminantes distribuidos globalmente pudiendo ser encontrados incluso en zonas remotas alejadas de aquellas en las que usan o producen, como pueden ser el Ártico (Halsall 2004), la Antártida (Geisz, Dickhut et al. 2008) o zonas montañosas (Schmid, Bogdal et al. 2010). Este hecho, junto con su capacidad de bioacumulación y biomagnificación en las cadenas tróficas hace que los individuos que ocupan niveles superiores de las mismas presenten concentraciones de hasta varios miles de veces más elevadas que aquellos individuos que ocupan niveles base. En consecuencia, determinados tipos de peces, aves predatoras, y mamíferos, incluyendo a los seres humanos, se hacen cada vez más vulnerables hacia los efectos tóxicos de los COP. Además, frecuentemente estos contaminantes se transfieren de unas generaciones a otras, de forma que el hombre y otros mamíferos están expuestos a altos niveles de COP durante momentos claves de su formación y desarrollo, como es el caso de la gestación y estadios iniciales del crecimiento.

Ante el claro peligro que su presencia en el medio puede ocasionar, el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (United Nations Environment Programme, UNEP), a nivel internacional, adoptó el 22 de mayo del año 2001 el **Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes** cuyo objetivo es el de proteger la salud del ser humano y del medio ambiente frente a los COP, prohibiendo o regulando su uso y promoviendo la eliminación o reducción de su generación inintencionada (Convenio de Estocolmo 2001). Tres años después, el 17 de mayo del 2004, el Convenio entró en vigor siendo ratificado por España once días más tarde. A día de hoy más de 172 países (Partes) lo han ratificado con notables excepciones como las de E.E.U.U o Italia.

Inicialmente el Convenio nació regulando una docena de COP, conocidos como la *docena sucia*. En la Conferencia de la Partes celebrada en Ginebra en 2009, nueve nuevos compuestos fueron añadidos a la lista de estos contaminantes bajo el ámbito del Convenio. Finalmente, en la quinta Conferencia de las Partes, celebrada en el 2011, el pesticida endosulfán también fue incluido. Así pues, actualmente un total de veintidós COP se encuentran regulados por el Convenio de Estocolmo (Tabla 2.1). Sin embargo, ésta es una lista abierta a nuevas incorporaciones ya que cualquiera de las Partes puede proponer al Convenio la evaluación de una sustancia química dada que se sospeche que pueda comportarse como COP.

**Tabla 2.1.** Relación de los COP incluidos en el Convenio de Estocolmo a partir del año 2001.

	Incluidos en 2001	Incluidos en 2009	Incluido en 2011
Pesticidas	aldrín	clordecona	endosulfán
	clordano	$\alpha$ -hexaclorociclohexano	
	dicloro-difenil-tricloroetano (DDT)	$\beta$ -hexaclorociclohexano	
	dieldrin	lindano	
	endrin	pentaclorobenceno	
	heptacloro		
	mirex		
	toxafeno		
Productos químicos industriales	hexaclorobenceno	hexabromobifenilo	
	bifenilos policlorados (PCBs)	tetra-, penta-, hexa-, hepta-bromodifenil éteres (PBDEs)	
		ácido perfluorooctano sulfónico y sus sales, fluoruro de perfluorooctano sulfonilo	
Productos secundarios no intencionados	policlorodibenzo-p-dioxinas (PCDDs)		
	policlorodibenzofuranos (PCDFs)		

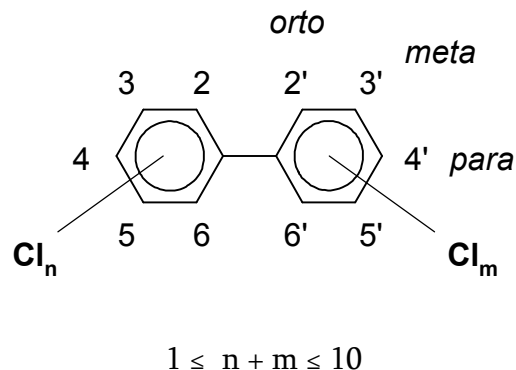


### 2.1.1. PCBs

---

Los bifenilos policlorados (PCBs) empezaron a producirse comercialmente a partir de 1929 por cloración catalítica del bifenilo, alcanzando sus máximos picos de producción a finales de los años sesenta y principios de los setenta (Breivik, Sweetman et al. 2002). Se sintetizaron como mezclas complejas de isómeros con distintos grados de cloración, recibiendo diferentes nombres comerciales tales como *Aroclor* en E.E.U.U., *Fenclor* en Italia, *Pyralene* en Francia, *Kaneclor* en Japón o *Pyralene/Fenoclor* en España (De Voogt y Brinkman 1989). Sus amplias aplicaciones industriales en sistemas cerrados y abiertos se deben a su elevada estabilidad físico-química, su carácter de aislantes térmicos, el alto valor de su constante dieléctrica y su baja presión de vapor (Erickson y Kaley 2011). Es por ello, que se han empleado como fluidos de intercambio térmico, en condensadores y transformadores eléctricos, como lubricantes, como aditivos en adhesivos, pinturas, selladores, plásticos, etc. En 1966, el químico Dr. Sören Jensen los detectó por vez primera en un ejemplar de águila y en diferentes especies de peces de su Suecia natal (Jensen 1966). A principios de la década de los setenta, teniendo ya conocimiento de su distribución y persistencia en el medioambiente y de los fenómenos de bioacumulación y biomagnificación debidos a su naturaleza lipofílica, se empieza a regular su producción y exportación, llegándose a cesar su síntesis de forma efectiva a mediados de los años ochenta en la mayor parte de los países. Hoy en día la producción y uso de PCBs está prohibida por el Convenio de Estocolmo, el cual concede como plazo hasta el 2025 a los países para que adopten las medidas necesarias encaminadas a la eliminación gradual de todos los equipos y materiales que los contengan. El Convenio también establece como límite el año 2028 para la recuperación y eliminación de todos los residuos de PCBs (UNEP 2005).

Estructuralmente, los PCBs son una familia de compuestos aromáticos halogenados constituidos por dos anillos bencénicos, con un número variable de cloro-sustituciones, que se encuentran unidos por un enlace sencillo C-C, tal y como se representa en la Figura 2.1.



**Figura 2.1.** Estructura química general de los PCBs.

En función del número y posición de las cloro-sustituciones existen 209 moléculas distintas que reciben el nombre de congéneres y que se agrupan en los llamados grupos homólogos. Dichos grupos están constituidos por isómeros de la misma masa molecular pero con sus átomos de cloro ocupando posiciones diferentes. Existen dos nomenclaturas admitidas por la IUPAC para estas especies, siendo normalmente más utilizada la propuesta por Ballschmiter y Zell, en la cual a cada congénere se le asigna una numeración desde el 1 al 209 (PCB-1, PCB-2,...) considerando el número y posición de sus cloro-sustituciones (Ballschmiter y Zell 1980). Los diferentes grupos homólogos y sus características se muestran en la Tabla 2.2.

En relación a sus propiedades físico-químicas, es importante recalcar la gran estabilidad que presentan estos compuestos, muy resistentes a los ataques de ácidos y bases y muy estables también desde un punto de vista térmico, lo cual les hace especialmente útiles en un amplio abanico de aplicaciones industriales como se ha indicado anteriormente. A temperatura ambiente todos los PCBs son sólidos. Su volatilidad es relativamente baja y disminuye a medida que aumenta el grado de cloración. Igualmente, su solubilidad en agua es muy limitada y decrece al aumentar el número de cloro-sustituciones. Por el contrario y debido a su lipofilia, estas especies son solubles en disolventes orgánicos y en matrices lipídicas. En la Tabla 2.3 se muestran a modo de ejemplo varias de las constantes físico-químicas de algunos PCBs relevantes por su toxicidad y/o prevalencia en el medio ambiente.

**Tabla 2.2.** Resumen de los grupos homólogos de PCBs y sus características.

Grupo de Homólogos	Fórmula Empírica	Número de Isómeros	Nomenclatura IUPAC: PCB #	Masa Molecular (uma)
Monoclorados	C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> Cl	3	PCB-1 – PCB-3	188,0
Diclorados	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub>	12	PCB-4 – PCB-15	222,0
Triclorados	C <sub>12</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>3</sub>	24	PCB-16 – PCB-39	256,0
Tetraclorados	C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>4</sub>	42	PCB-40 – PCB-81	291,9
Pentaclorados	C <sub>12</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>5</sub>	46	PCB-82 – PCB-127	325,9
Hexaclorados	C <sub>12</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>6</sub>	42	PCB-128 – PCB-169	359,8
Heptaclorados	C <sub>12</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>7</sub>	24	PCB-170 – PCB-193	393,8
Octaclorados	C <sub>12</sub> H <sub>2</sub> Cl <sub>8</sub>	12	PCB-194 – PCB-205	429,8
Nonaclorados	C <sub>12</sub> H <sub>1</sub> Cl <sub>9</sub>	3	PCB-206 – PCB-208	463,7
Decaclorado	C <sub>12</sub> Cl <sub>10</sub>	1	PCB 209	497,7

**Tabla 2.3.** Valores de propiedades físico-químicas de algunos PCBs (Li, Wania et al. 2003; WHO 2003).

	PCB-77	PCB-105	PCB-153	PCB-180
CAS No.	32598-13-3	32598-14-4	35065-27-1	35065-29-3
Masa molecular (g/mol)	292,0	326,4	360,9	395,3
Fórmula molecular	C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>4</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>5</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>6</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>7</sub>
Solubilidad en agua a 25 °C (mg/L)	0,175	0,0034	0,00091	0,00031
Log <i>K<sub>ow</sub></i>	6,04–6,63	6,98	6,72–8,35	6,70–7,21
Presión de vapor a 25°C (mmHg)	4,4 × 10 <sup>-7</sup>	6,53 × 10 <sup>-6</sup>	3,80 × 10 <sup>-7</sup>	9,77 × 10 <sup>-7</sup>
Constante de Henry a 25°C (atm·m <sup>3</sup> /mol)	0,94 × 10 <sup>-4</sup>	3,31 × 10 <sup>-4</sup>	1,23 × 10 <sup>-4</sup>	3,65 × 10 <sup>-4</sup>

Desde el punto de vista de la toxicidad de los bifenilos policlorados, existe evidencia científica de su acción perniciosa sobre los sistemas nervioso, endocrino e inmune, daños en hígado, estómago y glándulas tiroideas, y desórdenes tales como

cloroacné, enrojecimiento y sequedad de la piel, entre otros (Seegal 1996; ATSDR 2000; WHO 2003; Lauby-Secretan, Loomis et al. 2013). La exposición habitual de los seres vivos suele producirse a un “coctel” de diferentes PCBs al mismo tiempo; sin embargo, es interesante resaltar que existen importantes diferencias de toxicidad entre congéneres. Así, aquellos congéneres capaces de adoptar una conformación espacial plana estable como es el caso de los no-*orto* sustituidos (PCB-77, -81, -126 y -169) y los mono-*orto* (PCB-105, -114, -118, -123, -156, -157, -167 y -189), son los más tóxicos. Recientemente y en base a los estudios científicos existentes hasta la fecha, los congéneres no-*orto* y mono-*orto* han sido incluidos en el Grupo 1 de agentes carcinogénicos según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) (Lauby-Secretan, Loomis et al. 2013). Debido a su conformación coplanar, dichos congéneres son estructuralmente análogos a algunas policlorodibenzo-*p*-dioxinas (PCDDs) y policlorodibenzofuranos (PCDFs), y por ello capaces de interactuar con el receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR) (Safe 1994). La interacción con dicho receptor disminuye notablemente con la pérdida de planaridad experimentada por el resto de los congéneres con más *orto* cloro-sustituciones.

Por otro lado, aunque la toxicidad de los PCB no-coplanares es menor que la de los congéneres coplanares, los primeros suelen encontrarse en mayores concentraciones en el medio ambiente, por lo que su actividad tóxica, la cual parece estar relacionada fundamentalmente con su impacto en el sistema nervioso, su capacidad de inducción de la respuesta inflamatoria y con su comportamiento como disruptores endocrinos, no puede ser ignorada (Seegal 1996; ATSDR 2000; Lauby-Secretan, Loomis et al. 2013).

Finalmente, es necesario mencionar que de los 209 posibles congéneres únicamente alrededor de 140 fueron sintetizados en las mezclas comerciales y por ello son los que frecuentemente se detectan en el medio ambiente (Frame, Cochran et al. 1996). De entre estos, se suelen analizar los de mayor relevancia desde un punto de vista toxicológico (congéneres coplanares) y/o los que se presentan en mayor abundancia. La Unión Europea sugiere la utilización de una lista de siete PCB, (-28, -52, -101, -118, -138, -153 y -180), denominados *indicadores*, para el estudio y monitorización de los niveles de estas contaminantes (Frame 1997).

### 2.1.2. DDT

---

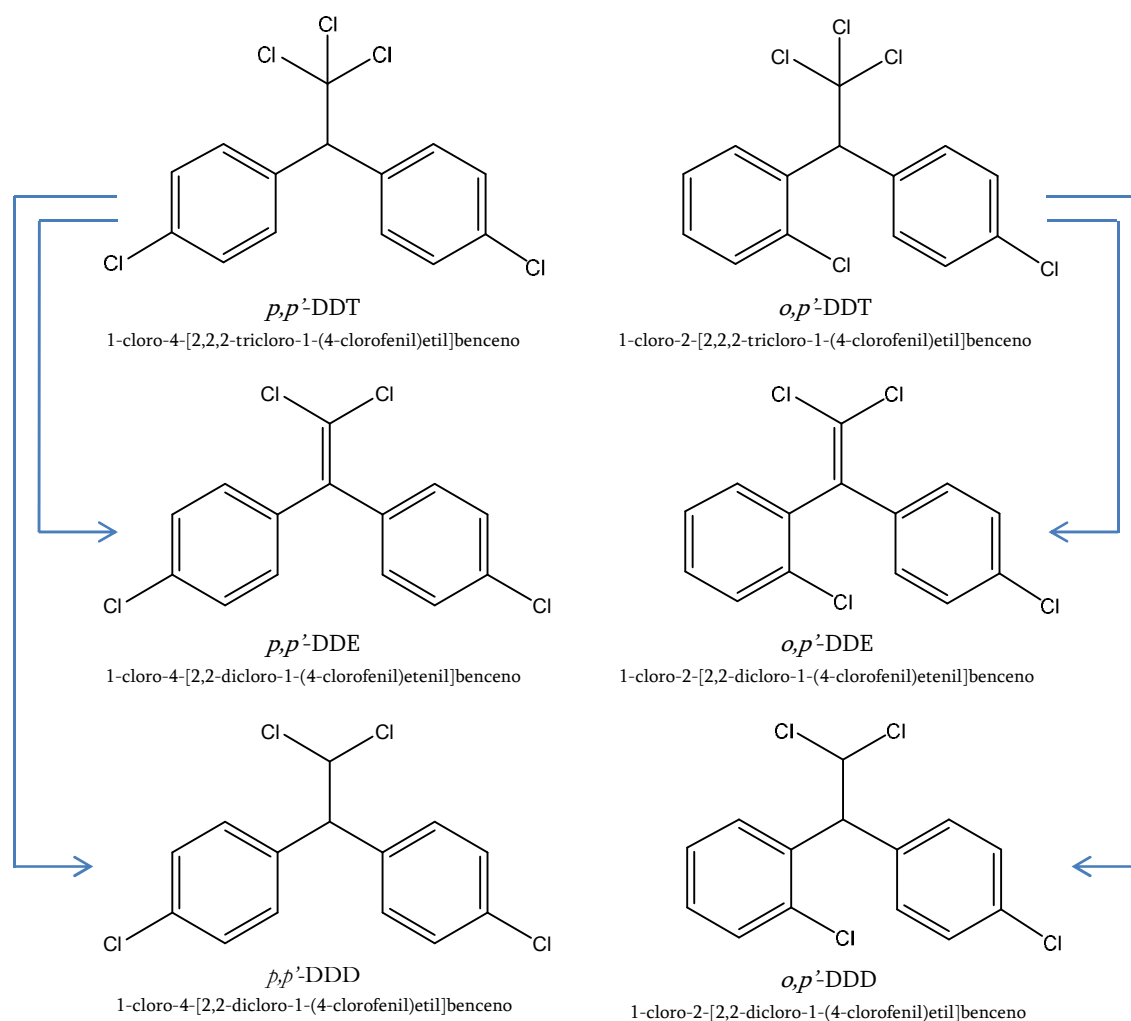
El dicloro-difenil-tricloroetano, comúnmente conocido como DDT, se sintetizó por vez primera en 1874, aunque no se descubrieron sus efectivas propiedades como insecticida hasta 1939, un importante hallazgo que llevó al químico suizo Paul Hermann Müller a obtener el Premio Nobel en 1948. Estas propiedades hicieron que el DDT fuese utilizado durante la Segunda Guerra Mundial para proteger a las tropas aliadas de los mosquitos responsables del contagio de enfermedades como el tifus y la malaria. A partir de 1945 fue accesible de forma comercial y su uso se extendió rápida y globalmente, llegando a ser el insecticida más empleado en todo el mundo hasta los años 70 del siglo pasado, debido fundamentalmente a la combinación de su gran efectividad y su bajo coste en relación a cualquier otro insecticida conocido incluso hoy en día. El empleo del DDT durante varias décadas permitió aumentar la productividad de las actividades agrícolas a la par que contribuyó de forma decisiva a la erradicación de la malaria en Estados Unidos y Europa.

Sin embargo, las bondades del DDT empezaron a quedar en entredicho cuando diferentes investigaciones demostraron que su uso masivo e indiscriminado, unido a su elevada estabilidad en el medioambiente y a su naturaleza lipófila se relacionaban directamente con una distribución global del mismo en todo el planeta y con su bioacumulación a lo largo de las cadenas tróficas incluyendo a los seres humanos (Beard 2006). Así, estudios realizados en los años 50 concluyeron que la exposición al DDT se podía asociar a problemas reproductivos en diferentes especies. Uno de los ejemplos más claros sobre los efectos nocivos del DDT que se han descrito en la literatura científica es el efecto negativo, incluso a nivel poblacional, debido al adelgazamiento de la cáscara de los huevos de halcones peregrinos y otras aves (Peakall, Cade et al. 1975; Risebrough 1986).

Como resultado de las numerosas investigaciones llevadas a cabo y la alarma social que estas levantaron, el empleo del DDT fue seriamente restringido o totalmente prohibido en la mayoría de los países desarrollados a partir del año 1970. En España no fue hasta el año 1977 cuando entró en vigor la ley que prohibió su uso (BOE 24 de Diciembre de 1975). Los estudios aportados por la ciencia sobre cómo la exposición a este compuesto organoclorado podría asociarse a efectos teratogénicos, disrupción del

sistema endocrino, efectos a largo plazo relacionados con el sistema nervioso y disfunciones hepáticas, o incluso a una posible acción carcinogénica en humanos (Turusov, Rakitsky et al. 2002), dieron lugar a la prohibición a nivel mundial, que se extiende hasta nuestros días, con la inclusión del DDT en la *docena sucia* establecida por el Convenio de Estocolmo. Como excepción, está contemplado el uso del DDT para combatir la malaria en determinados países tal y como recomienda la propia Organización Mundial de la Salud (WHO) (WHO 2011). Sin embargo, además de su uso excepcional en la lucha contra la malaria, fuentes de DDT en el medio ambiente siguen siendo actualmente el uso en China en pinturas *anti-incrustantes* en embarcaciones (para prevenir la acumulación de organismos) con contenidos de hasta el 5% en peso de este pesticida (Lin, Hu et al. 2009), y de manera más extendida, el acaricida dicofol, de intensa utilización en Europa, Asia y Norteamérica. El dicofol se sintetiza a partir del DDT y por tanto puede contener residuos del mismo que no deben sobrepasar una proporción del 0,1% en peso para que su uso esté autorizado (Qiu, Zhu et al. 2005). En la Unión Europea el empleo del dicofol se prohibió desde mayo del 2009 (Weem 2010) mientras que en E.E.U.U su prohibición total imperará a finales del 2016 (USEPA 2011).

Desde un punto de vista estructural, el DDT es un etano sustituido con tres átomos de cloro en uno de los carbonos y dos grupos arilo en el otro. La sustitución, a su vez, de una de las posiciones de cada anillo bencénico por un átomo de cloro conduce a diferentes isómeros:  $p,p'$ -DDT,  $o,p'$ -DDT y  $o,o'$ -DDT. Es por ello que el DDT técnico o comercial se sintetiza como una mezcla de  $p,p'$ -DDT ( $\approx 85\%$ ),  $o,p'$ -DDT ( $\approx 15\%$ ) y  $o,o'$ -DDT a nivel de trazas, siendo el isómero mayoritario  $p,p'$ -DDT el único responsable de su actividad insecticida (Buser y Mueller 1995). A partir de procesos de degradación surgen los dos principales metabolitos del DDT encontrados en muestras bióticas y abióticas, a saber, el DDE (*dicloro-difenil-dicloroetano*), principal producto de degradación aeróbica y el DDD (*dicloro-difenil-dicloroetano*), principal producto de degradación anaeróbica (Ricking y Schwarzbauer 2012). La estructura de los isómeros más abundantes del DDT ( $p,p'$  y  $o,p'$ ) y de sus principales productos de degradación medioambientales, el DDE y el DDD, se encuentran representadas en la Figura 2.2.



**Figura 2.2.** Estructuras y nombres IUPAC de los isómeros *p,p'* y *o,p'* del DDT, DDE y DDD.

Tanto el DDT como el DDE y el DDD (DDTs para referirse al conjunto de los tres) presentan propiedades físico-químicas (Tabla 2.4) y toxicológicas muy semejantes, siendo todos ellos muy persistentes en el medio ambiente. Al igual que el resto de los COP, todos ellos tienen una elevada hidrofobicidad, un nivel muy bajo de degradabilidad y una gran afinidad por los lípidos, lo que explica su tendencia a acumularse en los organismos vivos. El DDE, sin embargo, es el más persistente a la vez que el más tóxico, seguido del DDT, siendo el DDD el menos persistente y tóxico de los tres. Los tres son sólidos blancos a temperatura ambiente, amorfos el DDT y DDD, y

cristalino el DDE (ATSDR 2002). Dado que el *p,p'*-DDT es siempre el isómero mayoritario, las formas *p,p'* de sus productos de degradación son frecuentemente más abundantes que las *o,p'* en el medio ambiente y seres vivos.

**Tabla 2.4.** Resumen de propiedades físico-químicas del *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDE y *p,p'*-DDD (ATSDR 2002).

	<i>p,p'</i> -DDT	<i>p,p'</i> -DDE	<i>p,p'</i> -DDD
CAS No.	50-29-3	72-55-9	72-54-8
Masa molecular (g/mol)	354,5	318,0	320,0
Formula molecular	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>5</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>4</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>4</sub>
Solubilidad en agua a 25 °C (mg/L)	0,025	0,12	0,090
Log <i>K<sub>ow</sub></i>	6,91	6,51	6,02
Presión de vapor a 20°C (Pa)	2,13 × 10 <sup>-5</sup>	8,00 × 10 <sup>-4</sup>	1,80 × 10 <sup>-4</sup>
Constante de Henry (atm·m <sup>3</sup> /mol a 25 °C)	8,3 × 10 <sup>-6</sup>	2,1 × 10 <sup>-5</sup>	4,0 × 10 <sup>-6</sup>

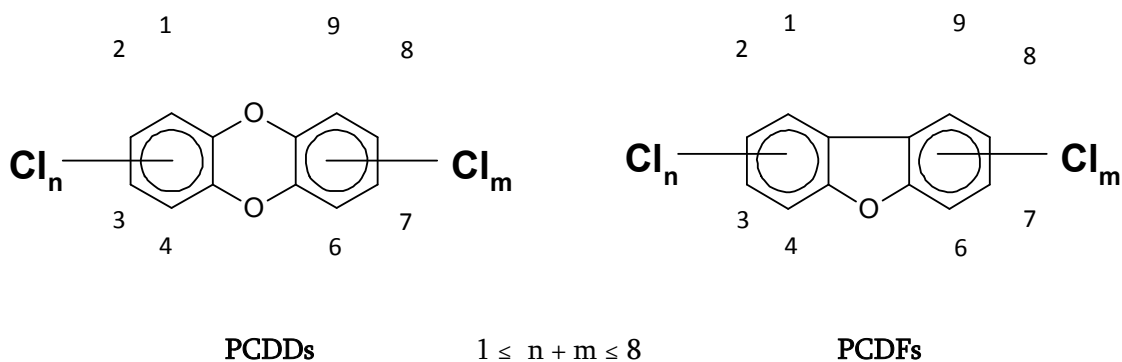
Desde el punto de vista de su toxicidad, existen estudios que asocian al DDT y metabolitos –particularmente el DDE– con incidencias de determinados tipos de cáncer, y especialmente con el cáncer de mama (Turusov, Rakitsky et al. 2002). Actualmente este insecticida está catalogado por la IARC como posible carcinógeno humano (grupo 2B) (IARC-WHO 1997). También se ha asociado a los DDTs con efectos de disrupción del sistema endocrino, supresión del sistema inmune y desórdenes reproductivos entre otros (Beard 2006). Por otro lado, la toxicidad aguda en vertebrados es muy pequeña y suele asociarse a afecciones del sistema nervioso (ATSDR 2002). En el caso concreto de las aves está documentado, tal y como se comentó con anterioridad, cómo la presencia de DDTs puede afectar a su éxito reproductor ya que, entre otros efectos, tanto el DDT como el DDE provocan un adelgazamiento de la cáscara del huevo (Peakall 1993; Holm, Blomqvist et al. 2006).



### 2.1.3. PCDDs y PCDFs

Las policlorodibenzo-*p*-dioxinas (PCDDs) y los policlorodibenzofuranos (PCDFs) son dos familias de contaminantes orgánicos íntimamente relacionados a los que muchas veces se les denota con el nombre genérico y común de *dioxinas* y *furanos* (PCDD/Fs). Al igual que los PCBs y los DDTs, las PCDD/Fs son integrantes de la *docena sucia* inicialmente estipulada y regulada por el Convenio de Estocolmo. Sin embargo, y a diferencia de los considerados anteriormente, a estos compuestos no se les conoce ninguna aplicación práctica, ya que nunca han sido sintetizados a nivel industrial pese a que su origen está marcado por una fuerte influencia antropogénica (Kulkarni, Crespo et al. 2008). Así, pese a que su formación a través de procesos naturales es posible, en su gran mayoría son producidos de manera inintencionada e indeseable en una gran cantidad de procesos industriales (blanqueo con cloro de la pasta de papel, obtención de cloro con electrodos de grafito, uso de determinados colorantes en la industria textil, etc), y también como subproductos en procesos de combustión e incineración (Tabla 2.5). De este modo, el siglo XX ha sido testigo de un aumento de los niveles de PCDD/Fs en el medio ambiente y en los seres vivos como consecuencia directa de la proliferación de las actividades industriales, y es en el siglo XXI en el que a través de acuerdos internacionales como el Convenio de Estocolmo se intenta limitar al máximo la emisión de estos contaminantes al medio.

La estructura básica de estos contaminantes está constituida por dos anillos bencénicos unidos entre sí por uno o dos átomos de oxígeno, dando lugar a configuraciones con un alto grado de planaridad, tal y como se muestra en la Figura 2.3.



**Figura 2.3.** Estructuras químicas generales de los PCDD/Fs.

**Tabla 2.5.** Resumen de posibles fuentes de producción de PCDD/Fs. Adaptada de (Casanovas 1996).

ORIGEN NATURAL	
❖	Incendios forestales
❖	Erupciones volcánicas
❖	Reacciones enzimáticas
❖	Reacciones fotolíticas
ORIGEN ANTROPOGÉNICO	
❖	<b>Procesos de Combustión</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ A gran escala:               <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Incineradoras de residuos sólidos urbanos</li> <li>✓ Incineradoras de residuos industriales</li> <li>✓ Incineradoras de residuos hospitalarios</li> <li>✓ Centrales térmicas</li> </ul> </li> <li>▪ A pequeña escala:               <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Motores de combustión de los automóviles</li> <li>✓ Sistemas de calefacción domésticos</li> <li>✓ Combustiones de cigarrillos</li> </ul> </li> </ul>
❖	<b>Procesos químicos e industriales</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Fabricación de compuestos organoclorados</li> <li>▪ Producción y reciclaje de metales</li> <li>▪ Blanqueo de pasta de papel con cloro</li> <li>▪ Producción electroquímica de cloro con electrodos de grafito</li> <li>▪ Fabricación de retardantes de llama</li> <li>▪ Industria textil</li> </ul>
❖	<b>Accidentes</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incendios de plásticos o de materiales organoclorados</li> <li>▪ Incendios o explosiones de transformadores que contengan PCBs</li> </ul>
❖	<b>Productos de deshecho</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Lodos de depuradoras y potabilizadoras</li> <li>▪ Lixiviados de vertederos</li> <li>▪ Aguas residuales domésticas</li> </ul>

Existen 75 congéneres de PCDDs distintos y 135 de PCDFs en función del número de cloro-sustituciones y de las diferentes posiciones ocupadas por los átomos de cloro. De igual manera que con los PCBs, para las dioxinas y furanos también se distinguen grupos homólogos (Tabla 2.6) constituidos por los diferentes isómeros que contienen el mismo número de cloros.

Tabla 2.6. Resumen de los grupos homólogos de PCDDs y PCDFs y sus características.

Grupo de Homólogos	Abreviatura	Fórmula Molecular	N° Isómeros (2,3,7,8-)	Masa Molecular (uma)
		<b>PCDDs/PCDFs</b>	<b>PCDDs/PCDFs</b>	<b>PCDDs/PCDFs</b>
<b>Monoclorados</b>	MonoCDD/Fs	C <sub>12</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> Cl <sub>1</sub> / C <sub>12</sub> H <sub>7</sub> OCl <sub>1</sub>	2 (0) / 4 (0)	218,0 / 202,0
<b>Diclorados</b>	DiCDF/Fs	C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> OCl <sub>2</sub>	10 (0) / 16 (0)	252,0 / 236,0
<b>Triclorados</b>	TriCDD/Fs	C <sub>12</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> Cl <sub>3</sub> / C <sub>12</sub> H <sub>5</sub> OCl <sub>3</sub>	14 (0) / 28 (0)	285,9 / 269,9
<b>Tetraclorados</b>	TCDD/Fs	C <sub>12</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub> / C <sub>12</sub> H <sub>4</sub> OCl <sub>4</sub>	22 (1) / 38 (1)	321,9 / 305,9
<b>Pentaclorados</b>	PeCDD/Fs	C <sub>12</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> Cl <sub>5</sub> / C <sub>12</sub> H <sub>3</sub> OCl <sub>5</sub>	14 (1) / 28 (2)	355,8 / 339,9
<b>Hexaclorados</b>	HxCDD/Fs	C <sub>12</sub> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Cl <sub>6</sub> / C <sub>12</sub> H <sub>2</sub> OCl <sub>6</sub>	10 (3) / 16 (4)	389,8 / 373,8
<b>Heptaclorados</b>	HpCDD/Fs	C <sub>12</sub> H <sub>1</sub> O <sub>2</sub> Cl <sub>7</sub> / C <sub>12</sub> H <sub>1</sub> OCl <sub>7</sub>	2 (1) / 4 (2)	423,8 / 407,8
<b>Octaclorado</b>	OCDD/Fs	C <sub>12</sub> O <sub>2</sub> Cl <sub>8</sub> / C <sub>12</sub> OCl <sub>8</sub>	1 (1) / 1(1)	459,7 / 443,7

La gran similitud entre las estructuras de dioxinas y furanos es responsable de que sus propiedades físico-químicas sean análogas. Así, los diferentes congéneres de ambas familias son sólidos cristalinos de color blanco, con elevados puntos de fusión y ebullición. Son muy estables térmicamente y debido a ello su formación en procesos térmicos en donde haya fuentes de cloro está termodinámicamente favorecida, mientras que son difícilmente destruidos en procesos de combustión. Son muy poco solubles en agua y muy solubles en disolventes orgánicos, haciéndose más polares a medida que aumenta el grado de cloración. Su elevada estabilidad química junto a su lipofilia explica la extremada persistencia de estos contaminantes en el medio y su capacidad de bioacumulación y biomagnificación en los seres vivos. A modo de ejemplo, en la Tabla 2.7 se recogen algunas propiedades de la 2,3,7,8-TCDD y la OCDD, las cuales son ambas representativas de estas familias por su toxicidad y persistencia en el medio, respectivamente (ATSDR 1998).

**Tabla 2.7.** Valores de algunas propiedades físico-químicas para la 2,3,7,8-TCDD y OCDD.

	2,3,7,8- tetraclorodibenzo- <i>p</i> - dioxina (TCDD)	Octaclorodibenzo- <i>p</i> -dioxina (OCDD)
<b>CAS No.</b>	1746-01-6	3268-87-9
<b>Masa molecular</b>	321,97	459,75
<b>Formula molecular</b>	C <sub>12</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>12</sub> Cl <sub>8</sub> O <sub>2</sub>
<b>Solubilidad en agua a 25 °C (ng/L)</b>	8,9 ± 1,9	0,074
<b>Log <i>K</i><sub>ow</sub></b>	6,8	8,60
<b>Presión de vapor (mmHg a 25 °C)</b>	1,5 × 10 <sup>-9</sup> – 3,4 × 10 <sup>-5</sup>	8,25 × 10 <sup>-13</sup>
<b>Constante de Henry (atm·m<sup>3</sup> /mol a 25 °C)</b>	16,1-101,7 × 10 <sup>-6</sup>	6,74 × 10 <sup>-6</sup>

Desde un punto de vista toxicológico, desde 1997, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer clasificó a la 2,3,7,8-TCDD como agente carcinogénico del grupo I para el hombre (IARC-WHO 1997). Adicionalmente, se sabe que las exposiciones a dioxinas y furanos pueden desembocar en un elevado número de efectos perniciosos como trastornos hepáticos y circulatorios, pérdida aguda de peso, teratogénesis embrionaria, etc, afectando múltiples sistemas de un organismo como el nervioso, inmune, reproductivo o el endocrino entre otros (ATSDR 1998; Schechter 2012). Se conoce que en gran medida la toxicidad de estos compuestos está relacionada con su afinidad por el receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR), el cual es una proteína intracelular citosólica. La unión con el AhR y su subsiguiente translocación al núcleo celular induce, tras la acción de una proteína intermedia y su posterior interacción con una determinada secuencia del ADN, la síntesis de mayores niveles del citocromo P450 1A1 y consiguientemente el aumento de las actividades catalíticas del mismo (ATSDR 1998; Mandal 2005). Es por esto que la medida de las actividades monoxigenasas dependientes del citocromo P450 1A1, como son la etoxiresorufin-O-deetilasa (EROD) y la aril-hidrocarburo-hidroxilasa (AHH), se utiliza frecuentemente como un biomarcador de exposición a dioxinas y de otros xenobióticos capaces de interactuar con el AhR. Aunque todavía se desconoce el mecanismo exacto por el cual la interacción de estas especies con el receptor Ah desencadena la toxicidad observada, sí que se ha constatado que dicha toxicidad disminuye a medida que lo hace su afinidad

por el receptor celular, necesitándose de mayores concentraciones para provocar la misma respuesta. De entre los 210 congéneres existentes de dioxinas y furanos, los 17 que presentan cloro-sustituciones en las posiciones 2,3,7,8 son los más tóxicos, lo cual parece estar ligado con su mayor planaridad que da lugar a una mayor afinidad por el receptor citosólico Ah. De todos ellos, la 2,3,7,8-TCDD es el congener más tóxico, siendo de hecho una de las especies más tóxicas conocidas por el ser humano (Schechter, Birnbaum et al. 2006).

En función de lo expuesto anteriormente y sabiendo que el mecanismo de toxicidad de otras especies tales como los PCB coplanares es el mismo que el de las PCDDs y PCDFs, se han propuesto los *Factores de Equivalencia Tóxica* (Toxic Equivalency Factor, TEF) con objeto de cuantificar y expresar la capacidad tóxica de cada una de estas especies relativizada a la 2,3,7,8-TCDD, a la que se le asigna arbitrariamente un valor máximo de TEF de 1. De este modo, y asumiendo que las toxicidades individuales siguen un comportamiento aditivo, la carga tóxica total de una muestra puede calcularse a través de sus *Equivalentes Tóxicos Totales* (Toxic Equivalent Quantity, TEQ) según la relación:

$$TEQ = \sum([PCDD]_i \times TEF_i) + \sum([PCDF]_i \times TEF_i) + \sum([PCB]_i \times TEF_i)$$

Los TEF propuestos por la Organización Mundial de la Salud, y más comúnmente mencionados en la literatura, se recogen en la Tabla 2.8. Existen diferentes valores de los mismos para evaluar la diferente toxicidad en base a diferentes grupos de organismos como aves, peces o mamíferos.

**Tabla 2.8.** Valores de TEF propuestos por la WHO para peces y aves (Van den Berg, Birnbaum et al. 1998) y posteriormente para mamíferos (Van den Berg, Birnbaum et al. 2006).

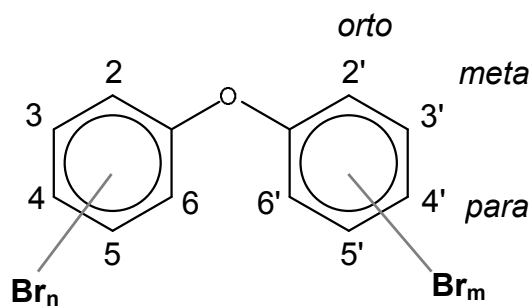
	TEF		
	Peces	Aves	Mamíferos
<b>PCDDs</b>			
2,3,7,8-TCDD	1	1	1
1,2,3,7,8-PeCDD	1	1	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	0,05	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	0,01	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	0,1	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	<0,001	0,01
OCDD	<0,0001	0,0001	0,0003
<b>PCDFs</b>			
2,3,7,8-TCDF	0,05	1	0,1
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	0,1	0,03
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	1	0,3
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	0,1	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	0,1	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	0,1	0,1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	0,1	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	0,01	0,01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01	0,01	0,01
OCDF	<0,0001	0,0001	0,0003
<b>PCBs</b>			
PCB 77	0,0001	0,05	0,0001
PCB 81	0,0005	0,1	0,0003
PCB 105	<0,000005	0,0001	0,00003
PCB 114	<0,000005	0,0001	0,00003
PCB 118	<0,000005	0,00001	0,00003
PCB 123	<0,000005	0,00001	0,00003
PCB 126	0,005	0,1	0,1
PCB 156	<0,000005	0,0001	0,00003
PCB 157	<0,000005	0,0001	0,00003
PCB 167	<0,000005	0,00001	0,00003
PCB 169	0,00005	0,001	0,03
PCB 189	<0,000005	0,00001	0,00003

### 2.1.4. PBDEs

---

Los polibromodifenil éteres (PBDEs) son un grupo de compuestos aromáticos bromados, obtenidos por bromación del difenil éter en presencia de un catalizador tipo ácido de Lewis como el  $\text{AlCl}_3$  y un disolvente como el dibromometano (Alaee, Arias et al. 2003). Empezaron a sintetizarse desde los años 70 del siglo pasado por sus propiedades como retardantes de llama, alcanzando sus máximos niveles de producción en los años 90 (Alcock, Sweetman et al. 2003). Generalmente se han comercializado en tres formulaciones técnicas diferentes: penta-BDE, octa-BDE y deca-BDE, correspondientes a mezclas de isómeros con distintos grados de bromación, y que reciben el nombre del congénere/s mayoritario/s en las mismas. Su presencia en el medio ambiente fue detectada por primera vez en 1979 en suelos y lodos de áreas próximas a una industria fabricante de PBDEs en E.E.U.U. (DeCarlo 1979). Dos años más tarde, se encontraron PBDEs en diferentes especies de peces de agua dulce en Suecia (Andersson y Blomkvist 1981). Desde entonces, la distribución de estos contaminantes ha sido descrita globalmente y en todos los compartimentos ambientales y seres vivos (Rahman, Langford et al. 2001). Además, un incremento exponencial de sus concentraciones fue tempranamente observado en capas de sedimentos del mar Báltico, en contraste con la disminución o mantenimiento de los niveles de organohalogenados clásicos como el DDT o los PCBs (Nylund, Asplund et al. 1992). La preocupación por su presencia ubicua y creciente y por la toxicidad demostrada para varios de sus congéneres, llevó a la prohibición en 2004 de la fabricación y uso de las mezclas técnicas de penta- y octa-BDE en la Unión Europea o a su abandono voluntario en E.E.U.U (Harrad 2010). Más tarde, en 2009, los principales PBDEs de estas formulaciones fueron reconocidos como COP por el Convenio de Estocolmo. En la Unión Europea, el uso de la mezcla técnica de deca-BDE fue prohibido en aparatos eléctricos y electrónicos en 2008, mientras que su empleo en textiles y otras aplicaciones sigue siendo autorizado a día de hoy (BSEF 2012). Los principales fabricantes norteamericanos de esta formulación se han comprometido de manera voluntaria a cesar su producción y uso antes del final del año 2013. No obstante, y pese a algunas prohibiciones imperantes a nivel local como puede ser el caso de Suecia y diversos estados de E.E.U.U, la síntesis y utilización de la deca-BDE sigue llevándose a cabo a gran escala en la mayor parte del planeta (BSEF 2012).

Estructuralmente, los PBDEs guardan una cierta similitud con los PCBs, estando constituidos por dos anillos bencénicos con diferente grado de sustitución por átomos de bromo, unidos por un enlace de tipo éter C-O-C (Figura 2.4). Al igual que en el caso de los PCBs, existen hasta 209 posibles congéneres de PBDEs que pueden clasificarse en 10 grupos homólogos, tal y como se muestra en la Tabla 2.9.



$$1 \leq n + m \leq 10$$

**Figura 2.4.** Estructura química general de los PBDEs.

**Tabla 2.9.** Resumen de los grupos homólogos de PBDEs y de algunas de sus características.

Grupo de Homólogos	Fórmula Empírica	Número de Isómeros	Nomenclatura IUPAC: BDE #	Masa Molecular (uma)
Monobromados	C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> BrO	3	BDE-1 – BDE-3	170,1
Dibromados	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Br <sub>2</sub> O	12	BDE-4 – BDE-15	327,9
Tribromados	C <sub>12</sub> H <sub>7</sub> Br <sub>3</sub> O	24	BDE-16 – BDE-39	405,8
Tetrabromados	C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> Br <sub>4</sub> O	42	BDE-40 – BDE-81	485,7
Pentabromados	C <sub>12</sub> H <sub>5</sub> Br <sub>5</sub> O	46	BDE-82 – BDE-127	563,6
Hexabromados	C <sub>12</sub> H <sub>4</sub> Br <sub>6</sub> O	42	BDE-128 – BDE-169	643,5
Heptabromados	C <sub>12</sub> H <sub>3</sub> Br <sub>7</sub> O	24	BDE-170 – BDE-193	721,4
Octabromados	C <sub>12</sub> H <sub>2</sub> Br <sub>8</sub> O	12	BDE-194 – BDE-205	801,3
Nonabromados	C <sub>12</sub> H <sub>1</sub> Br <sub>9</sub> O	3	BDE-206 – BDE-208	879,3
Decabromado	C <sub>12</sub> Br <sub>10</sub> O	1	BDE-209	959,2



Los PBDEs son compuestos lipofílicos e hidrofóbicos, característica esta última que se acentúa de forma paralela al grado de bromación. Son resistentes a ataques de ácidos y bases, y estables térmicamente. La mayor parte de los congéneres son también estables frente a la luz, siendo por el contrario la fotolítica una importante vía de degradación para el BDE-209 en congéneres de menor grado de bromación (Rahman, Langford et al. 2001). Los PBDEs presentan una volatilidad de baja a moderada, disminuyendo al aumentar su grado de bromación. Una vez liberados en el medio ambiente exhiben una gran persistencia y potencial de bioacumulación (USEPA 2009). Un resumen de diferentes propiedades físico-químicas de algunos congéneres de PBDEs se presenta en la Tabla 2.10.

**Tabla 2.10.** Valores de propiedades físico-químicas de algunos congéneres de PBDEs (Hardy 2002; ATSDR 2004; Yue y Li 2013).

	<b>BDE-47</b>	<b>BDE-99</b>	<b>BDE-153</b>	<b>BDE-183</b>	<b>BDE-209</b>
<b>CAS No.</b>	5436-43-1	60348-60-9	68631-49-2	207122-16-5	1163-19-5
<b>Masa molecular (g/mol)</b>	485,7	563,6	643,5	721,4	959,2
<b>Formula molecular</b>	C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> Br <sub>4</sub> O	C <sub>12</sub> H <sub>5</sub> Br <sub>5</sub> O	C <sub>12</sub> H <sub>4</sub> Br <sub>6</sub> O	C <sub>12</sub> H <sub>3</sub> Br <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>12</sub> Br <sub>10</sub> O
<b>Solubilidad en agua a 25 °C (mg/L)</b>	0,015	0,04	0,001	0,002	<0,00001
<b>Log <i>K<sub>ow</sub></i></b>	6,81	7,32	7,90	8,27	9,97
<b>Presión de vapor a 25°C (mmHg)</b>	1,40 × 10 <sup>-6</sup>	1,32 × 10 <sup>-7</sup>	1,57 × 10 <sup>-8</sup>	3,51 × 10 <sup>-9</sup>	4,24 × 10 <sup>-11</sup> (21°C)
<b>Constante de Henry a 25°C (atm·m<sup>3</sup>/ mol)</b>	1,48 × 10 <sup>-5</sup>	2,27 × 10 <sup>-6</sup>	6,61 × 10 <sup>-7</sup>	7,30 × 10 <sup>-8</sup>	1,93 × 10 <sup>-8</sup>

Su comportamiento como retardantes de llama se deriva fundamentalmente de las características del enlace C-Br. El bromo exhibe una alta capacidad de atrapamiento de radicales libres generados en cualquier combustión, los cuales son esenciales en el proceso de propagación de una llama. Ésta es una capacidad compartida por todos los halógenos, cuya eficiencia decrece a la vez que lo hace su tamaño (I > Br > Cl > F). Sin embargo, es la combinación de la gran reactividad del bromo hacia los radicales libres sumada a la fortaleza de su enlace con el carbono -que les confiere estabilidad hasta temperaturas próximas a las que se inicia la combustión de diversos materiales-, la que hace de muchos compuestos organobromados y en especial de los PBDEs sustancias

altamente efectivas como retardantes de llama (Alaee, Arias et al. 2003). Es importante mencionar que los PBDEs se agregan como aditivos a las matrices de los materiales, pero no se encuentran químicamente unidos a las mismas. De esta forma, se asume que su liberación al medio ambiente puede efectuarse no sólo en los procesos de reciclaje o destrucción de los materiales que los contienen, sino también a lo largo de la vida útil de estos (Alaee y Wenning 2002).

La bromación del difenil éter se lleva cabo de forma preferencial y muy marcada en las posiciones *orto*- y seguidamente *para*-, debido al efecto director del oxígeno y a factores estéricos. Esto da lugar a que el número de congéneres presentes en las mezclas técnicas sea relativamente limitado, de 20 a 30 (La Guardia, Hale et al. 2006), e inferior, por ejemplo, al caso de los PCBs en sus correspondientes mezclas comerciales. Por otro lado, se ha observado que las composiciones de las mezclas comerciales varían entre fabricantes, cambiando además dentro de un mismo fabricante a lo largo del tiempo e incluso entre lotes (Hites 2006). Una descripción de las composiciones típicas de las tres mezclas comerciales de PBDEs así como de sus usos puede encontrarse en la Tabla 2.11.

Desde el punto de vista de su toxicidad, se han comprobado los efectos perniciosos de diversos congéneres de los PBDEs, los cuales actúan como disruptores endocrinos y agentes neurotóxicos en animales y seres humanos (Birnbaum y Staskal 2004; Shaw 2010). De las tres formulaciones, indicadas en la tabla 2.11, los congéneres de menor grado de bromación, es decir los de la penta-BDE, son los que parecen exhibir una mayor toxicidad, contrastando con la menor de todas observada para la deca-BDE. La penta-BDE ha sido relacionada de manera concreta con neurotoxicidad y alteraciones de las hormonas tiroideas. La octa-BDE, ha sido relacionada con teratogénesis y toxicidad fetal, mientras que la deca-BDE parece afectar negativamente a la morfología del tiroides, del hígado y del riñón (Darnerud 2003; Costa, Giordano et al. 2008; Darnerud 2008). Pese a ser la deca-BDE la mezcla que exhibe la menor toxicidad de todas, en parte debido al gran tamaño molecular del BDE-209 (959 Da) que dificulta su transporte a través de membranas celulares (Costa y Giordano 2011), el potencial pernicioso de la misma no debería ignorarse. Así, y en contraposición a la defendida “inocuidad” y gran estabilidad en el medio ambiente de la deca-BDE, inicialmente argumentadas por la industria fabricante y parte de la comunidad científica, y defendidas hasta tiempos muy recientes, diversas investigaciones han sugerido la posible

degradación medioambiental del BDE-209 en congéneres de menor grado de bromación pero de mayor biodisponibilidad, capacidad de bioacumulación y potencial tóxico, por vía fotolítica (Söderström, Sellström et al. 2004; Christiansson, Eriksson et al. 2009) y acción microbiana (He, Robrock et al. 2006; Tokarz, Ahn et al. 2008). Asimismo, estudios *in vivo* e *in vitro* han revelado la metabolización del BDE-209 en congéneres hexa-, hepta-, octa- y nona- bromosustituídos en peces (Stapleton, Brazil et al. 2006), vacas (Kierkegaard, Asplund et al. 2007) y ratas (Wang, Wang et al. 2010).

**Tabla 2.11.** Resumen de la composición, nombres comerciales, usos mayoritarios y demanda de las principales mezclas técnicas de PBDEs (ATSDR 2004; Law, Allchin et al. 2006; USEPA 2009).

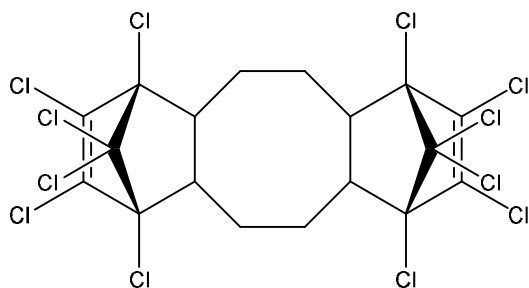
Mezcla	Congéneres predominantes	Nombres Comerciales	Usos principales	Demanda Global en 2001
<b>penta-BDE</b>	BDE-47 <b>BDE-99</b> (≈40-50%) BDE-100 BDE-153 BDE-154	DE 71 FR 1205/1215 Bromkal 70 Tardex 50 Saytex 115	En espumas flexibles de poliuretano, empleadas en muebles y colchones.	7.500 toneladas
<b>octa-BDE</b>	BDE-153 BDE-183 BDE-196 <b>BDE-197</b> (≈30%) BDE-207	Bromkal 7908DE DE 79 FR 143 Tardex 80 Saytex 111	En la resina plástica ABS (acrilonitrilo-butadieno-estireno) empleada en carcasas de ordenadores y otros aparatos eléctricos	3.790 toneladas
<b>deca-BDE</b>	<b>BDE-209</b> (>93%) BDE-206 BDE-207	FR-300 BA DE-83-RTM Saytex 102 Berkflam B10E Bromkal 81	En muchas resinas plásticas como: HIPS (poliestireno de alto impacto), ABS, PP (polipropileno), PE (polietileno), etc, empleadas en productos textiles, eléctricos y electrónicos, y materiales de la construcción.	56.100 toneladas

### 2.1.5. DP

---

El decolorano plus (DP) es un compuesto organoclorado que se diseñó y sintetizó como una de las opciones para sustituir al mirex o decolorano. Este último fue ampliamente empleado como insecticida hasta su prohibición, en 1978 en los E.E.U.U., debido a las claras evidencias en relación a su alta persistencia en el medio ambiente y a su toxicidad, inicialmente detectada en invertebrados marinos y más tarde en vertebrados incluyendo a mamíferos (Kaiser 1978). Sin embargo el decolorano o mirex, que actualmente forma parte de la *docena sucia* establecida por el Convenio de Estocolmo, fue también empleado para otros fines entre los que destacaba principalmente el de retardante de llama (WHO 1984; Shen, Jobst et al. 2012). Y es precisamente, como retardante de llama, que el DP ha sido sintetizado desde los años 60 hasta nuestros días, como mínimo por uno de sus actuales productores, la corporación norteamericana conocida hoy por OxyChem. El DP se agrega como aditivo en numerosas matrices poliméricas tales como: ABS, HIPS, polipropileno, polietileno, polyester, nylon, neopreno, resinas epoxy, etc, destinadas fundamentalmente a su uso en conectores de plástico en aparatos eléctricos y electrónicos, en recubrimiento de cableados, en mobiliario y en materiales plásticos de construcción de tejados entre otros (OxyChem 2007; Sverko, Tomy et al. 2011). Como retardante de llama presenta unas excelentes características que le convierten en un sustituto idóneo de los PBDEs, tales como: su elevada estabilidad fotoquímica y térmica (es estable hasta los 285 °C), su mínima generación de humo en situaciones de descomposición térmica y su relativo bajo coste en relación a los compuestos bromados (OxyChem 2007). Aunque se carece de datos exactos en relación a su producción y consumo, su fabricación a nivel mundial en el 2008 se estimaba en un máximo 5.000 toneladas (Ren, Sverko et al. 2008). De manera acorde, el DP ha sido clasificado por la Agencia de protección Ambiental de E.E.U.U. (USEPA) como un compuesto químico de alta producción industrial (USEPA 2009). En cambio, en la Unión Europea el DP está catalogado como un producto de baja producción industrial; aunque la Comisión Europea lo ha identificado como un potencial sustituto en las aplicaciones de la mezcla deca-BDE (Pakalin, Cole et al. 2007), lo que podría traducirse en un gran incremento del empleo de este retardante de llama en el viejo continente.

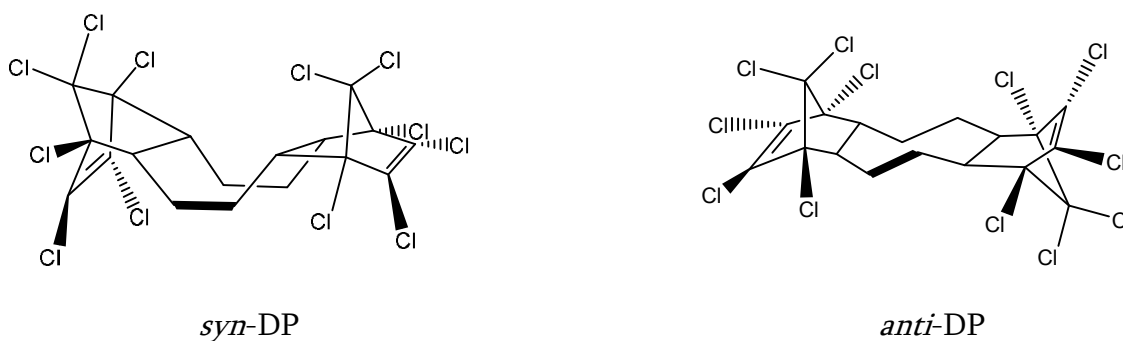
Estructuralmente el DP es un sistema policíclico constituido por un anillo central de ciclooctano flanqueado por dos unidades de norborneno totalmente sustituidas por átomos de cloro, tal y como se muestra en la Figura 2.5.



1,2,3,4,7,8,9,10,13,13,14,14-dodecacloro-1,4,4a,5,6,6a,7,10,10a,11,12,12a-dodecahidro-1,4:7,10-dimetanodibenzo[*a,e*][8]anuleno

**Figura 2.5.** Estructura química general y nombre IUPAC del DP.

El DP se forma a través de una reacción Diels-Alder entre 1 equivalente de 1,5-ciclooctadieno y 2 equivalentes de hexaclorociclopentadieno, en la que sólo la formación de los isómeros *endo*, *endo*-Diels-Alder está favorecida (García, Fronczek et al. 1991) y que rinde una mezcla de los diastereoisómeros *syn* y *anti* representados en la Figura 2.6 en una proporción aproximada de 1:3.



**Figura 2.6.** Estructuras de los diastereoisómeros *syn* y *anti* del DP.

El DP es un sólido blanco cristalino e inodoro, de carácter marcadamente hidrofóbico y lipofílico, con una muy baja presión de vapor y fotoestabilidad en el rango UV-visible (Wang, Huang et al. 2013). Por todo ello se estima que presente una prolongada persistencia en diferentes compartimentos ambientales. A modo ilustrativo se recogen algunos valores de sus propiedades físico-químicas en la Tabla 2.12.

**Tabla 2.12.** Valores de algunas propiedades físico-químicas del DP (USEPA 2011).

<b>declorano plus</b>	
<b>CAS No.</b>	13560-89-9
<b>Masa molecular (g/mol)</b>	653,73
<b>Formula molecular</b>	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>12</sub>
<b>Solubilidad en agua a 25 °C (µg/L)</b>	0,044/249
<b>Log <i>K<sub>ow</sub></i></b>	9,3
<b>Presión de vapor (mmHg a 25 °C)</b>	<1 × 10 <sup>-10</sup>
<b>Constante de Henry (atm·m<sup>3</sup> / mol a 25 °C)</b>	7,5 × 10 <sup>-6</sup>

Aunque, tal y como se ha indicado, la síntesis comercial del DP lleva produciéndose hace más de 40 años, y esporádicamente se ha detectado en materiales poliméricos de aparatos electrónicos (Wang 2000), sorprendentemente su presencia en el medio ambiente pasó inadvertida a la comunidad científica internacional hasta el 2006, año en que por primera vez fue detectado por Hoh y colaboradores en muestras de aire, sedimentos y peces del área de los Grandes Lagos canadienses (Hoh, Zhu et al. 2006). Desde entonces, se ha desarrollado un gran interés por la presencia y comportamiento de este contaminante en el medio que se ha reflejado en el crecimiento exponencial de publicaciones científicas en relación al mismo. Así, se pasó de la citada publicación en el año 2006, a más de 120 trabajos publicados a fecha de redacción del presente trabajo de Tesis Doctoral. Consecuentemente, se ha producido un incremento notable en relación a muchos de los campos de conocimiento que de este xenobiótico se tenían, y que en el 2006 básicamente se circunscribían al ámbito de un informe elaborado por OxyChem y presentado a la EPA de E.E.U.U. (USEPA 2009). Hoy en día se sabe que presenta características propias de COP tales como una elevada persistencia en el medio y capacidad de bioacumulación y de transporte a largas distancias, habiendo

sido encontrado con una distribución global en múltiples y diferentes matrices medioambientales y humanas (Sverko, Tomy et al. 2011; Xian, Siddique et al. 2011; Feo, Barón et al. 2012; Möller, Xie et al. 2012; Salamova y Hites 2013). La capacidad de biomagnificación del DP no es aún muy conocida aunque ha sido comparada, en una red trófica concreta, a la de los congéneres más recalcitrantes de los PCBs y estimada entre dos y tres veces la de ciertos PBDEs (Wu, Zhang et al. 2010). Sin embargo, actualmente y a falta de nuevas investigaciones, existe cierta incertidumbre en relación a dicho potencial de biomagnificación dado que se han descrito diferentes comportamientos, incluso hasta opuestos, para cada estereoisómero del DP en investigaciones llevadas a cabo en diferentes redes tróficas acuáticas (Tomy, Pleskach et al. 2007; Zhang, Luo et al. 2010).

Tanto en muestras abióticas como bióticas se han observado distintos enriquecimientos de uno de los dos estereoisómeros en relación a la proporción que existe entre ambos en las mezclas comerciales. Normalmente esta proporción se expresa como la fracción del isómero mayoritario que es el *anti*, y se define como  $f_{anti}$  calculándose en función de la siguiente expresión:

$$f_{anti} = \frac{[anti - DP]}{[anti - DP] + [syn - DP]}$$

Según el trabajo de revisión de Wang y colaboradores, la  $f_{anti}$  en mezclas comerciales presenta un valor medio de 0,69 con un intervalo comprendido entre 0,59 y 0,80 (Wang, Yang et al. 2010).

A priori, el enriquecimiento de uno de los dos estereoisómeros del DP en el medio ambiente es esperable, puesto que al ser el *syn* y el *anti* diastereoisómeros pueden presentar diferencias en sus propiedades físico-químicas. Concretamente, se sabe que presentan diferencias entre sus solubilidades en agua y su degradación bajo luz UV (Sverko, Tomy et al. 2007; USEPA 2009). Asimismo, se ha descrito una acumulación mayoritaria del isómero *anti* en tejido cerebral en contraposición a la acumulación preferencial del isómero *syn* en el hígado de dos especies de peces (Zhang, Wu et al. 2011), poniendo de manifiesto la importancia de la estructura molecular de ambos

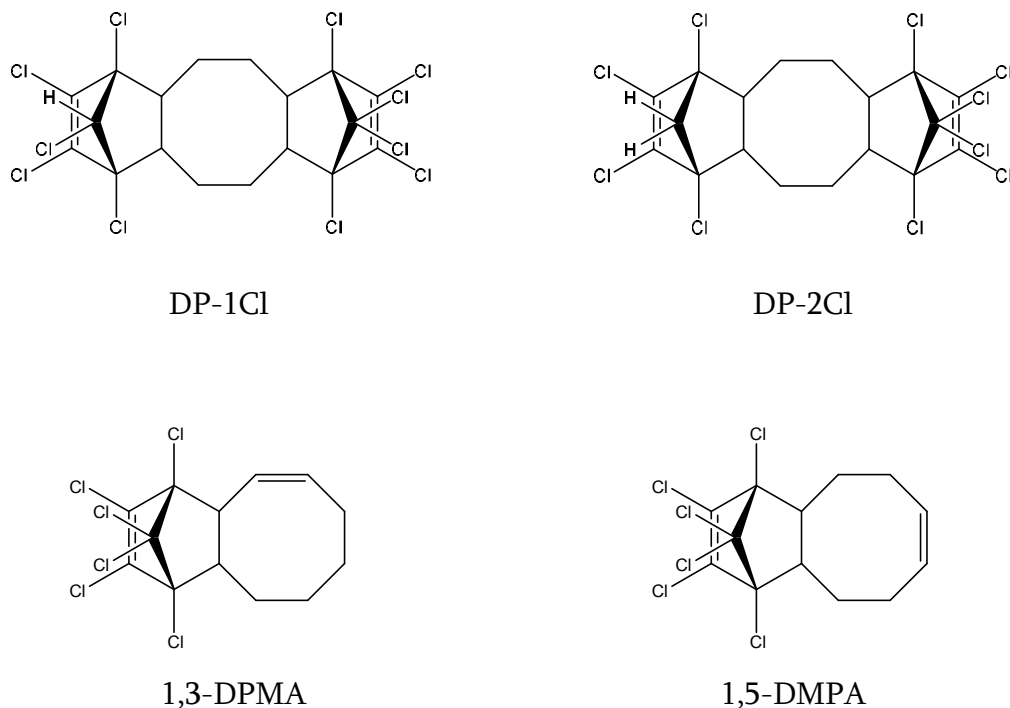
estereoisómeros en sus procesos de asimilación, bioacumulación, transporte intracelular y posible biodegradación.

Tan solo un año después de la detección inicial del DP en muestras ambientales de los Grandes Lagos canadienses, Sverko y colaboradores hallaron la presencia de compuestos derivados en sedimentos del río Niágara en Canadá, (Sverko, Tomy et al. 2007). Estos compuestos fueron identificados principalmente como formas del DP con pérdidas de uno o dos cloros, o bien como monoadductos Diels-Alder tal y como se muestra en la Figura 2.7. Las formas DP-1Cl y DP-2Cl están consideradas a día de hoy como posibles productos de degradación, habiendo sido detectadas en muestras abióticas y bióticas, mientras que al 1,3-DPMA y 1,5-DPMA se les reconoce un origen como impurezas presentes en formulaciones comerciales de DP y/o a través de procesos de degradación retro-Diels-Alder (Zheng, Wang et al. 2010; Guerra, Fernie et al. 2011; Sverko, Tomy et al. 2011; Zhang, Wu et al. 2011; Ben, Li et al. 2013; Tomy, Sverko et al. 2013).

Desde el punto de vista de su toxicidad, el conocimiento actual sigue siendo muy limitado. En el informe elaborado por OxyChem y remitido a la EPA, se describe como el DP presenta una baja toxicidad en peces, conejos y ratas, en los dos últimos tanto por vía oral como dérmica, mientras que su toxicidad por inhalación es moderada (USEPA 2011). Uno de los estudios llevados a cabo con ratas para la elaboración del citado informe no encontró ningún efecto de tipo clínico, anatómico-patológico, reproductivo, de fertilidad o de desarrollo fetal tras forzar una ingesta de cantidades tan altas como 5.000 mg/kg/día durante un periodo de 28 días consecutivos (Brock, Schroeder et al. 2010). Li y colaboradores informaron recientemente de la ausencia de mortalidad y de efectos histopatológicos observables tras forzar la ingesta continuada durante 90 días de cantidades de 1, 10 ó 100 mg/Kg/día también en ratas. No obstante dichos autores sí encontraron una acumulación preferencial de este xenobiótico en hígado, además de un perfil diferenciado de acumulación de cada estereoisómero del DP en función de la dosis suministrada. Así, un enriquecimiento de la proporción del isómero *syn* se detectó tras administrar las dosis de 10 y 100 mg/Kg/día (Li, Yu et al. 2013). Estos resultados fueron análogos a los obtenidos siguiendo un protocolo de actuación similar en codornices (*Coturnix coturnix*), en el que además se observó una correlación entre la dosis de 10 y 100 mg/Kg/día de DP y el aumento o supresión de la actividad de determinadas enzimas



hepáticas (Li, Yu et al. 2013). Crump y colaboradores, tras una aproximación combinada *in vivo* e *in ovo*, determinaron la ausencia de efectos citotóxicos y en la viabilidad embrionaria en huevos de gallina (*Gallus domesticus*) a concentraciones de DP considerablemente más altas que los niveles medioambientales habitualmente detectados del mismo (Crump, Chiu et al. 2011).



**Figura 2.7.** Estructuras de compuestos relacionados con el DP.

Debido a la notable falta de información toxicológica a día de hoy sobre el DP y su aparente comportamiento como COP en relación a su ubicuidad y capacidad de bioacumulación, no sería improbable que en los próximos años pasase a formar parte del Anexo D del Convenio de Estocolmo, que es aquél que recoge a los potenciales candidatos a formar parte de las sustancias reguladas por el Convenio. En este sentido, aquellas investigaciones dirigidas a ampliar y profundizar en el conocimiento, no sólo de su potencial tóxico, sino también de cualquier aspecto relacionado con su comportamiento medioambiental serán de un gran valor en la evaluación de los posibles riesgos asociados a su utilización.

## 2.2. ANÁLISIS DE COP

---

La determinación y cuantificación de los COP constituye un reto desde el punto de vista analítico por diferentes razones. Por un lado, se encuentran distribuidos globalmente por lo que su estudio incluye un variado número de matrices de distinta naturaleza, biótica o abiótica, con características y dificultades de análisis específicas. Además, suelen encontrarse en el medio ambiente en concentraciones a nivel de trazas barriendo un amplio abanico de varios órdenes de magnitud, como por ejemplo desde las partes por millón (ppm,  $\mu\text{g/g}$ ) de PCBs en algunas muestras de biota hasta las partes por cuatrillón (ppq,  $\text{fg/m}^3$ ) de PCDD/Fs, típicamente encontradas en aire (Harrad 2010; Bogdal, Scheringer et al. 2013). Por ello, es necesario emplear metodologías de tratamiento de muestras que conduzcan a extracciones cuantitativas de la manera más selectiva posible, y técnicas instrumentales de gran sensibilidad que permitan alcanzar límites de detección y cuantificación lo suficientemente bajos en función del analito y matriz analizada. Asimismo, es de vital importancia seguir protocolos de trabajo que garanticen la ausencia de contaminación por COP en las muestras a través del material de vidrio o de los disolventes orgánicos utilizados, así como por contacto con el propio aire del laboratorio. Finalmente, también es necesario trabajar con técnicas instrumentales de excepcional selectividad toda vez que los COP tienden a presentarse de manera conjunta en las muestras. Así por ejemplo, dentro de las familias de PCBs, PBDEs y PCDD/Fs existen un gran número de congéneres cuya determinación y cuantificación debe realizarse con un alto grado de fiabilidad, debido a, entre otros factores, la variable y específica toxicidad asociada a cada uno de ellos.

### *2.2.1. Metodologías de Tratamiento de Muestra*

---

Desde hace más de una década, están cobrando peso de manera creciente aquellas metodologías de tratamiento de muestra alternativas encaminadas hacia la miniaturización y/o automatización en el análisis de algunos COP y otros xenobióticos, incluyendo además el avance hacia aproximaciones más “verdes” o respetuosas con el

medio ambiente en términos de cantidad de disolventes utilizados y de desechos generados (Ramos, Ramos et al. 2005; Ramos 2012). Ejemplos de esto último es la utilización de líquidos iónicos (ILs) y de polímeros de impresión molecular (MIPs) en procesos de extracción y purificación (Farré, Pérez et al. 2010). Los ILs son un tipo de disolventes iónicos no moleculares, líquidos a temperaturas de hasta 150°C y con una despreciable volatilidad. En principio, se pueden modificar sus propiedades físicas, tales como su miscibilidad con el agua o con disolventes orgánicos, su selectividad hacia determinados analitos, así como su potencial toxicidad simplemente variando adecuadamente la parte catiónica y/o aniónica de sus estructuras (Martín-Calero, Pino et al. 2011). Dicha versatilidad, junto con la no generación de compuestos orgánicos volátiles y su potencial reutilización se traduce en grandes ventajas en el empleo de los ILs que se demuestra en el creciente número de investigaciones en el campo de la contaminación medioambiental (Ruiz-Aceituno, Sanz et al. 2013). Por otro lado, los MIPs son matrices poliméricas que se sintetizan con sitios activos específicos para la interacción selectiva con un determinado analito o familia de analitos. Sus características permiten, por ejemplo, desarrollar procesos de extracción en fase sólida (MISPE) selectivos acompañados de reducidos volúmenes de disolventes orgánicos para llevar a cabo la desorción de los analitos, a lo que hay que sumar su potencial regeneración y reutilización en posteriores extracciones (Beltran, Borrull et al. 2010; Turiel y Martín-Esteban 2010).

No obstante las anteriores aproximaciones plantean, de momento, una aplicabilidad limitada especialmente en el análisis de COP como los PCBs no *orto* y especialmente las PCDD/Fs, que, presentándose a niveles medioambientales muy reducidos, requiere de mayores cantidades de muestra y habitualmente de laboriosos procesos de preconcentración y purificación (Srogi 2007; Clement y Reiner 2012).

Así, en general, y debido a lo anteriormente expuesto, hoy en día, los tratamientos de muestra comúnmente empleados en el análisis de la mayor parte de los COP conllevan aun múltiples etapas, que normalmente requieren de un alto grado de manipulación, consumo de disolventes orgánicos, tiempo y coste económico. Aunque pueden existir diferencias en función de la matriz y de los contaminantes analizados, de forma general y sintética, las citadas metodologías comprenden una etapa de pretratamiento de la muestra dirigida a la homogeneización y preparación mediante la

eliminación del agua de la misma, una etapa de extracción de los analitos de interés que se encuentran asociados a la fracción lipídica (muestras bióticas) o más hidrófoba (muestras abióticas), otra de purificación para eliminar interferencias coextraídas, y finalmente una etapa de fraccionamiento que permite separar las distintas familias de contaminantes y facilita la etapa de determinación instrumental.

Las alternativas más frecuentemente utilizadas en el tratamiento de la muestra, incluyendo las etapas de pretratamiento, extracción, purificación y fraccionamiento para el análisis de COP se recogen a modo de resumen en la Tabla 2.13 (Ridgway, Lalljie et al. 2007; van Leeuwen y de Boer 2008; De Koning, Janssen et al. 2009; Xu, Wang et al. 2013), en donde aquellas utilizadas en los análisis de muestras llevados a cabo en la presente tesis doctoral se encuentran subrayadas.

**Tabla 2.13.** Esquema de procedimientos más habitualmente utilizados en cada una de las etapas del tratamiento de muestra para el análisis de COP.

	Muestras Líquidas	Muestras Sólidas y Semisólidas
<b>Pretratamiento</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Filtrado</li> <li>• Modificación del pH</li> <li>• Adición de sales</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Secado</u></li> <li>• <u>Tamizado</u></li> <li>• <u>Homogeneización</u></li> </ul>
<b>Extracción</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Extracción líquido-líquido (LLE)</li> <li>• Extracción en fase sólida (SPE)</li> <li>• Microextracción en fase sólida (SPME)</li> <li>• Extracción mediante adsorción en barra de agitación (SBSE)</li> <li>• Diálisis</li> <li>• Extracción con líquidos iónicos (ILs)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Extracción en soxhlet</u> (tradicional o automático)</li> <li>• <u>Dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD)</u></li> <li>• Extracción con líquidos presurizados (PLE)</li> <li>• Extracción acelerada con disolventes (ASE)</li> <li>• Extracción asistida con microondas (MAE)</li> <li>• Extracción con fluidos supercríticos (SFE)</li> <li>• Extracción con agua subcrítica (SBWE)</li> <li>• Extracción con ultrasonidos (USE)</li> </ul>

<b>Purificación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diálisis</li> <li>• Saponificación</li> <li>• Cromatografía de exclusión molecular (GPC)</li> <li>• Con adsorbentes: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sílice neutra y/o modificada ácidamente (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y/o básicamente (KOH)</li> <li>• Alúmina</li> <li>• Florisil ®</li> </ul> </li> </ul>
<b>Fraccionamiento</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cartuchos de SPE con carbón grafitico + adsorbente</li> <li>• Florisil ®</li> <li>• Alúmina</li> <li>• Columnas de Pyrenil en HPLC</li> </ul>

### *2.2.2. Técnicas de Análisis Instrumental*

Una vez llevado a cabo el tratamiento de la muestra, es habitual que en los extractos finales, ya purificados, exista un elevado número de congéneres y/o isómeros de las distintas familias de COP y otros contaminantes. Además, es también frecuente la presencia en dichos extractos de compuestos de estructuras químicas afines pero con niveles de concentración distintos (en algunos casos hasta varios órdenes de magnitud), que pueden dificultar o imposibilitar la identificación de los analitos de interés. Por ello, actualmente e independientemente de la selectividad del sistema de detección seleccionado, la cromatografía, tanto en su modalidad de gases (GC) como de líquidos (LC), sigue siendo una técnica necesaria en la separación y resolución de los distintos compuestos de una muestra de manera previa a su identificación y cuantificación.

En el campo de la contaminación medioambiental la LC ha sido tradicionalmente reservada para el análisis de contaminantes polares, no volátiles y/o termolábiles. Sin embargo, en éste y en otros campos de interés, el empleo de la LC ha experimentado un auge en tiempos recientes justificado, en parte, por la mejora en la separación cromatográfica y los tiempos muy cortos de análisis alcanzados en los modernos equipos de UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*), y también por su acoplamiento con la espectrometría de masas (MS), la cual a su vez hace posible

la utilización de diferentes fuentes de ionización que permiten cubrir un amplio intervalo de polaridades y de masas moleculares en las especies analizadas (Petrovic, Farré et al. 2010). Pese a ello, aun hoy en día, la separación y resolución cromatográfica de la mayor parte de los COP regulados por el Convenio de Estocolmo, y en concreto de todos aquellos estudiados en la presente tesis doctoral, se suele abordar en la mayoría de las ocasiones por GC, la cual mediante el uso de columnas capilares, que presentan un gran número de platos teóricos, proporciona una elevada capacidad de resolución para compuestos de volatilidad media-alta (van Leeuwen y de Boer 2008).

El tipo de columnas capilares empleadas en GC para el análisis de COP y de otros contaminantes orgánicos similares son generalmente de naturaleza apolar, y frecuentemente del tipo 5% fenil- 95% metilpolisiloxano (tipo DB-5 y BPX-5); con dimensiones habituales de 30 a 60 metros de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de fase (van Leeuwen y de Boer 2008). Estas dimensiones son variables y en cierto modo dependientes del tipo y número de analitos a separar y de la selectividad del detector utilizado. Así por ejemplo, en el análisis de PBDEs y debido a la tendencia a la degradación térmica del BDE-209, que se acentúa en columnas de longitudes como las indicadas, se suele recurrir a su separación cromatográfica con columnas más cortas, típicamente de 15 m y espesores de fase más reducidos de 0,1 a 0,2  $\mu\text{m}$ . Desde el punto de vista de la fase estacionaria, existen comercialmente numerosas alternativas con diferente selectividad hacia distintos tipos de contaminantes; no obstante, en ocasiones sigue siendo difícil, cuando no directamente imposible, realizar con una sola columna la separación de todos los COP en un solo análisis. Así por ejemplo, cabe citar cómo actualmente no existe ninguna columna capilar de cromatografía de gases capaz de separar los 209 congéneres de PCBs. La utilización de columnas con diferentes fases estacionarias cobra especial relevancia en las técnicas de cromatografía de gases multidimensional, tanto en su modalidad *heart-cutting* (MDGC), como en la cromatografía por gases completa en dos dimensiones (GC x GC), de creciente utilización en los últimos años. Para estas técnicas multidimensionales, dos columnas con fases estacionarias distintas pueden combinarse en serie de forma que, o bien una parte específica de la elución de un extracto –en la *heart-cutting* MDGC–, o bien su totalidad –en la GC x GC– es secuencialmente analizada en ambas columnas que presentan diferentes selectividades. Esto se traduce en un incremento de la capacidad de

análisis –mucho mayor en el caso de la GC x GC– de los compuestos existentes en una muestra en relación a la GC monodimensional, que junto a otros factores explica el actual crecimiento de su empleo en diferentes campos de investigación como el medioambiental (Ramos 2009).

Tras su separación y dadas las concentraciones a nivel de trazas a las que estos contaminantes suelen encontrarse, es vital que su determinación pueda realizarse con una gran sensibilidad. En este sentido, los detectores de captura electrónica (ECD y  $\mu$ ECD) son muy sensibles y selectivos para compuestos electrófilos como es el caso de los COP y otros contaminantes organohalogenados. Este tipo de detectores son de simple acoplamiento con la GC, muy robustos y de fácil manejo y mantenimiento, además de presentar un coste relativamente reducido. Por todo ello, la GC-ECD (y en años recientes la GC- $\mu$ ECD) ha sido utilizada de manera rutinaria en la determinación y cuantificación de estos compuestos desde la década de los 60 (van der Hoff y van Zoonen 1999). Sin embargo, a día de hoy, la técnica de referencia para la detección de cualquier analito en general y de COP en particular, es la espectrometría de masas, la cual, dependiendo de su modalidad de trabajo y del tipo de analizador, es capaz de proporcionar una sensibilidad equiparable o superior a la ECD a la par que una mucha mayor selectividad (Santos y Galceran 2003; Xu, Wang et al. 2013).

La MS no sólo es una técnica selectiva al permitir identificar, en su modalidad de monitorización selectiva de iones (SIM), relaciones masa/carga ( $m/z$ ) conocidas y en ocasiones específicas de un analito determinado, sino que también puede proporcionar información estructural de analitos desconocidos en base a su patrón de fragmentación cuando se monitorizan todas las  $m/z$  en un intervalo concreto de trabajo (SCAN). No obstante, debido a las bajas concentraciones en las que los COP y otros contaminantes medioambientales generalmente se hallan en las muestras, el modo de trabajo habitual en la cuantificación de estos es el SIM, ya que proporciona una notable reducción de los límites de detección (LODs) con respecto al SCAN. Dentro de la espectrometría de masas, cabe diferenciar entre los analizadores de baja resolución (LRMS), normalmente capaces de diferenciar hasta 1 unidades de  $m/z$  y aquellos de alta resolución (HRMS), capaces de diferenciar varias unidades significativas de masa. Los límites entre la LRMS y la HRMS, sin embargo, empiezan en ocasiones a difuminarse ya que algunos analizadores considerados tradicionalmente de baja resolución son capaces de

proporcionar hoy en día resoluciones intermedias, y e incluso, en algunos casos, similares a los de HRMS. Pese a ello, resulta útil desde un punto de vista conceptual seguir manteniendo la diferenciación clásica entre analizadores de MS como se muestra en la Tabla 2.14.

**Tabla 2.14.** Resumen de los analizadores de LRMS y HRMS más frecuentemente empleados en el análisis de COP y otros xenobióticos.

LRMS	→	HRMS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Analizador cuadrupolar (qMS)</li> <li>• Analizador de trampa iónica (ITD)</li> <li>• Analizador de triple cuadrupolo (QqQ)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Analizador de tiempo de vuelo (TOF)</li> <li>• Analizadores Mixtos (Q-TOF)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Analizador de sector magnético</li> <li>• Orbitrap®</li> </ul>

La popularización de la MS ha conllevado igualmente el empleo creciente de patrones analíticos marcados isotópicamente (generalmente con  $^{13}\text{C}$  o  $^2\text{H}$ ) para el análisis de distintas matrices en diferentes campos como el medioambiental (Richardson 2010). La suplementación con dichos patrones antes de iniciar el tratamiento de las muestras y su posterior cuantificación en los extractos finales supone dos ventajas fundamentales. Por un lado, permite cuantificar y controlar la eficiencia en el proceso de extracción de los analitos al asumir que las pérdidas sufridas a lo largo del proceso por los compuestos no marcados (también llamados nativos) serán iguales a aquellas de los compuestos marcados; aunque es importante recalcar que dicha cuantificación es siempre una estimación, debido a que la interacción de los analitos endógenos con la matriz de una muestra dada nunca es exactamente igual a la de los patrones suplementados. Por otro lado, su utilización como patrones internos permite realizar la cuantificación de los analitos nativos mediante la técnica de la dilución isotópica, la cual constituye el estándar de oro en el análisis y cuantificación de COP y otros xenobióticos por espectrometría de masas a los niveles traza y ultratrazas a los que estos se presentan con excelente precisión y exactitud (Mechlińska, Wolska et al. 2010). Idealmente, para poder aplicar esta técnica, la muestra ha de suplementarse con una versión marcada isotópicamente de cada analito nativo, que servirá como patrón interno y a cuya



respuesta se relativizará la de su homólogo nativo. Frecuentemente, sin embargo, no se dispone o no existe comercialmente la versión marcada isotópicamente de todos los analitos que se quieren investigar, por lo que en esos casos se recurre a relativizar la respuesta del compuesto nativo con la del compuesto marcado más próximo desde un punto de vista estructural y de comportamiento cromatográfico.

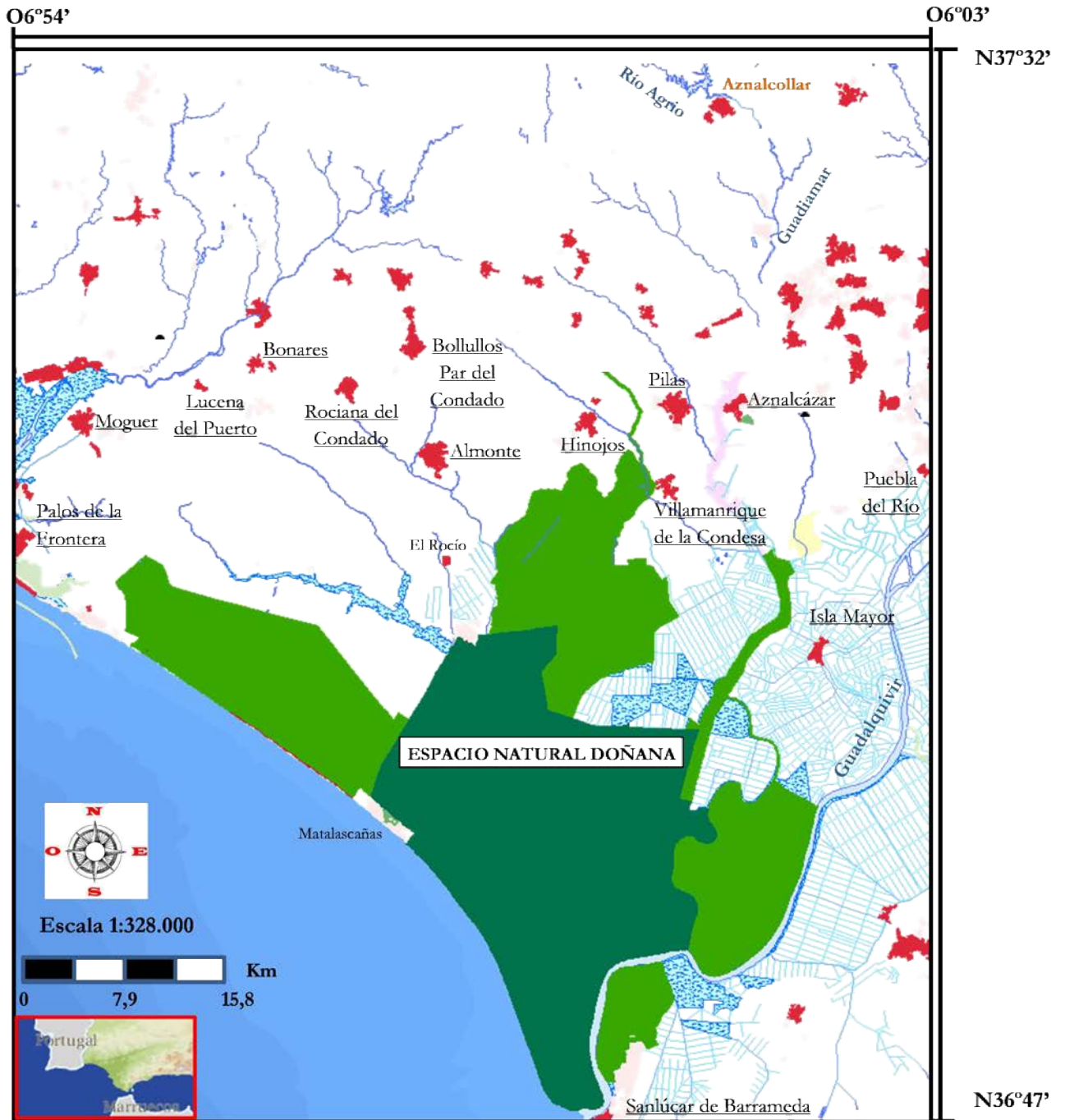
## 2.3. ESPACIO NATURAL DE DOÑANA

---

Dada la singularidad, desde el punto de vista de la conservación y biodiversidad, de la zona de estudio en la que se han llevado a cabo algunos trabajos de investigación recogidos en esta tesis doctoral, se describen a continuación los detalles más relevantes de este espacio natural, junto a una breve perspectiva histórica sobre el origen y la problemática de la contaminación en este área.

El Parque Nacional de Doñana (PND) se establece administrativamente en 1969 con una extensión inicial de 35.000 hectáreas (BOE 27 de Octubre de 1969). Con el paso de los años ha sido objeto de varias ampliaciones, la última de las cuales se produjo en el 2004 estableciéndose una superficie total para el mismo de 54.252 ha (BOE 24 de Febrero de 2004). En 1982 se crea el Parque Natural de Doñana a partir de terrenos circundantes al PND, el cual a día de hoy ocupa una extensión de 53.835 ha. Sin embargo, no fue hasta 1999 cuando se generó legalmente la figura del Espacio Natural de Doñana (END) (BOJA 25 de Noviembre de 1999) que engloba a sendos parques con una superficie total de 108.087 ha distribuidas entre las provincias de Huelva, Sevilla y Cádiz (Figura 2.8). Delimitando este Espacio Natural se incluyen catorce municipios de dichas provincias, constituyendo un gran socioecosistema que recibe la denominación de *Comarca de Doñana*, con una población de más de 180.000 habitantes y con un alto grado de actividad agrícola (Fundación Doñana<sup>21</sup> 2013).

Declarado en 1980 y 1994 por la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) *Reserva de la Biosfera* y *Patrimonio de la Humanidad*, respectivamente, el PND está considerado como la mayor reserva ecológica de Europa, incluyendo ecosistemas muy diferenciados como las playas, las marismas, las dunas y los bosques (llamados cotos) que albergan un elevado número de especies animales y vegetales, algunas de ellas únicas y/o en peligro de extinción como el Lince ibérico (*Lynx pardinus*) o el Águila Imperial (*Aquila adalberti*). De entre los ecosistemas del PND hay que destacar las marismas como un enclave de extraordinaria importancia como lugar de paso, cría e invernada para miles de aves europeas y africanas, donde se llegan a reunir en números de hasta 200.000 individuos en invierno. Y es que la riqueza en el número y diversidad de aves que habitan permanente o temporalmente, con más



**Figura 2.8.** Localización y configuración del Espacio Natural de Doñana a partir de los Parques Nacional (verde oscuro) y Natural de Doñana (verde claro), y de la Comarca de Doñana, constituida por los 14 municipios cuyo nombre se encuentra subrayado. Mapa obtenido y adaptado a partir de (IDEE 2013).

de 360 especies catalogadas (Red de Parques Nacionales. Ministerio de Agricultura) que suponen del orden del 70% de todas las especies europeas, es una de las señas de identidad de esta reserva biológica. Pero además de las aves, muchas otras especies animales incluyendo reptiles, anfibios, peces y mamíferos cohabitan con más de 800 especies vegetales en el Espacio Natural de Doñana.

La ausencia de asentamientos permanentes ha permitido que el corazón de Doñana, en concreto el PND, haya perdurado relativamente inalterado durante siglos; sin embargo, también ha sido inevitable el que en una u otra medida haya sido afectado por actividades humanas de carácter agrícola, industrial o minero, siendo esta última la responsable del mayor accidente de contaminación sufrido en la historia de Doñana, y que se ha llegado a conocer popularmente como el *Desastre de Aznalcóllar*.

El citado accidente tuvo lugar el 25 de abril de 1998 como resultado de una rotura en la presa de contención de una balsa de decantación de las Minas de Aznalcóllar (Sevilla), propiedad de la empresa sueca Bolidén-Arprisa S.A. y destinadas a la extracción de pirita. Como consecuencia directa se liberaron al río Agrio del orden de 4 y 2 millones de metros cúbicos de agua ácida y de lodo tóxico respectivamente (Grimalt, Ferrer et al. 1999), este último con un elevado contenido en metales pesados y metaloides. El vertido en el río Agrio causó su desbordamiento y posteriormente la transferencia del agua y lodos al río Guadiamar que es uno de los cauces que llegan a Doñana; y así, aunque se levantaron muros de contención de urgencia en el Canal de Entremuros (aproximadamente a 20 km de Aznalcóllar) para evitar la entrada de la carga contaminante al PND, estos no pudieron evitar que una parte significativa de la misma ( $\approx 4 \text{ hm}^3$ ) encontrase su camino hasta la desembocadura del río Guadalquivir. Como resultado, 4.286 ha de terreno resultaron afectadas por el lodo tóxico, de las cuales 2.656 y 98 ha pertenecían respectivamente a los Parques Natural y Nacional de Doñana. El impacto inmediato sobre la fauna y flora fue dramático acabando con la vida de numerosos especímenes de diferentes cadenas tróficas de forma inmediata (Pain, Sánchez et al. 1998; Drake, Baldó et al. 1999; Meharg, Osborn et al. 1999) y afectando a la salud y al estado de conservación de algunas de sus poblaciones durante los años posteriores (Pastor, Baos et al. 2004; Baos, Jovani et al. 2006; Baos, Jovani et al. 2012).

Desde el inicio del establecimiento del PND se realizaron investigaciones centradas en la polución por diferentes compuestos. Así, en la década de los años 70 se emprendieron estudios sobre la posible contaminación debida a compuestos organohalogenados como los PCBs o el DDT (Baluja, Murado et al. 1977; Baluja y Hernández 1978), los cuales tuvieron una cierta continuación en los años 80 y 90 (Baluja, Gonzalez et al. 1985; Albaigés, Algaba et al. 1987; Fernández, Hernández et al. 1992). No obstante, y de manera incuestionable, la mayor parte de los trabajos realizados tanto en muestras abióticas como con organismos bioindicadores en este área han estado predominantemente enfocados hacia la contaminación por metales pesados. Esta situación se hizo aún más patente desde finales de los años 90 después del acaecimiento del mencionado *Desastre de Aznalcollar* (Benito, Devesa et al. 1999; Hernández, Gómara et al. 1999; Meharg, Osborn et al. 1999; Querol, Alastuey et al. 2000; Mateo, Cadenas et al. 2001; Del Río, Font et al. 2002; Meharg, Pain et al. 2002; García-Luque, Forja et al. 2003; Pain, Meharg et al. 2003; Bonilla-Valverde, Ruiz-Laguna et al. 2004; Gómez, Baos et al. 2004; Sánchez López, García et al. 2004; Taggart, Carlisle et al. 2004; Baos, Jovani et al. 2006; Madejón, Murillo et al. 2006; Taggart, Figuerola et al. 2006; Aguilar, Dorronsoro et al. 2007; Mateo, Green et al. 2007; Millán, Mateo et al. 2008; Udrouiu, Cristaldi et al. 2008; Sánchez-Chardi, Ribeiro et al. 2009; García-Sevillano, González-Fernández et al. 2012). Existen sin embargo algunas pocas excepciones en relación al campo de los COP y de otro tipo de contaminantes orgánicos como pueden ser aquellos de origen farmacéutico (Guitart, Clavero et al. 2005; Gómara y González 2006; Gómara, González et al. 2008; Camacho-Muñoz, Martín et al. 2010; Mateo, Millán et al. 2012). No obstante, no es errado afirmar que pese al altísimo valor ecológico, social y económico de esta zona, el conocimiento del estado actual de la contaminación por COP y sustancias análogas en el Espacio Natural de Doñana y su Comarca presentaba un severo déficit hasta el desarrollo de la presente tesis doctoral, la cual ha contribuido a paliar dicha situación si bien dejando abiertas posibles líneas de investigación para profundizar y mejorar este conocimiento.

## 2.4. LAS AVES COMO ORGANISMOS BIOINDICADORES DE CONTAMINACIÓN

---

La liberación de contaminantes en el medio ambiente implica su distribución en diferentes compartimentos, a saber, aire, agua, suelo y seres vivos. Abordar el estudio de la contaminación en un determinado ecosistema de manera completa, considerando tanto el medio físico como biológico, resulta una tarea ardua y a veces imposible de realizar. Es por ello que con mucha frecuencia se plantea abordarlo mediante estudios de biomonitorización basados en el empleo de una determinada especie característica del ecosistema objeto de interés, considerada como especie bioindicadora. En este sentido, la utilización de aves en el estudio de contaminación específicamente por COP lleva realizándose desde hace varias décadas (Ratcliffe 1967; Parslow, Jefferies et al. 1972; Furness 1993). Las aves, especialmente aquellas que ocupan una posición relativamente alta en sus correspondientes cadenas tróficas, son las más indicadas para este tipo de estudios por los fenómenos que pueden experimentar de bioacumulación y biomagnificación de un número elevado de contaminantes (Becker 2003). Esto facilita, en muchas ocasiones, el estudio combinado en estas especies de niveles de contaminación junto con los posibles efectos derivados de los mismos. Adicionalmente, suelen ser especies de larga vida media y de las que se dispone de mucha información en cuanto a su ecología en una determinada zona geográfica.

El empleo de cualquier especie como bioindicadora puede ser llevado a cabo de dos maneras: destructiva o no destructiva. La primera supone el análisis de órganos o tejidos del animal implicando necesariamente la muerte del mismo; práctica que puede verse involucrada en conflictos de carácter ético o incluso legal. Por otra parte, la aproximación no destructiva y a ser posible mínimamente invasiva (seguida en el presente trabajo de investigación) se basa, en el caso de las aves, en el análisis de tejidos como sangre, heces, huevos o plumas que pueden obtenerse sin necesidad de sacrificar al individuo y en algunos casos incluso de manera no invasiva, como sería el caso del empleo de heces, huevos o plumas que se obtienen sin necesidad de capturar y manipular a los individuos.

### 2.4.1. La Cigüeña Blanca Como Especie Bioindicadora

---

La cigüeña común o cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) es una de las especies integrantes y quizás más abundantes de la avifauna de Doñana, en donde normalmente se localizan en aguas someras especialmente en la zona de las marismas colindante con el matorral. Dentro de la Comunidad Autónoma de Andalucía, la gran mayoría de las colonias de esta especie están localizadas en el Espacio Natural de Doñana y sus alrededores (Molina 2005).

Morfológicamente, la cigüeña blanca se caracteriza por su plumaje totalmente blanco a excepción de las rémiges que son de negro azabache, y por su pico y patas muy largos de color rojo (Figura 2.9). No presenta dimorfismo sexual marcado. Su longitud y envergadura medias se sitúan en 100-115 y 155-195 cm, respectivamente, y su peso suele estar comprendido entre 2,5 y 4,5 Kg. Su esperanza de vida se estima en unos 18 años.

La nidificación se produce habitualmente en alto y de forma mayoritaria en árboles, aunque también se observa en elementos elevados de naturaleza humana como postes de tendido eléctrico, o edificaciones. La puesta media, que tiene lugar a finales de marzo, consta de 3 a 5 huevos que son incubados por ambos progenitores durante 29-30 días (Fernández 1982).

La cigüeña blanca es una especie oportunista que aprovecha el alimento más abundante de cada zona y momento. Su dieta incluye invertebrados y vertebrados, tales como insectos, moluscos, peces, crustáceos, anfibios, reptiles, roedores, y ocasionalmente a pequeñas aves y a sus pollos (Negro, Tella et al. 2000; Kruszyk y Ciach 2010), lo que le hace ocupar posiciones altas de las cadenas tróficas. Una parte muy importante de la dieta de las cigüeñas que habitan en el END es el cangrejo rojo americano (*Procambarus clarkii*) (Negro, Tella et al. 2000), especie invasora que fue introducida en la zona en 1974 y que supone una fuente de alimento constante, no sólo para la cigüeña blanca sino para muchos predadores de este área (Delibes y Adrián 1987).

Siendo tradicionalmente un ave migratoria que se desplaza a zonas cálidas en África durante la época invernal, desde los años ochenta se viene observando un cambio

de tendencia en un número creciente de colonias de toda la península Ibérica, las cuales pasan a ser sedentarias a lo largo de todo el año (Tortosa, Caballero et al. 2002; Peris 2003). Este hecho se ha asociado frecuentemente a la proliferación de vertederos abiertos de residuos sólidos urbanos que suponen una fuente permanente de alimento (Aguirre 2006). Debido quizás a la sobreabundancia de recursos alimenticios, representados por los vertederos y, principalmente, por el cangrejo rojo, se ha constatado como una parte creciente de individuos de cigüeña blanca en el Espacio Natural de Doñana no invernada en otras áreas, constituyendo así la mayor colonia sedentaria de la Península (Molina, del Moral et al. 2006; Rendón, Green et al. 2008).



**Figura 2.9.** Pareja de cigüeña blanca en nido. Foto de J.C. Rincón.

Como resultado de la conjunción de diversos factores, ya mencionados, entre los que destacan el amplio conocimiento sobre sus hábitos alimenticios, su sedentarismo, su larga vida, y su alta posición en la cadena trófica, la cigüeña blanca es un buen candidato para ser utilizado como organismo bioindicador, de contaminación de diferentes áreas,



en concreto en el estudio de compuestos organohalogenados y de metales pesados. Este hecho se ha puesto de manifiesto en investigaciones anteriores (Hernández, Rico et al. 1987; Hernandez, Gonzalez et al. 1988; Meharg, Pain et al. 2002; Gómez, Baos et al. 2004; Blázquez, Aguirre et al. 2006).

#### ***2.4.2. Utilización de Huevos como Aproximación no Destructiva ni Invasiva***

---

La recolección y análisis de huevos de diferentes especies de aves en el estudio de la contaminación medioambiental se ha llevado a cabo desde hace décadas por diferentes investigadores (Ratcliffe 1967; González y Hiraldo 1988; Negro, Donázar et al. 1993; Becker, Cifuentes et al. 2001; Van den Steen, Jaspers et al. 2008; Verreault, Gabrielsen et al. 2010). De manera estricta, la utilización de huevos viables podría igualmente ser considerada destructiva por los efectos que puede conllevar a nivel poblacional, especialmente en especies amenazadas y/o con tamaño de puesta reducido. Por otro lado, el principal problema asociado a la elección de huevos no viables o infértiles es la degradación microbiológica de la que pueden ser objeto de manera previa a su recolección. No obstante, es esperable que dicha degradación implique nulas o mínimas variaciones en el contenido de contaminantes altamente persistentes y resistentes a su (bio)transformación como son los COP (Herzke, Kallenborn et al. 2002).

Diversos autores han demostrado la transferencia y deposición cuantitativa de contaminantes presentes en las madres directamente a sus huevos (Russell, Gobas et al. 1999; Bargar, Scott et al. 2001) Dicha transferencia parece estar influenciada por diferentes factores como las propiedades físico-químicas de los compuestos contaminantes (geometría y tamaño moleculares, grado de halogenación, log  $K_{ow}$ , etc), así como por su grado y tipo de metabolización, o por factores biológicos tales como el tamaño de la puesta, el tamaño de cada huevo, o las estrategias reproductivas de cada especie relacionadas con los recursos lipídicos y proteicos movilizados en el proceso de la puesta (Drouillard y Norstrom 2001; Verreault, Villa et al. 2006). Así, hay especies que parecen invertir recursos de un origen más exógeno, es decir, aquellos principalmente adquiridos a través de la dieta durante un tiempo relativamente reciente y previo a la

puesta (denominados *income breeders* en inglés). Por el contrario, existen otras especies que parecen movilizar recursos más endógenos y por tanto, los contaminantes transferidos a los huevos se corresponderán mayoritariamente con aquellos secuestrados en los compartimentos lipídicos del animal y adquiridos en tiempos anteriores de exposición a los mismos (*capital breeders*) (Rendón, Rendón-Martos et al. 2011). Este hecho cobra especial relevancia en especies migratorias, puesto que los contaminantes transferidos a sus huevos pueden corresponder de manera representativa a aquellos asimilados en otras zonas geográficas.

Para el caso de la cigüeña blanca no existen estudios específicos sobre el origen exógeno *versus* endógeno de los recursos utilizados en la formación de sus huevos. Sin embargo, se puede hipotetizar sobre un mayor comportamiento como criadores *income* en función de los estudios que apuntan a un alto grado de influencia de la dieta adquirida en el periodo inmediatamente anterior a la reproducción, tanto en el tamaño de la puesta como en la precocidad o demora de la misma (Tortosa, Pérez et al. 2003).

La Estación Biológica de Doñana (EBD), Centro Público de Investigación dependiente del CSIC, lleva a cabo desde hace más de 30 años el seguimiento de colonias de *Ciconia ciconia* establecidas en el END. Por otro lado, el Dr. Jose Ignacio Aguirre, Profesor de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid ha desempeñado una labor de estudio y seguimiento de la misma especie residente en la región de Madrid desde hace más de 10 años. La existencia de estos programas de vigilancia de la cigüeña blanca ha hecho posible disponer de huevos infértiles correspondientes a esta especie, en dichas áreas, en un relativo buen estado de conservación, ya que fueron recogidos poco tiempo después de su puesta. Por todo lo anteriormente expuesto, estos huevos representan un excelente material biológico, como aproximación mínimamente invasiva, empleando la cigüeña blanca como organismo bioindicador, para el estudio y evaluación de la contaminación por COP en las zonas indicadas, tal y como se describe en posteriores capítulos de la presente tesis doctoral.

## REFERENCIAS

- Aguilar, J., C. Dorronsoro, et al. (2007). "Arsenic contamination in soils affected by a pyrite-mine spill (Aznalcóllar, SW Spain)." Water, Air, and Soil Pollution **180**(1-4): 271-281.
- Aguirre, J. I. (2006). Factores que afectan la supervivencia juvenil de la Cigüeña Blanca (Ciconia ciconia). Tesis Doctoral de la Universidad Complutense de Madrid.
- Alaee, M., P. Arias, et al. (2003). "An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release." Environment International **29**(6): 683.
- Alaee, M. and R. Wenning (2002). "The significance of brominated flame retardants in the environment: current understanding, issues and challenges." Chemosphere **46**: 579 - 582.
- Albaigés, J., J. Algaba, et al. (1987). "Budget of organic and inorganic pollutants in the Donana National Park (Spain)." Science of The Total Environment **Vol. 63**: 13-28.
- Alcock, R. E., A. J. Sweetman, et al. (2003). "Understanding levels and trends of BDE-47 in the UK and North America: an assessment of principal reservoirs and source inputs." Environment International **29**(6): 691-698.
- Andersson, Ö. and G. Blomkvist (1981). "Polybrominated aromatic pollutants found in fish in Sweden." Chemosphere **10**(9): 1051-1060.
- Arambarri, P., F. Cabrera, et al. (1996). "Quality evaluation of the surface waters entering the Donana National Park (SW Spain)." Science of The Total Environment **191**(3): 185-196.
- ATSDR (1998). "Toxicological profile for chlorinated dibenzo-*p*-dioxins." U.S. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR).
- ATSDR (2000). "Toxicological profile for Polychlorinated Biphenyls (PCBs)." U.S. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR).
- ATSDR (2002). "Toxicological profile for DDT, DDE and DDD." U.S. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR).
- ATSDR (2004). "Toxicological Profile for Polybrominated Biphenyls and Polybrominated Diphenyl Ethers." U.S. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR).
- Ballschmiter, K. and M. Zell (1980). "Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography." Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie **302**(1): 20-31.
- Baluja, G., J. Gonzalez, et al. (1985). "Sources and transport of organochlorine compounds and heavy metals into waters of the National Park of Donana." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **35**(4): 482-489.
- Baluja, G. and L. M. Hernández (1978). "Organochloride pesticide and PCB residues in wild bird eggs from the South-West of Spain." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **19**(6): 655-664.
- Baluja, G., M. Murado, et al. (1977). "Organochlorine pesticides and PCBs distribution in tissues of Purple Heron and Spoon Duck from the Biological Reserve of Doñana (Spain)." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **17**(5): 603-612.
- Baos, R., R. Jovani, et al. (2006). "Evaluation of genotoxic effects of heavy metals and arsenic in wild nestling white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*Milvus migrans*) from

- Southwestern Spain after a mining accident." Environmental Toxicology and Chemistry **25**(10): 2794-2803.
- Baos, R., R. Jovani, et al. (2012). "Developmental exposure to a toxic spill compromises long-term reproductive performance in a wild, long-lived bird: The white stork (*Ciconia ciconia*)." PLoS ONE **7**(4).
- Bargar, T. A., G. I. Scott, et al. (2001). "Maternal transfer of contaminants: Case study of the excretion of three polychlorinated biphenyl congeners and technical-grade endosulfan into eggs by white leghorn chickens (*Gallus domesticus*)." Environmental Toxicology and Chemistry **20**(1): 61-67.
- Beard, J. (2006). "DDT and human health." Science of The Total Environment **355**(1): 78-89.
- Becker, P. H. (2003). Chapter 19 Biomonitoring with birds. Trace Metals and other Contaminants in the Environment. A. M. B. B.A. Markert and H. G. Zechmeister, Elsevier. **Volume 6**: 677-736.
- Becker, P. H., J. M. Cifuentes, et al. (2001). Contaminants in Bird Eggs in the Wadden Sea: Spatial and Temporal Trends 1991-2000, Common Wadden Sea Secretariat, Trilateral Monitoring and Assessment Group.
- Beltran, A., F. Borrull, et al. (2010). "Molecularly-imprinted polymers: useful sorbents for selective extractions." TrAC Trends in Analytical Chemistry **29**(11): 1363-1375.
- Ben, Y. J., X. H. Li, et al. (2013). "Dechlorane Plus and its dechlorinated analogs from an e-waste recycling center in maternal serum and breast milk of women in Wenling, China." Environmental Pollution **173**: 176-181.
- Benito, V., V. Devesa, et al. (1999). "Trace elements in blood collected from birds feeding in the area around Donana National Park affected by the toxic spill from the Aznalcollar mine." Science of The Total Environment **242**(1-3): 309-323.
- Birnbaum, L. S. and D. F. Staskal (2004). "Brominated flame retardants: cause for concern?" Environmental Health Perspectives **112**(1): 9.
- Blázquez, E., J. Aguirre, et al. (2006). "The use of White stork (*Ciconia ciconia*) nestlings in a biomonitoring programme for organochlorines through the region of Madrid (Spain)." Organohalogen compounds **68**: 2081-2085.
- BOE (24 de Diciembre de 1975). "Orden del 4 de diciembre por la que se restringe el uso de ciertos plaguicidas, Ministerio de Agricultura." Boletín Oficial del Estado Núm 308.
- BOE (24 de Febrero de 2004). "RESOLUCIÓN de 6 de Febrero de 2004, por la que se hace público el Acuerdo del Consejo de Ministros de 6 de Febrero de 2004, por el que se amplían los límites del Parque Nacional de Doñana por incorporación de terrenos al mismo, Organismo Autónomo Parques Nacionales." Boletín Oficial del Estado Núm 47.
- BOE (27 de Octubre de 1969). "DECRETO 2412/1969, del 16 de Octubre, de creación del Parque Nacional de Doñana." Boletín Oficial del Estado Núm 257.
- Bogdal, C., M. Scheringer, et al. (2013). "Worldwide distribution of persistent organic pollutants in air, including results of air monitoring by passive air sampling in five continents." TrAC Trends in Analytical Chemistry **46**(0): 150-161.
- BOJA (25 de Noviembre de 1999). "Ley 8/1999, de 27 de Octubre, del Espacio Natural de Doñana." **Núm 137**.

- Bonilla-Valverde, D., J. Ruiz-Laguna, et al. (2004). "Evolution of biological effects of Aznalcóllar mining spill in the Algerian mouse (*Mus spretus*) using biochemical biomarkers." Toxicology **197**(2): 122-137.
- Breivik, K., A. Sweetman, et al. (2002). "Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners - a mass balance approach. 1. Global production and consumption." Science of the Total Environment **290**: 181 - 198.
- Brock, W. J., R. E. Schroeder, et al. (2010). "Oral repeat dose and reproductive toxicity of the chlorinated flame retardant Dechlorane Plus." International Journal of Toxicology **29**(6): 582-593.
- BSEF (2012). "Deca-BDE factsheet." Bromine Science and Environmental Forum.
- Buser, H.-R. and M. D. Mueller (1995). "Isomer-selective and enantiomer-selective determination of DDT and related compounds using chiral high-resolution gas chromatography/mass spectrometry and chiral HPLC." Analytical Chemistry **67**(15): 2691-2698.
- Camacho-Muñoz, D., J. Martín, et al. (2010). "Occurrence, temporal evolution and risk assessment of pharmaceutically active compounds in Doñana Park (Spain)." Journal of Hazardous Materials **183**(1-3): 602-608.
- Casanovas, J. (1996). Dioxinas y furanos: problemática ambiental y metodología analítica, Centro de Publicaciones, Ministerio de Obras Públicas, Transportes y Medio Ambiente.
- Christiansson, A., J. Eriksson, et al. (2009). "Identification and quantification of products formed via photolysis of decabromodiphenyl ether." Environmental Science and Pollution Research **16**(3): 312-321.
- Clement, R. and E. J. Reiner (2012). Chapter 15. Analysis of Persistent Halogenated Compounds: Chlorinated Dibenzo-p-dioxins and Chlorinated Dibenzofurans. Comprehensive Environmental Mass Spectrometry. A. T. Levedev: 329.
- Convenio de Estocolmo (2001). "Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants." <http://chm.pops.int>.
- Costa, L. G. and G. Giordano (2011). "Is decabromodiphenyl ether (BDE-209) a developmental neurotoxicant?" NeuroToxicology **32**(1): 9-24.
- Costa, L. G., G. Giordano, et al. (2008). "Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants: environmental contamination, human body burden and potential adverse health effects." Acta Bio Medica Atenei Parmensis **79**(3): 172-183.
- Crump, D., S. Chiu, et al. (2011). "The effects of Dechlorane Plus on toxicity and mRNA expression in chicken embryos: A comparison of *in vitro* and *in ovo* approaches." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **154**(2): 129-134.
- Darnerud, P. (2008). "Brominated flame retardants as possible endocrine disrupters." International Journal of Andrology **31**(2): 152-160.
- Darnerud, P. O. (2003). "Toxic effects of brominated flame retardants in man and in wildlife." Environment International **29**(6): 841.
- De Koning, S., H. G. Janssen, et al. (2009). "Modern methods of sample preparation for GC analysis." Chromatographia **69**(SUPPL. 1): S33-S78.
- De Voogt, P. and U. A. T. Brinkman (1989). CHAPTER 1 - Production, properties and usage of polychlorinated biphenyls. Halogenated Biphenyls, Terphenyls, Naphthalenes.

- Dibenzodioxins and Related Products (Second Edition). R. D. Kimbrough and A. A. Jensen. Amsterdam, Elsevier: 3-45.
- DeCarlo, V. J. (1979). "Studies on brominated chemicals in the environment." Annals of the New York Academy of Sciences **320**(1): 678-681.
- Del Río, M., R. Font, et al. (2002). "Heavy metals and arsenic uptake by wild vegetation in the Guadiamar river area after the toxic spill of the Aznalcóllar mine." Journal of Biotechnology **98**(1): 125-137.
- Delibes, M. and I. Adrián (1987). "Effects of crayfish introduction on Otter (*Lutra lutra*) food in the Doñana National Park, SW Spain." Biological Conservation **42**(2): 153-159.
- Drake, P., F. Baldó, et al. (1999). "Initial effects of the toxic waste spill (Aznalcóllar mine accident) on the aquatic macrofauna of the Guadalquivir Estuary." Science of The Total Environment **242**(1-3): 271-280.
- Drouillard, K. G. and R. J. Norstrom (2001). "Quantifying maternal and dietary sources of 2,2',4,4',5,5'Hexachlorobiphenyl deposited in eggs of the ring dove (*Streptopelia risoria*)." Environmental Toxicology and Chemistry **20**(3): 561-567.
- Erickson, M. and R. Kaley, II (2011). "Applications of polychlorinated biphenyls." Environmental Science and Pollution Research **18**(2): 135-151.
- Farré, M., S. Pérez, et al. (2010). "Green analytical chemistry in the determination of organic pollutants in the aquatic environment." TrAC Trends in Analytical Chemistry **29**(11): 1347-1362.
- Feo, M., E. Barón, et al. (2012). "Dechlorane Plus and related compounds in aquatic and terrestrial biota: a review." Analytical and Bioanalytical Chemistry **404**(9): 2625-2637.
- Fernández, J. A. (1982). Guía de campo del Parque Nacional de Doñana, Ed. Omega.
- Fernández, M. A., L. M. Hernández, et al. (1992). "Organochlorinated compounds and selected metals in waters and soils from Doñana National Park (Spain)." Water, Air, and Soil Pollution **65**(3-4): 293-305.
- Frame, G. (1997). "Peer Reviewed: Congener-Specific PCB Analysis." Analytical Chemistry **69**(15): 468A-475A.
- Frame, G. M., J. W. Cochran, et al. (1996). "Complete PCB congener distributions for 17 aroclor mixtures determined by 3 HRGC systems optimized for comprehensive, quantitative, congener-specific analysis." Journal of High Resolution Chromatography **19**(12): 657-668.
- Fundación Doñana21 (2013). "<http://www.donana.es/index.php>."
- Furness, R. W. (1993). Birds as monitors of pollutants. Birds As Monitors of Environmental Change.
- García-Luque, E., J. M. Forja, et al. (2003). "The behaviour of heavy metals from the Guadalquivir estuary after the Aznalcóllar mining spill: Field and laboratory surveys." Environmental Monitoring and Assessment **83**(1): 71-88.
- García-Sevillano, M. A., M. González-Fernández, et al. (2012). "Speciation of arsenic metabolites in the free-living mouse *Mus spretus* from Doñana National Park used as a bio-indicator for environmental pollution monitoring." Chemical Papers: 1-11.
- García, J. G., F. R. Fronczek, et al. (1991). "Tandem reverse-electron-demand diels-alder reactions of 1,5-cyclooctadiene." Tetrahedron letters **32**(28): 3289-3292.

- Geisz, H. N., R. M. Dickhut, et al. (2008). "Melting glaciers: a probable source of DDT to the Antarctic marine ecosystem." Environmental Science and Technology **42**(11): 3958-3962.
- Gómara, B. and M. J. González (2006). "Enantiomeric fractions and congener specific determination of polychlorinated biphenyls in eggs of predatory birds from Doñana National Park (Spain)." Chemosphere **63**(4): 662-669.
- Gómara, B., M. J. González, et al. (2008). "Unexpected high PCB and total DDT levels in the breeding population of red kite (*Milvus milvus*) from Doñana National Park, southwestern Spain." Environment International **34**(1): 73-78.
- Gómez, G., R. Baos, et al. (2004). "Influence of a mine tailing accident near Doñana National Park (Spain) on heavy metals and arsenic accumulation in 14 species of waterfowl (1998 to 2000)." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **47**(4): 521-529.
- González, L. M. and F. Hiraldo (1988). "Organochlorine and heavy metal contamination in the eggs of the Spanish Imperial Eagle (*Aquila (heliaca) adalberti*) and accompanying changes in eggshell morphology and chemistry." Environmental Pollution **51**(4): 241-258.
- González, M. J., M. Fernández, et al. (1990). "Influence of acid mine water in the distribution of heavy metal in soils of donana national park. Application of multivariate analysis." Environmental Technology **11**(11): 1027-1038.
- Grimalt, J. O., M. Ferrer, et al. (1999). "The mine tailing accident in Aznalcollar." Science of The Total Environment **242**(1-3): 3-11.
- Guerra, P., K. Fernie, et al. (2011). "Dechlorane Plus and related compounds in peregrine falcon (*Falco peregrinus*) eggs from Canada and Spain." Environmental Science and Technology **45**(4): 1284-1290.
- Guitart, R., R. Clavero, et al. (2005). "Levels of persistent organochlorine residues in eggs of greater flamingos from the Guadalquivir marshes (Doñana), Spain." Journal of Environmental Science and Health Part B **40**(5): 753-760.
- Halsall, C. J. (2004). "Investigating the occurrence of persistent organic pollutants (POPs) in the arctic: their atmospheric behaviour and interaction with the seasonal snow pack." Environmental Pollution **128**(1): 163-175.
- Hardy, M. (2002). "A comparison of the properties of the major commercial PBDPO/PBDE product to those of major PBB and PCB products." Chemosphere **46**(5): 717-728.
- Harrad, S. (2010). Persistent organic pollutants, Wiley Online Library.
- He, J., K. R. Robrock, et al. (2006). "Microbial reductive debromination of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs)." Environmental Science and Technology **40**(14): 4429-4434.
- Hernández, L. M., B. Gómara, et al. (1999). "Accumulation of heavy metals and As in wetland birds in the area around Doñana National Park affected by the Aznalcollar toxic spill." Science of The Total Environment **242**(1-3): 293-308.
- Hernandez, L. M., M. J. Gonzalez, et al. (1988). "Organochlorine and heavy metal residues in falconiforme and ciconiforme eggs (Spain)." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **40**(1): 86-93.
- Hernández, L. M., C. Rico, et al. (1987). "Residues of organochlorine chemicals and concentrations of heavy metals in ciconiforme eggs in relation to diet and habitat."

- Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes **22**(2): 245-258.
- Herzke, D., R. Kallenborn, et al. (2002). "Organochlorines in egg samples from Norwegian birds of prey: Congener-, isomer- and enantiomer specific considerations." Science of The Total Environment **291**(1-3): 59-71.
- Hites, R. A. (2006). "Brominated flame retardants in the Great Lakes". The Handbook of Environmental Chemistry, Springer. **5 N**: 355-390.
- Hoh, E., L. Zhu, et al. (2006). "Dechlorane Plus, a chlorinated flame retardant, in the Great Lakes." Environmental Science and Technology **40**(4): 1184-1189.
- Holm, L., A. Blomqvist, et al. (2006). "Embryonic exposure to *o,p'*-DDT causes eggshell thinning and altered shell gland carbonic anhydrase expression in the domestic hen." Environmental Toxicology and Chemistry **25**(10): 2787-2793.
- IARC-WHO (1997). "Occupational Exposures in Insecticide Application, and some Pesticides." Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans **53**.
- IARC-WHO (1997). "Polychlorinated Dibenzo-para-Dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans." Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans **69**.
- IDEE (2013). "Infraestructura de datos espaciales de España". Ministerio de Fomento. <http://www.idee.es>.
- Jensen, S. (1966). "Report of a new chemical hazard." New Scientist **32**: 612.
- Jones, K. C. and P. de Voogt (1999). "Persistent organic pollutants (POPs): state of the science." Environmental Pollution **100**(1-3): 209-221.
- Kaiser, K. L. (1978). "Pesticide report: The rise and fall of Mirex." Environmental Science and Technology **12**(5): 520-528.
- Kierkegaard, A., L. Asplund, et al. (2007). "Fate of higher brominated PBDEs in lactating cows." Environmental Science and Technology **41**(2): 417-423.
- Kruszyk, R. and M. Ciach (2010). "White Storks, *Ciconia ciconia*, forage on rubbish dumps in Poland—a novel behaviour in population." European Journal of Wildlife Research **56**(1): 83-87.
- Kulkarni, P. S., J. G. Crespo, et al. (2008). "Dioxins sources and current remediation technologies—a review." Environment International **34**(1): 139-153.
- La Guardia, M. J., R. C. Hale, et al. (2006). "Detailed polybrominated diphenyl ether (PBDE) congener composition of the widely used penta-, octa-, and deca-PBDE technical flame-retardant mixtures." Environmental Science and Technology **40**(20): 6247-6254.
- Lauby-Secretan, B., D. Loomis, et al. (2013). "Carcinogenicity of polychlorinated biphenyls and polybrominated biphenyls." The Lancet Oncology(0).
- Law, R. J., C. R. Allchin, et al. (2006). "Levels and trends of brominated flame retardants in the European environment." Chemosphere **64**(2): 187-208.
- Li, N., F. Wania, et al. (2003). "A comprehensive and critical compilation, evaluation, and selection of physical-chemical property data for selected polychlorinated biphenyls." Journal of Physical and Chemical Reference Data **32**(4): 1545-1590.
- Li, Y., L. Yu, et al. (2013). "Accumulation pattern of Dechlorane Plus and associated biological effects on rats after 90d of exposure." Chemosphere **90**(7): 2149-2156.
- Li, Y., L. Yu, et al. (2013). "Accumulation and effects of 90-day oral exposure to dechlorane plus in quail (*Coturnix coturnix*)." Environmental Toxicology and Chemistry.



- Lin, T., Z. Hu, et al. (2009). "Levels and mass burden of DDTs in sediments from fishing harbors: the importance of DDT-containing antifouling paint to the coastal environment of China." Environmental Science and Technology **43**(21): 8033-8038.
- Madejón, P., J. M. Murillo, et al. (2006). "Accumulation of As, Cd and selected trace elements in tubers of *Scirpus maritimus* L. from Doñana marshes (South Spain)." Chemosphere **64**(5): 742-748.
- Mandal, P. (2005). "Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology." Journal of Comparative Physiology B **175**(4): 221-230.
- Martín-Calero, A., V. Pino, et al. (2011). "Ionic liquids as a tool for determination of metals and organic compounds in food analysis." TrAC Trends in Analytical Chemistry **30**(10): 1598-1619.
- Mateo, R., R. Cadenas, et al. (2001). "Lead shot ingestion in two raptor species from Doñana, Spain." Ecotoxicology and Environmental Safety **48**(1): 6-10.
- Mateo, R., A. J. Green, et al. (2007). "Lead poisoning in wild birds from southern Spain: A comparative study of wetland areas and species affected, and trends over time." Ecotoxicology and Environmental Safety **66**(1): 119-126.
- Mateo, R., J. Millán, et al. (2012). "Levels of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in the critically endangered Iberian lynx and other sympatric carnivores in Spain." Chemosphere **86**(7): 691-700.
- Mechlińska, A., L. Wolska, et al. (2010). "Isotope-labeled substances in analysis of persistent organic pollutants in environmental samples." TrAC Trends in Analytical Chemistry **29**(8): 820-831.
- Meharg, A. A., D. Osborn, et al. (1999). "Contamination of Doñana food-chains after the Aznalcóllar mine disaster." Environmental Pollution **105**(3): 387-390.
- Meharg, A. A., D. J. Pain, et al. (2002). "Isotopic identification of the sources of lead contamination for white storks (*Ciconia ciconia*) in a marshland ecosystem (Doñana, S.W. Spain)." Science of The Total Environment **300**(1-3): 81-86.
- Millán, J., R. Mateo, et al. (2008). "Levels of heavy metals and metalloids in critically endangered Iberian lynx and other wild carnivores from Southern Spain." Science of The Total Environment **399**(1-3): 193-201.
- Molina, B., J. C. del Moral, et al. (2006). La Cigüeña blanca en España: VI censo internacional (2004), SEO/BirdLife.
- Molina, B. D. M., J. C. (2005). La Cigüeña Blanca en España. VI Censo Internacional (2004). . Seguimiento de Aves. SEO/BirdLife. Madrid, SEO/BirdLife. **4**.
- Möller, A., Z. Xie, et al. (2012). "Brominated flame retardants and dechlorane plus in the marine atmosphere from Southeast Asia toward Antarctica." Environmental Science and Technology **46**(6): 3141-3148.
- Muir, D. C. G. and P. H. Howard (2006). "Are there other persistent organic pollutants? A challenge for environmental chemists." Environmental Science and Technology **40**(23): 7157-7166.
- Negro, J. J., J. A. Donázar, et al. (1993). "Organochlorine and heavy metal contamination in non-viable eggs and its relation to breeding success in a Spanish population of Lesser Kestrels (*Falco naumanni*)." Environmental Pollution **82**(2): 201-205.

- Negro, J. J., J. L. Tella, et al. (2000). "Diet explains interpopulation variation of plasma carotenoids and skin pigmentation in nestling white storks." Physiological and Biochemical Zoology **73**(1): 97-101.
- Nylund, K., L. Asplund, et al. (1992). "Analysis of some polyhalogenated organic pollutants in sediment and sewage sludge." Chemosphere **24**(12): 1721-1730.
- OxyChem (2007). "Dechlorane Plus® Manual." [http://www.oxy.com/oxychem/Products/dechlorane\\_plus/literature/dechlorane\\_plus.pdf](http://www.oxy.com/oxychem/Products/dechlorane_plus/literature/dechlorane_plus.pdf)
- Pain, D. J., A. Meharg, et al. (2003). "Levels of cadmium and zinc in soil and plants following the toxic spill from a pyrite mine, Aznalcollar, Spain." Ambio **32**(1): 52-57.
- Pain, D. J., A. Sánchez, et al. (1998). "The Doñana ecological disaster: Contamination of a world heritage estuarine marsh ecosystem with acidified pyrite mine waste." Science of The Total Environment **222**(1-2): 45-54.
- Pakalin, S., T. Cole, et al. (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." European Commission, Directorate General Joint Research Center, European Chemicals Bureau.
- Parslow, J., D. Jefferies, et al. (1972). "Ingested pollutants in puffins and their eggs." Bird Study **19**(1): 18-33.
- Pastor, N., R. Baos, et al. (2004). "A 4 year follow-up analysis of genotoxic damage in birds of the Doñana area (south west Spain) in the wake of the 1998 mining waste spill." Mutagenesis **19**(1): 61-65.
- Peakall, D., T. Cade, et al. (1975). "Organochlorine residues in Alaskan peregrines." Pesticides monitoring journal **8**(4): 255.
- Peakall, D. B. (1993). "DDE-induced eggshell thinning: an environmental detective story." Environmental Reviews **1**(1): 13-20.
- Peris, S. J. (2003). "Feeding in urban refuse dumps: ingestion of plastic objects by the White Stork (*Ciconia ciconia*)." Ardeola **50**(1): 81-84.
- Petrovic, M., M. Farré, et al. (2010). "Recent trends in the liquid chromatography-mass spectrometry analysis of organic contaminants in environmental samples." Journal of Chromatography A **1217**(25): 4004-4017.
- Qiu, X., T. Zhu, et al. (2005). "Contribution of dicofol to the current DDT pollution in China." Environmental Science and Technology **39**(12): 4385-4390.
- Querol, X., A. Alastuey, et al. (2000). "Levels and chemistry of atmospheric particulates induced by a spill of heavy metal mining wastes in the Donana area, Southwest Spain." Atmospheric Environment **34**(2): 239-253.
- Rahman, F., K. H. Langford, et al. (2001). "Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants." Science of The Total Environment **275**(1-3): 1-17.
- Ramos, L. (2009). Comprehensive two dimensional gas chromatography, Elsevier.
- Ramos, L. (2012). "Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques." Journal of Chromatography A **1221**: 84-98.
- Ramos, L., L. M. Hernández, et al. (1994). "Sequential fractionation of copper, lead, cadmium and zinc in soils from or near Donana National Park." Journal of Environmental Quality **23**(1): 50-57.

- Ramos, L., J. J. Ramos, et al. (2005). "Miniaturization in sample treatment for environmental analysis." Analytical and Bioanalytical Chemistry **381**(1): 119-140.
- Ratcliffe, D. A. (1967). "Decrease in eggshell weight in certain birds of prey."
- Red de Parques Nacionales. Ministerio de Agricultura, A. y. M.
- Ren, N., E. Sverko, et al. (2008). "Levels and Isomer Profiles of Dechlorane Plus in Chinese Air." Environmental Science and Technology **42**(17): 6476-6480.
- Rendón, M. A., A. J. Green, et al. (2008). "Status, distribution and long-term changes in the waterbird community wintering in Doñana, south-west Spain." Biological Conservation **141**(5): 1371-1388.
- Rendón, M. A., M. Rendón-Martos, et al. (2011). "Greater flamingos *Phoenicopterus roseus* are partial capital breeders." Journal of Avian Biology **42**(3): 210-213.
- Richardson, S. D. (2010). "Environmental mass spectrometry: emerging contaminants and current issues." Analytical Chemistry **82**(12): 4742-4774.
- Ricking, M. and J. Schwarzbauer (2012). "DDT isomers and metabolites in the environment: an overview." Environmental Chemistry Letters **10**(4): 317-323.
- Ridgway, K., S. P. D. Lalljie, et al. (2007). "Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods." Journal of Chromatography A **1153**(1-2): 36-53.
- Risebrough, R. W. (1986). Pesticides and bird populations. Current ornithology, Springer: 397-427.
- Ruiz-Aceituno, L., M. L. Sanz, et al. (2013). "Use of ionic liquids in analytical sample preparation of organic compounds from food and environmental samples." TrAC - Trends in Analytical Chemistry **43**: 121-145.
- Russell, R. W., F. A. Gobas, et al. (1999). "Maternal transfer and in ovo exposure of organochlorines in oviparous organisms: A model and field verification." Environmental Science and Technology **33**(3): 416-420.
- Safe, S. H. (1994). "Polychlorinated biphenyls (PCBs): Environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment." Critical Reviews in Toxicology **24**(2): 87-149.
- Salamova, A. and R. A. Hites (2013). "Brominated and chlorinated flame retardants in tree bark from around the globe." Environmental Science and Technology **47**(1): 349-354.
- Sánchez-Chardi, A., C. A. O. Ribeiro, et al. (2009). "Metals in liver and kidneys and the effects of chronic exposure to pyrite mine pollution in the shrew *Crocidura russula* inhabiting the protected wetland of Doñana." Chemosphere **76**(3): 387-394.
- Sánchez López, F. J., M. D. García, et al. (2004). "Assessment of metal contamination in Doñana national park (Spain) using crayfish (*Procambarus clarkii*)." Environmental Monitoring and Assessment **93**(1-3): 17-29.
- Santos, F. J. and M. T. Galceran (2003). "Modern developments in gas chromatography-mass spectrometry-based environmental analysis." Journal of Chromatography A **1000**(1-2): 125-151.
- Schechter, A. (2012). Dioxins and Health Including Other Persistent Organic Pollutants and Endocrine Disruptors, Wiley.
- Schechter, A., L. Birnbaum, et al. (2006). "Dioxins: An overview." Environmental Research **101**(3): 419-428.

- Scheringer, M. (2004). "Persistent Organic Pollutants (POPs) in the Focus of Science and Politics." Environmental Science and Pollution Research **11**(1): 1-2.
- Schmid, P., C. Bogdal, et al. (2010). "The Missing Piece: Sediment Records in Remote Mountain Lakes Confirm Glaciers Being Secondary Sources of Persistent Organic Pollutants." Environmental Science and Technology **45**(1): 203-208.
- Seegal, R. F. (1996). "Epidemiological and Laboratory Evidence of PCB-Induced Neurotoxicity." Critical Reviews in Toxicology **26**(6): 709-737.
- Shaw, S. (2010). "Halogenated flame retardants: do the fire safety benefits justify the risks?" Reviews on Environmental Health **25**(4): 261-306.
- Shen, L., K. J. Jobst, et al. (2012). "Identification and determination of the dechlorination products of Dechlorane 602 in Great Lakes fish and Arctic beluga whales by gas chromatography-high resolution mass spectrometry." Analytical and Bioanalytical Chemistry **404**(9): 2737-2748.
- Söderström, G., U. Sellström, et al. (2004). "Photolytic debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209)." Environmental Science and Technology **38**(1): 127-132.
- Srogi, K. (2007). "Overview of analytical methodologies for dioxin analysis." Analytical letters **40**(9): 1647-1671.
- Stapleton, H. M., B. Brazil, et al. (2006). "In vivo and in vitro debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209) by juvenile rainbow trout and common carp." Environmental Science and Technology **40**(15): 4653-4658.
- Sverko, E., G. T. Tomy, et al. (2007). "Dechlorane plus levels in sediment of the lower Great Lakes." Environmental Science and Technology **42**(2): 361-366.
- Sverko, E., G. T. Tomy, et al. (2011). "Dechlorane plus and related compounds in the environment: a review." Environmental Science and Technology **45**(12): 5088-5098.
- Taggart, M. A., M. Carlisle, et al. (2004). "The distribution of arsenic in soils affected by the Aznalcóllar mine spill, SW Spain." Science of The Total Environment **323**(1-3): 137-152.
- Taggart, M. A., J. Figuerola, et al. (2006). "After the Aznalcóllar mine spill: Arsenic, zinc, selenium, lead and copper levels in the livers and bones of five waterfowl species." Environmental Research **100**(3): 349-361.
- Tokarz, J., M. Ahn, et al. (2008). "Reductive debromination of polybrominated diphenyl ethers in anaerobic sediment and a biomimetic system." Environmental Science and Technology **42**: 1157 - 1164.
- Tomy, G. T., K. Pleskach, et al. (2007). "Isomers of dechlorane plus in Lake Winnipeg and Lake Ontario food webs." Environmental Science and Technology **41**(7): 2249-2254.
- Tomy, G. T., E. Sverko, et al. (2013). "Dechlorane plus monoadducts in a lake ontario (Canada) food web and biotransformation by lake trout (*Salvelinus namaycush*) liver microsomes." Environmental Toxicology and Chemistry **32**(6): 1376-1381.
- Tortosa, F. S., J. M. Caballero, et al. (2002). "Effect of rubbish dumps on breeding success in the White Stork in Southern Spain." Waterbirds **25**(1): 39-43.
- Tortosa, F. S., L. Pérez, et al. (2003). "Effect of food abundance on laying date and clutch size in the White Stork *Ciconia ciconia*: Food independently affects both laying date and clutch size, suggesting that seasonal decline in clutch size is related to a decrease in food availability." Bird Study **50**(2): 112-115.

- Turiel, E. and A. Martín-Esteban (2010). "Molecularly imprinted polymers for sample preparation: A review." Analytica Chimica Acta **668**(2): 87-99.
- Turusov, V., V. Rakitsky, et al. (2002). "Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): ubiquity, persistence, and risks." Environmental Health Perspectives **110**(2): 125.
- Udroiu, I., M. Cristaldi, et al. (2008). "Biomonitoring of Doñana National Park using the Algerian mouse (*Mus spretus*) as a sentinel species." Fresenius Environmental Bulletin **17**(9 B): 1519-1525.
- UNEP (2005). "Ridding the World of POPs: A Guide to the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants." United Nations Environment Programme Chemicals (UNEP).
- USEPA (2009). "High Production Volume (HPV) Challenge." U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) <http://www.epa.gov/hpv/pubs/summaries/dechlorp/c15635tc.htm>.
- USEPA (2009). "Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) Action Plan." U.S. Environmental Protection Agency (USEPA).
- USEPA (2011). "Cancellation Orders for Certain Pesticide Registrations: Dicofol. EPA-HQ-OPP-2005-0220." U.S. Environmental Protection Agency (USEPA).
- USEPA (2011). "Screening-level hazard characterization Dechlorane Plus® (CASRN 13560-89-9)." U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) Hazard Characterization Document.
- Van den Berg, M., L. Birnbaum, et al. (1998). "Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife." Environmental Health Perspectives **106**(12): 775.
- Van den Berg, M., L. S. Birnbaum, et al. (2006). "The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds." Toxicological Sciences **93**(2): 223-241.
- Van den Steen, E., V. L. B. Jaspers, et al. (2008). "Variation, levels and profiles of organochlorines and brominated flame retardants in great tit (*Parus major*) eggs from different types of sampling locations in Flanders (Belgium)." Environment International **34**(2): 155-161.
- van der Hoff, G. R. and P. van Zoonen (1999). "Trace analysis of pesticides by gas chromatography." Journal of Chromatography A **843**(1): 301-322.
- van Leeuwen, S. P. J. and J. de Boer (2008). "Advances in the gas chromatographic determination of persistent organic pollutants in the aquatic environment." Journal of Chromatography A **1186**(1-2): 161-182.
- Verreault, J., G. W. Gabrielsen, et al. (2010). "The Svalbard glaucous gull as bioindicator species in the European arctic: Insight from 35 years of contaminants research." D. M. Whitacre. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. **205**: 77-116.
- Verreault, J., R. A. Villa, et al. (2006). "Maternal transfer of organohalogen contaminants and metabolites to eggs of Arctic-breeding glaucous gulls." Environmental Pollution **144**(3): 1053-1060.
- Wang, D.-G., M. Yang, et al. (2010). "An Asia-specific source of Dechlorane Plus: Concentration, isomer profiles, and other related compounds." Environmental Science and Technology **44**(17): 6608-6613.

- Wang, F., J. Wang, et al. (2010). "Comparative tissue distribution, biotransformation and associated biological effects by decabromodiphenyl ethane and decabrominated diphenyl ether in male rats after a 90-day oral exposure study." Environmental Science and Technology **44**(14): 5655-5660.
- Wang, F. C.-Y. (2000). "Polymer additive analysis by pyrolysis-gas chromatography: II. Flame retardants." Journal of Chromatography A **886**(1-2): 225-235.
- Wang, S., J. Huang, et al. (2013). "Photodegradation of Dechlorane Plus in n-nonane under the irradiation of xenon lamp." Journal of Hazardous Materials **260**: 16-23.
- Weem, A. P. (2010). "Exploration of management options for Dicofol." VROM, Ministry of Environment, The Netherlands.
- WHO (1984). "International Program on Chemical Safety. ." Environmental Health Criteria **44**: mirex.
- WHO (2003). "Polychlorinated Biphenyls: Human Health Aspects." International Programme on Chemical Safety (IPCS) Document 55.
- WHO (2011). "The use of DDT in malaria vector control." WHO/HTM/GMP/2011.
- Wu, J.-P., Y. Zhang, et al. (2010). "Isomer-specific bioaccumulation and trophic transfer of Dechlorane Plus in the freshwater food web from a highly contaminated site, South China." Environmental Science and Technology **44**(2): 606-611.
- Xian, Q., S. Siddique, et al. (2011). "Sources and environmental behavior of dechlorane plus — A review." Environment International **37**(7): 1273-1284.
- Xu, W., X. Wang, et al. (2013). "Analytical chemistry of the persistent organic pollutants identified in the Stockholm Convention: A review." Analytica Chimica Acta **790**(0): 1-13.
- Yue, C. and L. Y. Li (2013). "Filling the gap: Estimating physicochemical properties of the full array of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs)." Environmental Pollution.
- Zhang, X.-L., X.-J. Luo, et al. (2010). "Bioaccumulation of several brominated flame retardants and dechlorane plus in waterbirds from an e-waste recycling region in South China: associated with trophic level and diet sources." Environmental Science and Technology **45**(2): 400-405.
- Zhang, Y., J. P. Wu, et al. (2011). "Tissue distribution of Dechlorane Plus and its dechlorinated analogs in contaminated fish: High affinity to the brain for anti-DP." Environmental Pollution **159**(12): 3647-3652.
- Zheng, J., J. Wang, et al. (2010). "Dechlorane Plus in human hair from an e-waste recycling area in South China: comparison with dust." Environmental Science and Technology **44**(24): 9298-9303.

*Capítulo 3*

*Análisis y Determinación de DDTs en el  
Entorno de Doñana*





## 3.1. INTRODUCCIÓN

---

La detección del DDT ha sido un hecho recurrente, pese a su prohibición en España en 1977, habiéndose mostrado a lo largo de la geografía española a través de numerosos estudios de monitorización en diferentes matrices. Aunque, en general, sus niveles medioambientales parecen haber descendido en los últimos 30 años, a día de hoy este insecticida y sus metabolitos de degradación se detectan aún en todo tipo de muestras tanto abióticas (Ormad, Ratia et al. 2008; Hildebrandt, Lacorte et al. 2009) como bióticas (Mañosa, Mateo et al. 2003; García-Fernández, Calvo et al. 2008), y en algunos casos sin observar declives claros en sus concentraciones.

Concretamente, en relación al Espacio Natural de Doñana, ya desde la década de los años 70 se detectaron niveles altos de este insecticida en el Parque Nacional y en su entorno (Baluja, Murado et al. 1977; Baluja y Hernández 1978), justificados en base al marcado carácter agrícola asociado a esta región. En la década de los años 80 y 90, y debido a su regulación a finales de los 70, la presencia del DDT fue detectada con una tendencia de paulatino descenso (Albaigés, Algaba et al. 1987; Rico, Hernández et al. 1989; Fernández, Hernández et al. 1992). Sin embargo, a principios de los años 2000 en huevos infértiles de milano real (*Milvus milvus*) del área de Doñana, se detectaron niveles inesperadamente altos de este insecticida y de sus productos de degradación (Gómara, González et al. 2008). Esto, junto con la detección de cantidades anormalmente elevadas en suelos de la Rábida, provincia de Huelva (Abad y Ramos 2005) motivaron la investigación en la presente tesis doctoral de un posible uso ilegal de este pesticida, así como la dilucidación de su posible origen como subproducto asociado al acaricida dicofol. El empleo de este último ha estado permitido en España y en toda la Unión Europea hasta el 2009, y de manera específica con aplicación en varios de los cultivos abundantes en áreas pertenecientes y circundantes al END como son los cítricos, el algodón y las fresas (Weem 2010).

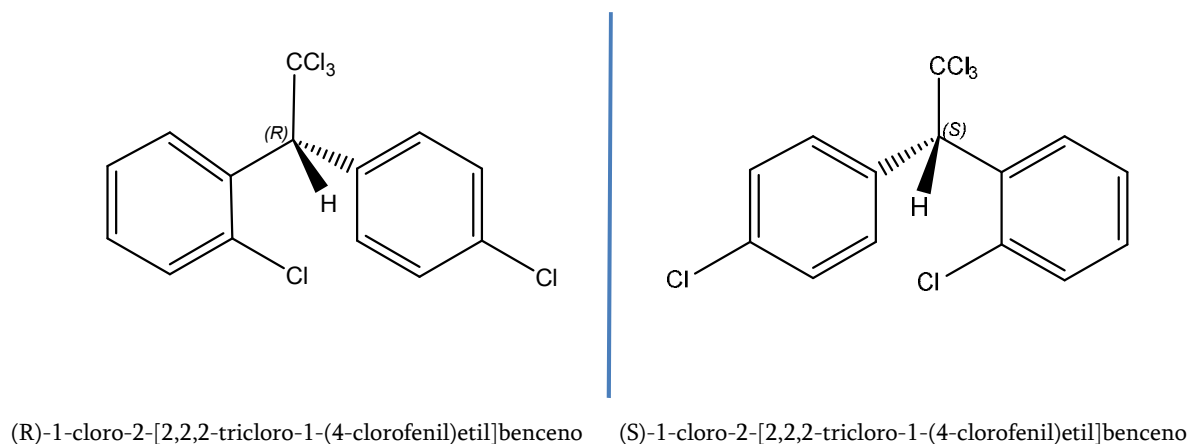
Para abordar el estudio de la posible datación y origen del DDT en muestras de suelos de cultivos del Espacio Natural de Doñana y de su Comarca se hizo imprescindible la determinación analítica de todas las formas isómeras del DDT, DDE y

DDD (cuyas estructuras se han mostrado en la Figura 2.2 de la sección 2.1.2), a la par que la determinación de las formas enantioméricas del *o,p'*-DDT. Por un lado y debido a la degradación del DDT en sus principales metabolitos DDE y DDD, clásicamente se ha utilizado como índice para la detección de usos recientes de DDT el estudio de la relación  $[p,p'\text{-DDE}]/[p,p'\text{-DDT}]$  o más correctamente:

$$R_{p,p'/p,p'} = \frac{[p,p'\text{-DDE}] + [p,p'\text{-DDD}]}{[p,p'\text{-DDT}]}$$

Así, índices mayores a 1 estarían relacionados con usos pasados del DDT mientras que valores próximos e inferiores a 1 denotarían un uso reciente del insecticida (Harner, Wideman et al. 1999; Holoubek, Dušek et al. 2009).

Por otro lado, también puede proporcionar información complementaria en la datación del DDT el análisis del *o,p'*-DDT que, aun siendo una forma minoritaria del DDT en sus formulaciones técnicas, suele representar proporciones tan altas como un  $\approx 15\%$  del contenido de las mismas. El *o,p'*-DDT presenta un centro quiral y por ende existe en las formulaciones técnicas como una mezcla racémica de los dos enantiómeros mostrados en la Figura 3.1.



**Figura 3.1.** Estructuras y nombres IUPAC de los dos enantiómeros del *o,p'*-DDT.

Las formas *R* y *S* de cualquier enantiómero presentan las mismas propiedades físico-químicas, siendo en cambio susceptibles de ser degradadas de forma diferencial microbiológicamente o a través de procesos metabólicos en organismos superiores (Ali, Gupta et al. 2003). Consecuentemente el enriquecimiento de una de las formas enantioméricas puede, en principio, correlacionarse en mayor o menor medida con el tiempo de exposición medioambiental (Bidleman y Falconer 1999) y proporcionar información adicional a la obtenida a partir de la relación  $R_{p,p'/p,p'}$  descrita anteriormente.

Generalmente la forma más recomendada actualmente para expresar enriquecimientos enantioméricos es la llamada fracción enantiomérica o EF (Geus, Wester et al. 2000), la cual se define según la relación:

$$EF = \frac{\text{Area del pico correspondiente al primer enantiómero eluido}}{\text{Area suma de los picos correspondientes a los dos enantiómeros}}$$

El valor de una EF está comprendido entre los límites de 0 y 1, correspondientes a las situaciones en la que uno u otro enantiómero no se detectara. El valor de 0,5 corresponde por tanto al valor de una mezcla racémica de ambos enantiómeros.

Asimismo, es importante saber que los residuos de *o,p'*-DDT pueden no sólo provenir del uso del DDT técnico sino también del empleo de dicofol, en donde esta forma isomérica ha sido identificada como una de las principales impurezas presentes en el mismo (Turgut, Gokbulut et al. 2009). Por ello, el estudio de la relación:

$$R_{o,p'/p,p'} = \frac{[o,p'-DDT]}{[p,p'-DDT]}$$

puede ser una herramienta de utilidad para evaluar si el origen de este insecticida está más ligado a un uso ilegal del mismo o si por el contrario predomina la contribución del dicofol (prohibido en España en 2009). Así, mientras  $R_{o,p'/p,p'}$  en el DDT técnico es de 0,19 aproximadamente, la  $R_{o,p'/p,p'}$  para el dicofol ha sido descrita en un amplio intervalo de valores de entre 0,2 hasta 7 (Qiu, Zhu et al. 2005; Turgut, Gokbulut et al. 2009).

En consecuencia, para llevar a cabo este estudio de la determinación analítica del DDT en el END y su entorno, es fundamental disponer de la instrumentación adecuada y desarrollar los métodos capaces de separar y cuantificar las distintas formas isómeras de los DDTs así como las formas enantioméricas del *o,p'*-DDT.

El análisis de los isómeros del DDT, DDE y DDD por cromatografía de gases (GC) acoplada a detectores de captura de electrones o más actualmente a espectrómetros de masas, no representa a día de hoy ningún problema y ha sido ampliamente descrito en la bibliografía con columnas apolares de fase estacionaria generalmente de tipo 5% fenil — 95% dimetilpolisiloxano (van der Hoff y van Zoonen 1999; Santos y Galcerán 2002). A pesar de ello, el DDT, al ser una especie relativamente termolábil con tendencia a descomponerse en DDE y/o DDD especialmente en el inyector de un cromatógrafo de gases (Foreman y Gates 1997), presenta algunos problemas por lo que es recomendable emplear para su análisis un inyector on-column, o de lo contrario hacerlo a temperaturas relativamente frías mediante el empleo de inyectores PTV (Programmed Temperature Vaporization). Independientemente de esto, la EPA de E.E.U.U sugiere controlar la degradación del DDT en el puerto de inyección y mantenerla siempre por debajo del 15%, haciendo uso de una temperatura de inyección apropiada y conservando el liner o inserto en el inyector en condiciones de limpieza adecuadas (USEPA 1996).

Por otro lado, la separación, aparentemente sencilla, de las formas enantioméricas del *o,p'*-DDT es muy complicada por diversas razones. Por una parte, se requiere de columnas de una fase estacionaria quiral adecuada que permita resolver cada enantiómero. Este tipo de columnas suelen tener un intervalo de temperaturas de operación mucho más limitado que aquellas con fases convencionales como la previamente citada. Como resultado, este tipo de separaciones en muestras reales puede verse muy dificultada en primer lugar por los bajos niveles esperados de cada enantiómero, y en segundo lugar por las probables coeluciones con los múltiples componentes de la matriz (Schurig 2002; Eljarrat, Guerra et al. 2008). Es por ello, que, en la separación y análisis directo (sin derivatización) del *o,p'*-DDT y otros compuestos quirales, la cromatografía de gases multidimensional (MDGC) en su modalidad *heart-cutting* ha sido una poderosa herramienta aplicada con éxito a muestras medioambientales (De Alencastro, Grandjean et al. 2003; Eljarrat, Guerra et al. 2008). La

MDGC se basa en la utilización de dos columnas que actúan como dos dimensiones distintas y complementarias al presentar mecanismos de separación diferenciados (ortogonales). La coelución entre los analitos de interés que no es resuelta en la primera dimensión es transferida a la segunda, en donde puede resolverse al actuar un mecanismo de separación distinto. Típicamente, en el análisis de compuestos quirales, fases estacionarias aquirales de mayor robustez y capaces de soportar temperaturas más elevadas son utilizadas en la primera dimensión con objeto de alcanzar la mayor separación posible de un analito quiral de la matriz y del resto de componentes de una muestra. Una vez identificada la elución del analito quiral en la primera dimensión – existiendo o no coelución con otros compuestos–, ésta se transfiere en una segunda inyección a la segunda dimensión, en donde, a temperaturas más suaves, una columna con una fase estacionaria quiral puede ser capaz de separar dicho analito en sus enantiómeros.

Con objeto de estudiar la presencia y datación del DDT en el Espacio Natural de Doñana y su Comarca se han desarrollado y aplicado diferentes metodologías analíticas que han dado lugar a las dos publicaciones científicas que se presentan en este capítulo.

## REFERENCIAS

- Abad, E. and J. L. Ramos (2005). "Diagnóstico de la calidad ambiental de la ría de Huelva." Dirección General de Prevención y Calidad Ambiental. Consejería de Medio Ambiente de La Junta de Andalucía y CSIC.
- Albaigés, J., J. Algaba, et al. (1987). "Budget of organic and inorganic pollutants in the Donana National Park (Spain)." Science of The Total Environment **Vol. 63**: 13-28.
- Ali, I., V. Gupta, et al. (2003). "Chirality: a challenge for the environmental scientists." Current Science **84**(2): 152-156.
- Baluja, G. and L. M. Hernández (1978). "Organochloride pesticide and PCB residues in wild bird eggs from the South-West of Spain." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **19**(6): 655-664.
- Baluja, G., M. Murado, et al. (1977). "Organochlorine pesticides and PCBs distribution in tissues of Purple Heron and Spoon Duck from the Biological Reserve of Doñana (Spain)." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **17**(5): 603-612.
- Bidleman, T. F. and R. L. Falconer (1999). "Peer reviewed: using enantiomers to trace pesticide emissions." Environmental Science and Technology **33**(9): 206A-209A.

- De Alencastro, L. F., D. Grandjean, et al. (2003). "Application of multidimensional (heart-cut) gas chromatography to the analysis of complex mixtures of organic pollutants in environmental samples." CHIMIA International Journal for Chemistry **57**(9): 499-504.
- Eljarrat, E., P. Guerra, et al. (2008). "Enantiomeric determination of chiral persistent organic pollutants and their metabolites." TrAC Trends in Analytical Chemistry **27**(10): 847-861.
- Fernández, M. A., L. M. Hernández, et al. (1992). "Organochlorinated compounds and selected metals in waters and soils from Doñana National Park (Spain)." Water, Air, and Soil Pollution **65**(3-4): 293-305.
- Foreman, W. T. and P. M. Gates (1997). "Matrix-enhanced degradation of *p,p'*-DDT during gas chromatographic analysis: A consideration." Environmental Science and Technology **31**(3): 905-910.
- García-Fernández, A. J., J. F. Calvo, et al. (2008). "Raptor ecotoxicology in Spain: A review on persistent environmental contaminants." Ambio **37**(6): 432-439.
- Geus, H.-J. d., P. G. Wester, et al. (2000). "Enantiomer fractions instead of enantiomer ratios." Chemosphere **41**(5): 725-727.
- Gómara, B., M. J. González, et al. (2008). "Unexpected high PCB and total DDT levels in the breeding population of red kite (*Milvus milvus*) from Doñana National Park, south-western Spain." Environment International **34**(1): 73-78.
- Harner, T., J. Wideman, et al. (1999). "Residues of organochlorine pesticides in Alabama soils." Environmental Pollution **106**(3): 323-332.
- Hildebrandt, A., S. Lacorte, et al. (2009). "Occurrence and Fate of Organochlorinated Pesticides and PAH in Agricultural Soils from the Ebro River Basin." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **57**(2): 247-255.
- Holoubek, I., L. Dušek, et al. (2009). "Soil burdens of persistent organic pollutants—Their levels, fate and risk. Part I. Variation of concentration ranges according to different soil uses and locations." Environmental Pollution **157**(12): 3207-3217.
- Mañosa, S., R. Mateo, et al. (2003). "Persistent organochlorine contaminants in eggs of northern goshawk and Eurasian buzzard from northeastern Spain: temporal trends related to changes in the diet." Environmental Pollution **122**(3): 351-359.
- Ormad, M. P., J. S. Ratia, et al. (2008). "Levels and distribution of DDT in the Cinca River (Spain)." Water Environment Research **80**(5): 464-471.
- Qiu, X., T. Zhu, et al. (2005). "Contribution of dicofol to the current DDT pollution in China." Environmental Science and Technology **39**(12): 4385-4390.
- Rico, M., L. Hernández, et al. (1989). "Organochlorine contamination in water of the Doñana National Park." Water Research **23**(1): 57-60.
- Santos, F. J. and M. T. Galcerán (2002). "The application of gas chromatography to environmental analysis." TrAC Trends in Analytical Chemistry **21**(9): 672-685.
- Schurig, V. (2002). "Chiral separations using gas chromatography." TrAC Trends in Analytical Chemistry **21**(9): 647-661.
- Turgut, C., C. Gokbulut, et al. (2009). "Contents and sources of DDT impurities in dicofol formulations in Turkey." Environmental Science and Pollution Research **16**(2): 214-217.
- USEPA (1996). "Method 8081 Organochlorine pesticides by gas chromatography." U.S. Environmental Protection Agency (USEPA).

- van der Hoff, G. R. and P. van Zoonen (1999). "Trace analysis of pesticides by gas chromatography." Journal of Chromatography A **843**(1): 301-322.
- Weem, A. P. (2010). "Exploration of management options for Dicofol." VROM, Ministry of Environment, The Netherlands.

## 3.2. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA DE GASES MULTIDIMENSIONAL EN SU MODALIDAD HEART-CUTTING PARA LA DETERMINACIÓN DEL *o,p'*-DDT

---

Tal y como se ha expuesto con anterioridad, los valores de las EF del *o,p'*-DDT pueden proporcionar información relevante en términos de datación de la contaminación por DDT en muestras reales. Sin embargo, la separación y determinación de los enantiómeros del *o,p'*-DDT por GC monodimensional conlleva una gran dificultad por las limitaciones de temperatura inherentes a la utilización de fases de separación quirales, así como por los bajos niveles esperados de cada enantiómero. Por el contrario, la cromatografía de gases multidimensional (MDGC) en su modalidad *heart-cutting* se presenta como una alternativa adecuada para la citada determinación.

El objetivo principal de este trabajo fue el desarrollo y optimización de un método de separación y análisis de los enantiómeros del *o,p'*-DDT mediante *heart-cutting* MDGC con detección de captura de electrones (ECD), capaz de alcanzar y mantener reducidos niveles de degradación de las especies estudiadas que redundasen en unos bajos límites de detección de las mismas a la par que en unos buenos valores de repetibilidad y reproducibilidad.

En el desarrollo del método se comparó la eficacia de dos columnas con fases estacionarias quirales distintas de 30 metros (BGB-172 y BGB-176SE) en la segunda dimensión, encontrándose que sólo la BGB-172 era capaz de separar los dos enantiómeros del *o,p'*-DDT a la vez que resolvía la coelución que se producía entre los mismos y el *p,p'*-DDD en la primera dimensión. Eligiendo la combinación de columnas DB-5 (aquiral) y BGB-172 (quiral) con mecanismos de separación ortogonal para la primera y segunda dimensión, respectivamente, se optimizaron las correspondientes rampas de temperatura para favorecer la separación en ambas dimensiones y minimizar el tiempo de análisis. A continuación se optimizó el proceso de inyección de la muestra,



eligiendo un volumen de inyección de 4  $\mu\text{L}$  y empleando un inyector de tipo PTV con la aplicación de un pulso de presión en cabeza de columna de 60 psi durante 2 min, y una rampa de temperatura apropiada (100  $^{\circ}\text{C}$  iniciales durante 0,20 min, 200  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  hasta 230  $^{\circ}\text{C}$ , mantenidos durante 2 min, y 200  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  hasta 300  $^{\circ}\text{C}$ , mantenidos durante 22,35 min) para alcanzar y mantener niveles bajos de degradación del *o,p'*-DDT a la vez que picos de máxima altura para los analitos. Tras optimizar las condiciones de operación mediante el uso de patrones analíticos, la robustez del método se comprobó mediante el posterior análisis de extractos de muestras reales de suelos de diferente naturaleza y contenido en DDTs.

Las condiciones de trabajo elegidas condujeron a ratios de degradación por debajo del 15% en consonancia con las recomendaciones del método 8081 de la EPA. La separación selectiva de los enantiómeros del *o,p'*-DDT en la segunda dimensión se efectuó con una resolución cromatográfica ( $R_s$ ) de 2,4 en la segunda dimensión. La sensibilidad alcanzada se tradujo en un límite de detección (LOD) de 2,1  $\text{pg}/\mu\text{L}$  para el *o,p'*-DDT. Las EF obtenidas tras el análisis de patrones analíticos y muestras reales de suelos mostraron niveles altos de repetibilidad ( $\text{RSD} < 2,0\%$ ) y reproducibilidad ( $\text{RSD} < 3,2\%$ ). Este método es totalmente fiable para la determinación de las concentraciones y relaciones indicadas anteriormente de los enantiómeros en muestras de suelo contaminadas por DDTs.

---

Este estudio ha dado lugar a una publicación científica y se ha presentado en dos congresos según se detalla a continuación.

**Publicación:**

Título: Optimization of a heart-cutting multidimensional gas chromatography-based method for the assessment of enantiomeric fractions of *o,p'*-DDT in environmental samples

Autores: Juan Muñoz-Arnanz, Carme Bosh, Pilar Fernández, Joan O. Grimalt, Begoña Jiménez

Revista: Journal of Chromatography A

Volumen/Páginas/Editorial/Año: 1216/6141-6145/Elsevier/2009

**Congresos:**

Workshop “Persistent Organic Pollutants in the Environment: Global Distribution, Transport and Effects.”

Título: Tracking down the origin of anomalous concentrations of DDT in Spain by the application of heart-cutting MDGC to the enantiomeric analysis of o,p'-DDT

Tipo de participación: Póster

Lugar celebración: Baeza, España

Fecha: 28-30/Mayo/2007

32<sup>nd</sup> International Symposium on Capillary Chromatography and the 5<sup>th</sup> GCxGC Symposium.

Título: Heart-Cutting MDGC: A new tool for the recognition of recent DDT inputs in soils

Tipo de participación: Póster

Lugar celebración: Riva del Garda, Italia

Fecha: 26-30/Mayo/2008

---



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

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

## Optimization of a heart-cutting multidimensional gas chromatography-based method for the assessment of enantiomeric fractions of *o,p'*-DDT in environmental samples<sup>☆</sup>

Juan Muñoz-Arnanz<sup>a</sup>, Carme Bosch<sup>b</sup>, Pilar Fernandez<sup>b</sup>, Joan O. Grimalt<sup>b</sup>, Begoña Jimenez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> CSIC, Institute of Organic Chemistry, Instrumental Analysis and Environmental Chemistry, Juan de la Cierva 3, Madrid 28006, Spain

<sup>b</sup> CSIC, Institute of Environmental Assessment and Water Research, Jordi Girona 18-26, Barcelona 08034, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 15 December 2008

Received in revised form 16 June 2009

Accepted 18 June 2009

Available online 23 June 2009

#### Keywords:

Heart-cutting

Multidimensional gas chromatography

MDGC

*o,p'*-DDT

Enantiomeric fractions

EF

Soil pollution

### ABSTRACT

The enantiomeric fractions present in soil samples may provide information useful in distinguishing recent inputs of DDT from past DDT pollution. In this study, a chromatographic procedure for the determination of the enantiomeric fractions of *o,p'*-DDT based on heart-cutting multidimensional gas chromatography was developed. The optimization carried out achieved low ratios of DDT degradation (<15%) in the chromatographic system. High selectivity and sensitivity in the detection of the target compounds, with a limit of detection as low as 2.1 pg μL<sup>-1</sup>, was reached. In addition, high degrees of repeatability (RSD < 2.0%) and reproducibility (RSD < 3.2%) were obtained for the enantiomeric fractions measured in analytical standards and soil samples.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

DDT (1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl) ethane) has been used extensively in agriculture and disease vector control since the 1940s. Although most applications of this compound have been eliminated worldwide, DDT is still used for malaria control in some countries. Technical DDT consists of a mixture of three isomeric species, namely *p,p'*-DDT, *o,p'*-DDT and *o,o'*-DDT. Of these, *p,p'*-DDT is the most abundant, accounting for up to 85% of the content, followed by *o,p'*-DDT, which accounts for up to 21%. *o,o'*-DDT usually exists only at trace levels [1]. Among these isomers, *o,p'*-DDT is the only chiral molecule and is present as a pair of enantiomers, (+)-*o,p'*-DDT and (–)-*o,p'*-DDT. Due to aerobic and anaerobic degradation, common metabolites of these enantiomers, *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDE and *o,p'*-DDD, are found in the environment. *o,p'*-DDD also possesses chirality. In general, these compounds are all referred to as DDTs.

The chiral compounds *o,p'*-DDD and *o,p'*-DDT are manufactured as racemic mixtures of the two enantiomers (1:1). These

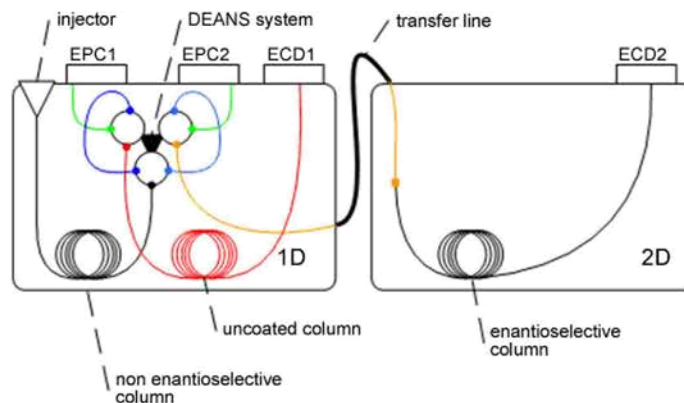
compounds have identical physicochemical properties and abiotic degradation rates. However, due to the structural sensitivity of biological receptors [2], the uptake and metabolism of these compounds by organisms may allow the enantiomers to be differentiated. Several studies have shown that this enantioselective degradation can result in nonracemic mixtures in soils. The composition of these mixtures may provide information about the origin of the contamination and may discriminate recent inputs of technical DDT from residues of past applications [3,4].

The chromatographic analysis of DDTs, often done using gas chromatography with electron-capture detection (GC-ECD) or gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), is widely described in the literature, including the enantiomeric analysis of *o,p'*-DDT using chiral columns [5–7]. The determination of enantiomeric fraction (EF) values is also published [8]. However, in complex mixtures, these determinations are difficult to make due to coelution of the compounds. Heart-cutting multidimensional gas chromatography (MDGC) may be able to provide a good separation of the *o,p'*-DDT enantiomers from complex samples [9,10]. In this study, a heart-cutting MDGC-based method was developed for the determination of the EFs of the *o,p'*-DDT enantiomers in complex environmental matrices, such as soils. Chromatographic elements and parameters, such as the injection system, column combination, temperature and pressure, were optimized in order to achieve a high resolution enantiomeric separation and good repeatability

<sup>☆</sup> Presented at the 12th Conference on Instrumental Analysis, Barcelona, Spain, 21–23 October 2008.

\* Corresponding author.

E-mail address: [bjimenez@iqog.csic.es](mailto:bjimenez@iqog.csic.es) (B. Jimenez).



**Fig. 1.** Schematic diagram of the MDGC system used. Note the presence of the deactivated and uncoated fused silica capillary column, which permits a total length from the injector to the detector in the 1D chromatograph equal to the distance that the analytes have to cover between the injector and the 2D ECD system.

and reproducibility of the EFs. In order to maintain DDT degradation at low ratios, special attention was given to the sample injection mode. The suitability of the developed methodology was assessed by analyzing soil samples with different DDT levels collected in the Ebro River Basin in Spain.

## 2. Experimental

### 2.1. Chromatographic system

The heart-cutting MDGC system employed throughout this study consisted of two independent Varian CP3000 chromatographs (Varian Ibérica, Spain), both equipped with a  $^{63}\text{Ni}$ -ECD system. The two chromatographs were designated as the first and the second dimension chromatographs, referred to as the 1D and 2D chromatographs, respectively. The heart-cutting MDGC configuration used in the present study is shown in Fig. 1. Cuts or selected fractions were transferred from the first dimension column to the second using a DEANS system, located in the 1D chromatographic oven, that was pneumatically controlled by means of two independent electronic pressure control (EPC) units. A temperature-controlled transfer line was directly connected to the DEANS switching system [11] using a press-fit connection. The 1D chromatograph was equipped with an auto-sampler (CP-8410) and a 1079 programmed temperature vaporization (PTV) injector with a frit Gooseneck Siltek liner (Restek, Bellefonte, PA, USA).

### 2.2. Chromatographic conditions

Automatic injections were performed with a PTV injector operating with the following temperature program:  $100^\circ\text{C}$  (0.20 min),  $200^\circ\text{C min}^{-1}$  to  $230^\circ\text{C}$  (2 min) and  $200^\circ\text{C min}^{-1}$  to  $300^\circ\text{C}$  (22.35 min), and a split ratio of 0 for 2 min and of 60 thereafter. Nitrogen was used as the carrier gas at a column head pressure of 60 psi until minute 2, after which time the pressure was kept at 40 psi. Nitrogen was also used as the make-up gas in both ECDs at  $30\text{ mL min}^{-1}$ . Oven temperature programs were as follows: **1D**:  $80^\circ\text{C}$  (1 min),  $30^\circ\text{C min}^{-1}$  to  $185^\circ\text{C}$  (3 min),  $1.9^\circ\text{C min}^{-1}$  to  $234^\circ\text{C}$  (25 min),  $2.0^\circ\text{C min}^{-1}$  to  $270^\circ\text{C}$  (60 min); and **2D**:  $90^\circ\text{C}$  (1 min),  $15^\circ\text{C min}^{-1}$  to  $170^\circ\text{C}$  (30 min),  $1.0^\circ\text{C min}^{-1}$  to  $200^\circ\text{C}$  (70 min). The ECD systems at the first and second dimensions were set to  $300^\circ\text{C}$  and  $250^\circ\text{C}$ , respectively. The transfer line was maintained at  $250^\circ\text{C}$ . The 1D column was a  $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm I.D.}$ ,  $0.25\ \mu\text{m}$  film thickness DB5 column (5% phenyl, 95% methylpolysiloxane, J&W Scientific, Folsom, CA, USA), while two different columns were tested in the

2D chromatograph: a  $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm I.D.}$ ,  $0.18\ \mu\text{m}$  film thickness BGB-172 column (25% 2,3,6-tert-butylidimethylsilyl  $\beta$ -cyclodextrin, BGB Analytik, Adliswil, Switzerland) and a  $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm I.D.}$ ,  $0.25\ \mu\text{m}$  film thickness BGB-176SE column (20% 2,3-di-O-methyl-6-O-tert-butylidimethylsilyl  $\beta$ -cyclodextrin, BGB Analytik, Adliswil, Switzerland).

### 2.3. Materials and standard solutions

Residue analysis-grade n-hexane, isooctane, dichloromethane, methanol and acetone were from Merck (Darmstadt, Germany). Concentrated sulfuric acid (95–97%), hydrochloric acid (25%), anhydrous sodium sulfate and powdered copper (size  $<63\ \mu\text{m}$ ) were also from Merck. The copper was activated by sonication three times in 25% hydrochloric acid and then rinsed several times with Milli-Q water to a neutral pH, followed by an acetone rinse to remove the water. Anhydrous sodium sulfate was cleaned and activated overnight at  $400^\circ\text{C}$  prior to use.

Individual standards of *p,p'*-DDT (98.5%), *o,p'*-DDT (99.5%), *p,p'*-DDE (97.5%), *p,p'*-DDD (97.5%) and *o,p'*-DDD (99.5%), as well as a mixture of all of these compounds along with *o,p'*-DDE (99%, pesticide Mix-164), were obtained from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany). Polychlorinated biphenyls (PCBs) 200 and 142 were used as surrogate and injection standards, respectively. These were also obtained from Dr. Ehrenstorfer GmbH, and they were used as standards after confirming their absence in the original samples.

### 2.4. Soil sample treatment

#### 2.4.1. Extraction and clean-up

Approximately 7–8 g of fresh soil was sonicated in methanol ( $1 \times 20\text{ mL}$ ; 20 min) to remove the interstitial water. The subsequent extractions were performed with a mixture of n-hexane and dichloromethane (4:1, v/v;  $3 \times 20\text{ mL}$ ; 20 min). All extracts were combined and spiked with PCB 200, reduced to 2 mL and cleaned-up with concentrated sulfuric acid. The extracts were vacuum evaporated to 0.5 mL, and activated copper was added to remove any sulfur-containing compounds. The copper powder was removed by filtration through anhydrous sodium sulfate and rinsed with n-hexane. Finally, the extracts and rinses were concentrated to  $100\ \mu\text{L}$  in isooctane under a gentle stream of nitrogen.

#### 2.4.2. Quantification of DDTs

The *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDT and *p,p'*-DDT levels in the soil samples were determined by GC-ECD



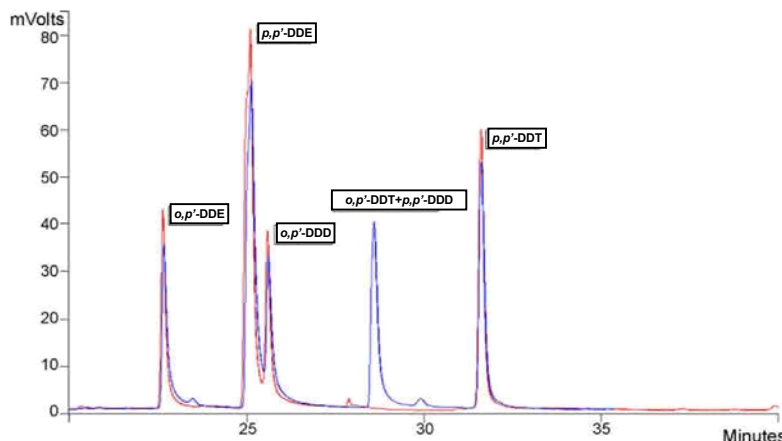


Fig. 2. Overlay of the chromatograms obtained from Mix-164 in the 1D system before (5 peaks) and after (4 peaks) taking a cut containing the coeluates *o,p'*-DDT and *p,p'*-DDD.

(Agilent Technologies, model 6890N, Palo Alto, CA, USA) with a 60 m × 0.25 mm I.D., 0.25 μm film thickness DB-5 column (5% phenyl, 95% methylpolysiloxane, J&W Scientific, Folsom, CA, USA). Before chromatographic analysis, PCB 142 was added as an internal standard to correct for instrument variability. The instrument was operated in splitless mode (closed 0.5 min), and the oven temperature program started at 90 °C (held 2 min) and was increased to 130 °C at 15 °C min<sup>-1</sup> and then to 290 °C at 4 °C min<sup>-1</sup> (holding time 20 min). Injector and detector temperatures were 250 °C and 320 °C, respectively. Helium and nitrogen were used as the carrier (1.5 mL min<sup>-1</sup>) and make-up (60 mL min<sup>-1</sup>) gases, respectively. DDT breakdown in the inlet-port was checked daily and maintained below 15%.

Calibration curves were constructed for each compound to be quantified. The quantitative data were corrected for surrogate recovery. The mean recovery of PCB 200 was 85%. Water content was determined from sample aliquots (0.5–1 g) in order to express the concentrations per dry weight. A blank sample was included with each set of six samples.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Heart-cutting multidimensional gas chromatography

The injection of Mix-164, containing the six DDT congeners, onto a 30 m DB-5 column in the 1D chromatograph resulted in an incomplete separation due to the coelution of *o,p'*-DDT and *p,p'*-DDD. This coelution was present regardless of any modification of the temperature program used.

In order to obtain the chromatogram from the 1D chromatograph, the carrier flow was set for the DEANS system to divert the sample toward a deactivated and uncoated fused silica capillary column (30 m × 0.25 mm I.D.) that reached the detector. Once the retention time of the coeluates in the 1D system was identified, a second injection of the sample was performed, and the EPCs set up the flow at the correct moment for the DEANS system to send the fraction containing the coeluates into the 2D chromatograph via the transfer line. After the transfer of the cut was complete, the flow was reverted to its initial setup for the remaining analytes yet to be separated and detected in the first dimension (Fig. 2). At the same time, the components of the coelution were forced into the 2D system where they separated from each other and were detected by a second ECD system (Fig. 3).

#### 3.2. Analytical performance optimization

##### 3.2.1. Detector selection

A sensitive analysis of *o,p'*-DDT in two dimensions was challenging because of the unavoidable signal broadening as a result of the split of the racemic peak into the signals of both enantiomers also contributed to the challenge. However, ECD provides enough sensitivity for identification of organohalogen compounds in environmental samples at the concentrations currently found in environmental studies. Additionally, it exhibits high repeatability and reproducibility as well as an appropriate range of linearity. Moreover, an ECD system is a common detector in environmental laboratories and is much more affordable than a selective MS detector.

##### 3.2.2. Column selection

A DB-5 column was selected for the 1D separation. This non-polar, non-chiral stationary phase column is able to withstand high temperatures and makes a first separation mainly based on the volatility of the analytes. In the 2D chromatograph, two enantioselective columns, a BGB-172 and a BGB-176SE, both with cyclodextrin derivatives as nonracemic chiral stationary phases, were tested. These columns are able to resolve enantiomer pairs based on the diastereomeric associations established between the eluting species and the chiral stationary phases [12]. The combination of both separation mechanisms enhances the orthogonality of this analytical application [13].

It was found that the combination of the DB-5 and BGB-172 columns was able to separate *o,p'*-DDT from *p,p'*-DDD and to separate the *o,p'*-DDT enantiomers from each other (Fig. 3). The BGB-176SE in the 2D system was only capable of separating *o,p'*-DDT from *p,p'*-DDD.

##### 3.2.3. Injection system

DDT is prone to degradation during GC injection [14,15], and for this reason, both conventional split/splitless and PTV injection were tested. Analysis in splitless mode at temperatures as low as 220 °C and with sample injection volumes of 1 μL led to high degradation ratios for *o,p'*-DDT, which was mainly converted into *o,p'*-DDD. Conversely, the PTV injector with the use of an adequate temperature program made it possible to minimize the degradation of all DDTs, including *o,p'*-DDT (below 15%, calculated following the

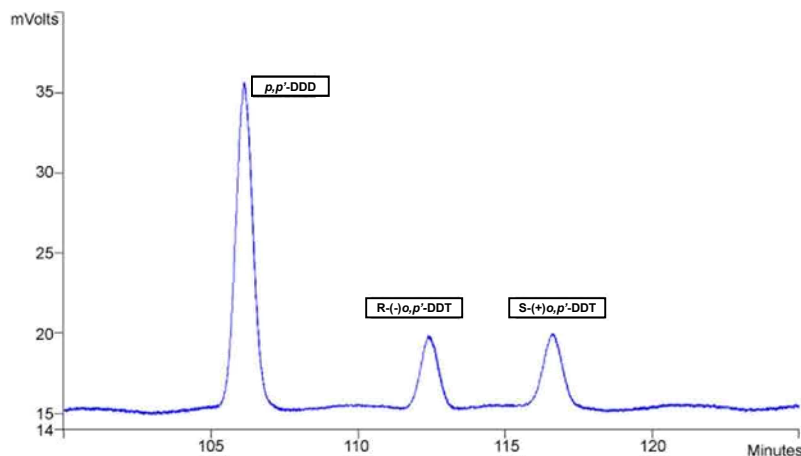


Fig. 3. Second dimension chromatogram showing the separation between  $p,p'$ -DDD and the two  $o,p'$ -DDT enantiomers.

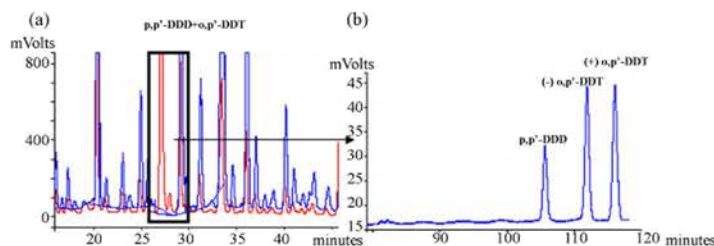


Fig. 4. (a) First dimension chromatogram showing the trace of the organohalogen compounds in a soil sample. Note the cut carried out between minutes 27 and 29. (b) Second dimension chromatogram showing the separation of the  $o,p'$ -DDT enantiomers from the rest of the species transferred in the same cut to the 2D system.

recommendation of the Environmental Protection Agency (EPA) Method 8081 as described by Foreman et al. [14,16]). In order to enhance the limit of detection (LOD) for the analytes studied, volumes of up to 4  $\mu\text{L}$  were injected. In addition, the PTV injection was improved by pressure-pulse injection (using a column head pressure of 60 psi with a split ratio of 0 during the first 2 min), yielding higher signals of the DDT congeners in the second dimension.

### 3.2.4. Chromatographic performance

By following the optimized operational conditions detailed above, the existing coelution ( $o,p'$ -DDT and  $o,p'$ -DDD) in the first dimension could be further resolved by transferring the selected cut to the 2D system. As shown in Fig. 3, a good separation between  $p,p'$ -DDD and both  $o,p'$ -DDT enantiomers was achieved. The chromatographic resolution ( $R_s$ ) of the BGB-172 column was 2.4 for the separation of the  $o,p'$ -DDT enantiomers. Low DDT degradation ratios (<15%) were maintained and controlled using the optimal operational conditions and by measuring the degradation after the injection of standards. Besides the injection port, the transfer line was another critical site where degradation could take place. The

temperature of 250 °C (slightly higher than the elution temperature in the 1D system) was sufficient to transfer these compounds and to avoid degradation of all DDT congeners.

The sensitivity of the ECD system in the 2D system for the detection of  $o,p'$ -DDT was evaluated by means of a 10  $\text{pg}\ \mu\text{L}^{-1}$  Mix-164 solution. The instrumental LOD and limit of quantification (LOQ) were 2.1  $\text{pg}\ \mu\text{L}^{-1}$  and of 7.1  $\text{pg}\ \mu\text{L}^{-1}$ , respectively. These values represent three and ten times the S/N value, respectively. Furthermore, the method was found to be linear over a range of 7.1–1000  $\text{pg}\ \mu\text{L}^{-1}$  with a correlation coefficient of 0.9990. The EF is defined as  $A_+/(A_+ + A_-)$ , where  $A_+$  and  $A_-$  correspond to the peak areas of the (+) and (–) enantiomers, respectively. Repeatability and reproducibility tests on the EFs were performed by replicate injections of analytical racemic standards at two different concentrations (50 and 250  $\text{pg}\ \mu\text{L}^{-1}$ ). From the values shown in Table 1, the EF value corresponding to racemic  $o,p'$ -DDT was established as  $0.505 \pm 0.010$ . Additionally, repeatability and reproducibility of the  $o,p'$ -DDT enantiomer retention times were also assessed, with RSDs of 0.03% and 0.23%, respectively. Repeatability was calculated by replicate injections ( $n=4$ ) on the same day, while reproducibil-

Table 1  
Quality of the EF determination performed by injection of the  $o,p'$ -DDT racemic standard.

Standard concentration	50 $\text{pg}\ \mu\text{L}^{-1}$			250 $\text{pg}\ \mu\text{L}^{-1}$		
	EF mean	SD <sup>a</sup>	RSD <sup>b</sup>	EF mean	SD	RSD
Repeatability ( $n=4$ within the same day)	0.500	0.010	2.0	0.507	0.003	0.67
Reproducibility ( $n=4$ in different days)	0.509	0.016	3.2	0.504	0.003	0.62

<sup>a</sup> Standard deviation.

<sup>b</sup> Relative standard deviation.

**Table 2**  
EFs of *o,p'*-DDT in soil samples.

Sample	Mean EF (n = 3)	SD (n = 3)	Probability Student's <i>t</i> -test	<i>o,p'</i> -DDT (ng g <sup>-1</sup> dw <sup>a</sup> )	ΣDDT <sup>b</sup> (ng g <sup>-1</sup> dw)	Soil sample
A	0.429	0.008	0.000**	11.3	143.4	Urban soil
B	0.501	0.008	0.509	65.0	378.1	Vineyard soil
C	0.503	0.005	0.750	7.55	73.4	Agricultural soil
D	0.479	0.009	0.002**	0.23	18.3	Paddy soil

<sup>a</sup> Dry weight.<sup>b</sup> Sum of *o,p'*- and *p,p'*-DDE, DDD and DDT.\*\* Significant EF shift *p* < 0.01.

ity was calculated based on replicate injections (*n* = 4) of the same standards within a week.

### 3.3. EFs of *o,p'*-DDT in soil samples

The 1D and 2D chromatograms obtained in the analysis of one soil sample are shown in Fig. 4. Note the high number of species separated and coeluting in the first dimension and how, after a precise cut, the enantiomers of *o,p'*-DDT were separated in the 2D system.

The LOD achieved for *o,p'*-DDT in soil samples was as low as 2.1 pg μL<sup>-1</sup>, calculated as three times the S/N value.

Table 2 summarizes the EF values found in different soil samples representative of high, medium and low pollution by DDTs (three samples of agricultural soils and one sample of urban soil from the lower part of the Ebro River Basin, Spain). The average EF and its standard deviation for the soil samples were calculated from three replicate injections of each sample. The observed *o,p'*-DDT mixtures were considered to be racemic or nonracemic if their measured EF fell inside or outside of the ±95% C.I. for the standards, respectively. Prior to EF analyses, quantitative levels of all DDT isomers were determined as shown in Table 2.

The EF values of the different soils studied ranged between 0.429 and 0.503. The EF values of soils B and C were not different from those in the technical mixtures, i.e., they were close to the racemic value when the Student's *t*-test was performed. This result suggests that there have been recent DDT inputs in those soil samples. Samples A and D showed a significant deviation from the racemic value (with a probability lower than 0.01), suggesting that the DDT residues in these soils were probably related to past applications of this pesticide.

## 4. Conclusions

The enantiomeric ratios of *o,p'*-DDT in soil samples polluted by organohalogen compounds can be determined using a heart-

cutting MDGC system with a combination of an achiral (DB5) column and a chiral (BGB-172) column and equipped with an ECD system. Low DDT degradation ratios have been achieved with PTV injection and by working under optimized conditions of pressure and temperature in the MDGC system. The method developed for EF determination has a high degree of repeatability and reproducibility for the *o,p'*-DDT EFs. This method is reliable for measurement of the above-mentioned ratios in soil samples with contamination by organochlorine compounds.

## Acknowledgments

Funding for this research was provided by CSIC (Project Ref. 200680F0162). C.B. thanks the fellowship from CSIC (13P-BDP2004).

## References

- [1] X. Qiu, T. Zhu, B. Yao, J. Hu, S. Hu, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 4385.
- [2] P.B. Kurt-Karakus, J.L. Stroud, T. Bidleman, K.T. Semple, L. Jantunen, K.C. Jones, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 4965.
- [3] J. Li, G. Zhang, Q. Shihuan, L. Xiangdong, X. Peng, *Sci. Total Environ.* 372 (2006) 215.
- [4] T.F. Bidleman, A.L. Falconer, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 206A.
- [5] H.-R. Buser, M.D. Muller, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2691.
- [6] G. Koske, G. Leupold, D. Angerhöfer, H. Parlar, *Chemosphere* 39 (1999) 683.
- [7] R.L. Falconer, T.F. Bidleman, S.Y. Szeto, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 1946.
- [8] H.-J. de Geus, P.G. Wester, J. de Boer, U.A.Th. Brinkman, *Chemosphere* 41 (2000) 725.
- [9] L.F. de Alencastro, D. Grandjean, J. Tarradellas, *Chimia* 57 (2003) 499.
- [10] M. Koblikzova, T.D. Bucheli, J. Klánová, R.C. Brändli, *Organ. Comp.* 68 (2006) 2419.
- [11] D.R. Deans, *J. Chromatogr.* 203 (1981) 19.
- [12] W. Vetter, V. Schuring, *J. Chromatogr. A* 774 (1997) 143.
- [13] G. Schomburg, *J. Chromatogr. A* 703 (1995) 309.
- [14] W.T. Foreman, P.M. Gates, *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997) 905.
- [15] M. Gfrerer, E. Lankmayr, *J. Chromatogr. A* 1072 (2005) 117.
- [16] US Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Method for the Determination of Organochlorine Pesticides by Capillary Column Gas Chromatography, EPA-8081A, US Government Printing Office, Washington, DC, 1996, pp.1–44.

### 3.3. PRESENCIA RECIENTE DEL DDT TRAS 30 AÑOS DE PROHIBICIÓN EN ESPAÑA. ESTUDIO EN SUELOS DE CULTIVO DEL SUROESTE DE ESPAÑA

---

La detección de concentraciones altas de DDTs en años recientes en suelos de la Rábida y en muestras de huevos de milano real en el área de Doñana, supuso un punto de inflexión en la paulatina tendencia de descenso encontrada y esperada en los niveles de este pesticida desde su prohibición en España en 1977. De entre las posibles causas responsables de dichos niveles se contempló un uso ilegal del DDT y/o la utilización del acaricida dicofol que presenta cantidades variables de DDT como impurezas en sus formulaciones.

El objetivo principal de este trabajo fue la investigación de la actual contaminación por DDTs en el medio abiótico del END y su Comarca, y concretamente en suelos de distintos cultivos agrícolas de este área, intentando esclarecer el posible origen de la contaminación (DDT técnico *vs.* dicofol) y datación (uso reciente *vs.* histórico) en base al cálculo de las relaciones entre sus formas isómeras  $R_{p,p'/p,p'}$  y  $R_{o,p'/p,p'}$ , y de las EF asociadas al contenido en *o,p'*-DDT.

Un total de 32 muestras de suelos superficiales ( $\approx 10$  cm) fueron recogidos durante las primaveras de 2007 y 2008, representativas de cultivos mayoritarios de la región tales como: fresas, cítricos, arroz, algodón, vid y olivar. La muestra de cada suelo de cultivo correspondió a la combinación de las submuestras de cinco puntos de muestreo establecidos en cada cultivo. En el laboratorio las muestras fueron inicialmente secadas y tamizadas ( $\emptyset = 2$  mm), homogeneizadas con cobre y sulfato sódico anhidro para eliminar el posible contenido en azufre y humedad, y finalmente extraídas en soxhlet con tolueno durante 18 horas. Previamente al proceso de extracción, y para controlar la eficacia de todo el proceso analítico, las muestras fueron fortificadas con PCB-200. La subsiguiente purificación de los extractos obtenidos se llevó a cabo por cromatografía en columna tubular rellena con sílices neutra, modificada con  $H_2SO_4$  (44% p:p) y modificada con KOH (36% p:p). La determinación de todas las



formas isómeras  $p,p'$ -y  $o,p'$ - del DDT, DDE y DDD se llevó a cabo por GC- $\mu$ ECD, con inyección on-column de volúmenes de muestra de 2  $\mu$ L, utilizando una columna DB-5ms de bajo sangrado de 60 metros. La cuantificación de los analitos se llevó a cabo mediante la construcción y uso de curvas de calibrado de 8 puntos de concentración, y utilizando el PCB-142 como patrón interno de inyección. La determinación de las EF del  $o,p'$ -DDT presente en las muestras se llevó a cabo por MDGC-ECD empleando el método previamente desarrollado y descrito en la sección 3.2.

Los niveles de degradación del DDT se mantuvieron siempre por debajo del 15% y del 5% en MDGC-ECD y GC- $\mu$ ECD, respectivamente, en acuerdo con las directrices marcadas por el método 8081 de la EPA. La recuperación media del PCB-200 fue del  $81 \pm 13\%$ . Los LOD medios alcanzados para los diferentes DDTs fueron: 0,941 pg/g ( $p,p'$ -DDT), 0,822 ( $o,p'$ -DDT), 1,10 pg/g ( $p,p'$ -DDE), 1,10 pg/g ( $o,p'$ -DDE), 0,406 ( $p,p'$ -DDD) y 1,66 pg/g ( $o,p'$ -DDD).

Se pudieron determinar concentraciones de DDTs, y especialmente de  $p,p'$ -DDT y  $p,p'$ -DDE en todas las muestras de suelos de cultivo analizadas. No obstante, el intervalo de valores (0,08 – 11,1 ng/g, peso seco) fue de hasta dos órdenes de magnitud inferior al encontrado en el mismo área en 1990 (3,49 – 46,0 ng/g, peso seco) y sensiblemente inferior al encontrado en muestreos de la cuenca del Ebro (0,11 – 58,2 ng/g, peso seco) llevados a cabo en los años 2004, 2005 y 2006. Un uso reciente y por tanto ilegal del pesticida, aunque en pequeñas concentraciones, pudo asumirse en al menos un 17% de las muestras en base al valor inferior a 1 calculado para la relación  $R_{p,p'/p,p'}$ . Adicionalmente, un origen ligado al uso de dicofol en un 27% de las muestras pudo asumirse en base a los valores encontrados superiores a 0,2 de la relación  $R_{o,p'/p,p'}$ . Esta hipótesis quedó refrendada por el hecho de que todos los suelos en los que se sospechaba un origen por dicofol correspondieron a cultivos en los que el uso de dicho acaricida estaba indicado -fresas, cítricos y algodón-. Las EF del  $o,p'$ -DDT fueron significativamente distintas al valor racémico (0,5) en 17 de las 22 muestras de suelo en donde pudieron determinarse. Sin embargo, no fue posible encontrar ninguna relación entre el valor absoluto de desviación de una EF con respecto al valor racémico y el grado de envejecimiento del DDT cuantificado en base al valor de  $R_{p,p'/p,p'}$ . Por todo ello, se concluyó que las EF no pueden utilizarse para cuantificar la ratio de degradación global del DDT en muestras de suelo, posiblemente debido a la heterogeneidad de las

colonias microbianas presentes en este tipo de matriz, las cuales pueden actuar diferencialmente de manera equiprobable sobre uno u otro de los enantiómeros del *o,p'*-DDT.

Este estudio ha contribuido a actualizar los conocimientos sobre la presencia del DDT en zonas agrícolas. Dado que la principal vía de exposición humana al DDT es a través de la ingesta alimentaria, el control de la carga de DDT en los suelos y en especial en los que se utilizan para los cultivos alimenticios humanos debe considerarse todavía hoy como una precaución necesaria.

---

Este estudio ha dado lugar a una publicación científica y se ha presentado en dos congresos según se detalla a continuación.

**Publicación:**

Título: New DDT inputs after 30 years of prohibition in Spain. A case study in agricultural soils from south-western Spain

Autores: Juan Muñoz-Arnanz, Begoña Jiménez

Revista: Environmental Pollution

Volumen/Páginas/Editorial/Año: 159/3640-3646/Elsevier/2011

**Congresos:**

IX Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques (SECyTA)

Título: DDT occurrence and origin in the surroundings of Doñana National Park. Application of monodimensional and heart-cutting multidimensional chromatography

Tipo de participación: Comunicación Oral

Lugar celebración: San Sebastian, España

Fecha: 28-30/Octubre/2009

SETAC Europe 20<sup>th</sup> Annual Meeting

Título: Doñana National Park surroundings and DDT: an old and new concern

Tipo de participación: Comunicación Oral

Lugar celebración: Sevilla, España

Fecha: 23-27/Mayo/2010

---



## New DDT inputs after 30 years of prohibition in Spain. A case study in agricultural soils from south-western Spain

Juan Muñoz-Arnanz, Begoña Jiménez\*

*CISIC, Institute of Organic Chemistry, Department of Instrumental Analysis and Environmental Chemistry, Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain*

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 6 June 2011  
Received in revised form  
23 July 2011  
Accepted 27 July 2011

#### Keywords:

DDT  
DDE  
Dicofol  
Soils  
Spain  
*o,p'*-DDT  
Chiral analysis  
Enantiomeric fractions

### ABSTRACT

This study provides information on the current status of contamination by DDT in agricultural soils in south-western Spain. A recent use of technical DDT in at least 17% of the soils was found based on the values ( $<1$ ) of the ratio  $R_{p,p'/p,p'} = [p,p'\text{-DDE} + p,p'\text{-DDD}] / [p,p'\text{-DDT}]$ . According to the ratio  $R_{o,p'/p,p'} = [o,p'\text{-DDT}] / [p,p'\text{-DDT}]$ , a dicofol type contamination was detected in about 27% of the soils. A wide range of concentrations was observed (0.08–11.1 ng/g d.w.) regardless of the type of crop soil. Enantiomeric fractions (EFs), based on the chiral analysis of *o,p'*-DDT residues differed from the racemic value (0.500) in most soils but they were not correlated with the study variables [DDTs], SOM,  $R_{p,p'/p,p'}$  and  $R_{o,p'/p,p'}$ . Given the health risks posed by DDT, our findings support how the environmental control of legacy pollutants such as DDT cannot be neglected.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The use of the insecticide Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) for agricultural purposes was banned during the 1970's in most industrialized countries as a result of its proven hazardous effects on wildlife (Beard, 2006). In 2001, the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants included DDT as one of the 12 POPs for which their production and use was prohibited. Today the Convention only authorizes the use of DDT for disease vector control (UNEP, 2001).

During the past 15 years research focusing on DDT and its health effects on humans has increased steadily (Yi and Xi, 2008; Ritter et al., 2011). Several studies have suggested a possible link between chronic DDT exposure and severe health issues such as fertility loss, pregnancy loss, diabetes, leukemia or pancreatic cancer among others (Beard, 2006; Eskenazi et al., 2009; Van den Berg, 2009). Humans can be exposed to organochlorine pesticides such as DDTs through direct soil ingestion as well as through the consumption of food produced on contaminated land (Gaw et al., 2006). It is generally accepted that the main route of human exposure to DDT occurs mainly through diet (Beard, 2006).

Yet and despite its restricted use, DDT concentrations continue to be reported worldwide, in some cases without decline, in different environmental compartments (Blasius and Goodmanlowe, 2008; Geisz et al., 2008; Wong et al., 2008; Guo et al., 2009; Kozul et al., 2009; Sibali et al., 2009). It is known that a current source of this pesticide in the environment is via Dicofol, a miticidal pesticide and acaricide synthesized from DDT. Hence, DDT-related impurities such as *o,p'*-DDT, *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDT or *p,p'*-Cl-DDT (a chlorinated DDT intermediate that leads to Dicofol prior hydrolysis) are usually found in formulations of this pesticide. The concentration range of these impurities may vary widely, with reported proportions up to 14% of total Dicofol weight (Turgut et al., 2009). Today Dicofol is regarded as a possible POP candidate under the United Nations Economic Commission for Europe (UNECE). Nevertheless, the use of Dicofol in the European Union is currently accepted provided the maximum content of DDT impurities is under 0.1% (Council Directive 79/117/EEC, 1978). According to Van der Gon et al. (2007), Dicofol usage in Spain ranked the highest among the EU countries in the year 2000 with an estimate of 12,500 kg/year.

Technical DDT formulations are mainly comprised of *p,p'*-DDT (65–85%) and *o,p'*-DDT (15–21%) isomers (Qiu et al., 2005). While *p,p'*-DDT is the only isomeric form with insecticide power, *o,p'*-DDT, which possesses a stereocenter and exists as a pair of enantiomers, is an endocrine disrupter with estrogenic activity in avian and mammalian systems (Garrison et al., 2000). Although with different

\* Corresponding author.

E-mail address: [bjimenez@iqog.csic.es](mailto:bjimenez@iqog.csic.es) (B. Jiménez).



half-lives, both DDT isomers are presumed to degrade in the environment by similar ways. Thus, *p,p'*/*o,p'*-DDT dechlorination under aerobic and anaerobic conditions leads to its major environmental metabolites dichlorodiphenyldichloroethene (*p,p'*/*o,p'*-DDE) and dichlorodiphenyldichloroethane (*p,p'*/*o,p'*-DDD), respectively. The ratio [DDE + DDD]/[DDT] is commonly used to study DDT contamination and discriminate between recent and legacy inputs of this pesticide (Harner et al., 1999; Holoubek et al., 2009). Additionally, the fact that *o,p'*-DDT exists as a pair of enantiomers makes it possible to study the microbial enantioselective degradation of this species, which in turn may help to date DDT burdens (Garrison et al., 2000; Li et al., 2006).

In Spain, after an initial restriction in 1971, the comprehensive ban on DDT came into force in 1977 (BOE, 1975). However, during the last decade, contamination by organochlorine compounds such as DDT has been reported to be a potential element of concern in some raptor species, with a particular concern posed by species at risk (Gómara et al., 2008). In addition, recent studies also reported high levels of DDTs in soils from north-eastern Spain (Hildebrandt et al., 2009). This work was carried out to primarily assess the current DDT occurrence in soils under the most significant crops of a highly agricultural region in south-western Spain after more than 30 years of DDT's ban. This region not only produces a significant proportion of Spain's vegetables and fruits, but also it surrounds an ecologically sensitive area like Doñana National Park (DNP). The analysis of different DDT isomer ratios along with enantiomeric enrichments of *o,p'*-DDT was carried out with the objective of decipher both the origin (technical DDT vs. Dicolfol) and age of the residues detected.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sample collection

A total of 32 soils were sampled in the springs of 2007 and 2008 from municipalities surrounding Doñana National Park (DNP) that comprise the region of Comarca de Doñana (Fig. 1). This extended highly agricultural region (over 300,000 km<sup>2</sup>) in south-western Spain has over 60% of its population (~180,000 people) employed in agricultural related activities. Most soils in this study were chosen under the most representative crops of this area: strawberry (*n* = 11), citrus (*n* = 5), rice (*n* = 4), cotton (*n* = 3), vineyard (*n* = 3) and olive grove (*n* = 4), for which

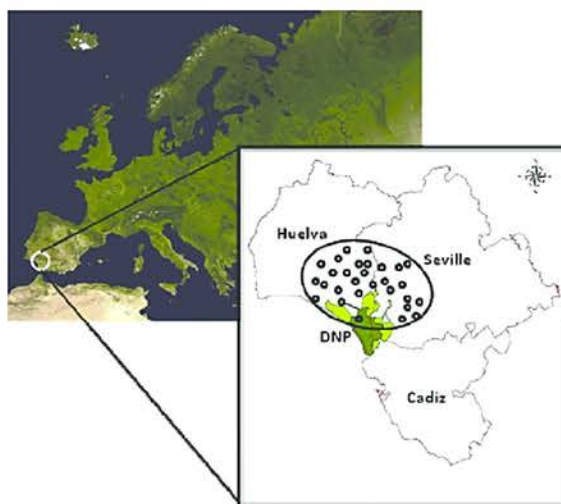


Fig. 1. Map of the study region: the Comarca de Doñana surrounding Doñana National Park (DNP), showing an approximation of the soil sample locations.

some of them Dicolfol treatment is permitted. Two soils were collected from the heart of DNP that were intended as DDT contamination background soils (Table S1). All samples were collected from top soils (depth ~10 cm) using a stainless steel auger. Each sample was a pool of five cores collected at a site. Homogenized samples (~200 g) were sealed in glass flasks, and protected from UV light until their analysis. Detailed information about each sampling point can be found in Table S1 in the Supplementary Information.

### 2.2. Materials

The following standards were purchased from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany): *p,p'*-DDT (98.5%), *o,p'*-DDT (99.5%), *p,p'*-DDE (97.5%), *o,p'*-DDE (99.0%), *p,p'*-DDD (97.5%), *o,p'*-DDD (99.5%) and polychlorinated biphenyls (PCBs) 142 and 200. PCB 142 was used as internal/injection standard and PCB 200 as surrogate. The absence of both PCBs from the original samples was checked previously. All solvents used were pestipur or equivalent quality including acetone, toluene and isooctane purchased from SDS (Peypin, France) and n-hexane purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

### 2.3. Analytical procedure

Soil samples were ground in a mortar with a pestle, and sieved through a steel mesh with a 2 mm grid size. Soil moisture content was determined by weighting before and after reaching constant weight at 60 °C. Soil organic matter (SOM) contents were determined by wet oxidation of ~1 g of soil in acid K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> and measuring the excess of K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> with Mohr's salt (Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) 0.5 M, following the method described by Walkley (1947) using diphenylamine as indicator reagent.

For DDT analysis, a mixture of 30 g of each soil, 15 g of anhydrous sodium sulfate and 15 g of copper were ground until reaching complete homogenization. The mixtures were spiked with 20 ng of PCB 200 and then transferred to cellulose thimbles and Soxhlet extracted for 18 h using 200 mL of toluene. Extracts in toluene were concentrated to 1–2 mL by rotary evaporation. Clean-up was carried out by column chromatography. Columns were filled with 3 g of neutral silica, 4 g of silica modified with sulfuric acid (44% w:w), and 2 g of silica modified with potassium hydroxide (36% w:w). Elution was carried out with 100 mL of n-hexane. Final extracts were rotary evaporated until 1 mL, transferred to vials, and dried under a gentle nitrogen stream. Samples were reconstituted in a solution of PCB 142 in isooctane as an internal standard for chromatographic analysis.

### 2.4. Quantitation of DDTs

*p,p'*- and *o,p'*-isomers of DDT, DDE and DDD were analyzed by gas chromatography with micro electron-capture detection (GC- $\mu$ ECD, Agilent 7890, Palo Alto, California, USA) and on column injection. Automatic injections (2  $\mu$ L) were performed. Gas chromatographic separation was achieved using a DB-5ms low bleed column (60 m  $\times$  0.25 mm i.d.  $\times$  0.25  $\mu$ m film thickness, J&W Scientific, USA). The column temperature was maintained at 90 °C for 2 min, then ramped at 15 °C/min to 130 °C, ramped again at 4 °C/min to 290 °C, and maintained for 20 min. The on column injector matched the column temperature at all times. Detector temperature was set at 320 °C. Helium and nitrogen were used as carrier (1.5 mL/min) and make-up (60 mL/min) gases, respectively.

Quantification was based on an eight-point calibration curve for each target analyte and using PCB 142 as internal standard. Average limits of detection (LODs), calculated as three times the S/N value were 0.941 pg/g (*p,p'*-DDT), 0.822 pg/g (*o,p'*-DDT), 1.10 pg/g (*p,p'*-DDE), 1.10 pg/g (*o,p'*-DDE), 0.406 pg/g (*p,p'*-DDD), and 1.66 pg/g (*o,p'*-DDD).

### 2.5. Chiral analysis of *o,p'*-DDT

*o,p'*-DDT enantiomers were determined by heart-cutting multidimensional gas chromatography with electron-capture detection (MDGC-ECD). A MDGC method was optimized to achieve low degradation and high sensitivity for the target compounds. The experimental conditions of this method were optimized in an earlier study (Muñoz-Arnanz et al., 2009). Briefly, automatic injections (4  $\mu$ L) were performed with a programmed temperature vaporization (PTV) injector and application of a pressure-pulse. Gas chromatographic separation was achieved using a suitable combination of a non-chiral column (DB5, 30 m  $\times$  0.25 i.d.  $\times$  0.25  $\mu$ m film thickness) in the first dimension, and a chiral column (BGB-172, 30 m  $\times$  0.25 mm i.d.  $\times$  0.18  $\mu$ m film thickness) in the second dimension. The relative abundance of *o,p'*-DDT enantiomers was expressed as enantiomeric fractions (EFs), defined as  $EF = A_+ / (A_+ + A_-)$ , where  $A_+$  and  $A_-$  correspond to (+) *o,p'*-DDT and (–) *o,p'*-DDT peak areas, respectively (de Geus et al., 2000; Muñoz-Arnanz et al., 2009).

### 2.6. QA/QC

Quality criteria were based on the application of quality control and quality assurance measures, which included the analysis of blank samples covering the complete analytical procedure (one procedural blank in each set of six samples). Care was taken to minimize exposure to UV light throughout the whole analytical



**Table 1**  
Arithmetic mean, median, geometric mean, range and detection frequencies of DDT concentrations (ng/g d.w.) in the study soils.

	<i>p,p'</i> -DDT	<i>o,p'</i> -DDT	<i>p,p'</i> -DDD	<i>o,p'</i> -DDD	<i>p,p'</i> -DDE	<i>o,p'</i> -DDE	DDTs
Mean	0.32	0.04	0.11	0.12	1.17	0.03	1.79
Median	0.11	0.01	0.01	0.04	0.19	0.01	0.52
Geometric mean	0.10	0.02	0.02	0.04	0.30	0.02	0.59
Range	0.01–2.18	<LOQ–0.44	<LOQ–2.57	<LOQ–2.00	0.02–8.70	<LOQ–0.25	0.08–11.1
% >LOQ	100	87.5	87.5	93.8	100	75	100

procedure. DDT breakdown in the chromatographic systems was checked daily and maintained below 15% in compliance with the US Environmental Protection Agency (EPA) Method 8081 (US EPA, 1996). DDT degradation using on column injection was always detected below 5%. Average recovery for PCB 200 was  $81 \pm 13\%$ . Calibration curves were checked daily. The precision for the quantification method was checked by reanalyzing 3 different soil samples in three different days, obtaining RSDs lower than 5%. Each enantiomeric fraction was calculated as the mean of three injections of the same soil sample. Values of each soil EF along with its corresponding SD and RSD are provided in Table S2 in the Supplementary Information. Reproducibility of the EF measurements was assessed by performing three injections in different days of a racemic standard solution of *o,p'*-DDT at 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  and 250  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  yielding RSDs inferior to 2.5% and 0.6%, respectively. Reported values were corrected for blanks and surrogate recovery.

### 2.7. Data analysis

All concentrations are given in dry weight (d.w.) basis. Samples with concentrations below the quantification limits (LOQs) were assigned a value of zero. Statistical analyses were carried out with SigmaPlot for Windows version 11.0 (Systat Software Inc, CA, USA) and IBM SPSS Statistics for Windows version 19 (SPSS Inc, IL, USA). Concentration data for DDTs and variables derived from them were not normally distributed (Shapiro–Wilk test,  $p < 0.001$ ). Log transformation was applied to meet the criterion of normality when exploring possible relationships between variables as Pearson Product Moment Correlations. A *t*-test was performed to compare the EF values obtained with the racemic value (0.500). Principal Component Analysis, with Varimax normalized rotation, was carried out with the values of each soil's isomeric relative abundance. A minimum significance level of  $\alpha = 0.05$  was set throughout this study.

## 3. Results and discussion

### 3.1. DDT content

DDTs were detected in all soils except in the two samples collected at DNP intended as background levels. Values of concentrations and frequencies of detection for *p,p'*- and *o,p'*-DDTs are shown in Table 1. The concentrations found in this study (0.08–11.1 ng/g d.w.) were remarkably lower, up to two orders of magnitude, than those reported in soils sampled from the same area in 1990 (3.49–46.0 ng/g d.w.) (Hernández et al., 1992). These decreased concentrations were a priori expected based on the ban placed on DDT in Spain since 1977. Interestingly, they were also lower than the current DDT concentrations reported in agricultural

soils from the Ebro River basin, in north-eastern Spain (0.11–58.2 ng/g d.w.) (Hildebrant et al., 2009). Additionally, they were relatively very low values compared to those reported in recent studies worldwide focusing on agricultural or orchard soils (Table 2). According to the standard of Canadian Soils Quality Guidelines for agricultural areas (Environment Canada, 2007), the DDT concentrations found in this study are well below the reference value of 700 ng/g regarded for contaminated soils.

A marked variability was observed in terms of type of crop soils, reaching a 33-fold difference between rice and olive grove, the most and the least contaminated soils, respectively. Specifically, DDT contents (median and range in ng/g d.w.) scaled up depending on the crop soil as follows: olive grove (0.16 and 0.10–0.61 ng/g) < strawberry (0.32 and 0.09–1.19 ng/g) < vineyard (0.60 and 0.08–0.62 ng/g) < citrus (1.09 and 0.12–10.7) < cotton (1.34 and 0.28–1.89) < rice (5.30 and 1.09–11.1). The values found for rice soils despite ranking as the highest in the study area, were up to two orders of magnitude lower compared to published data of DDT content of 13–238 ng/g in soils of the same crop in India (Babu et al., 2003). Levels were in agreement, however, with data reported (2.8–7.9 ng/g) in soils from the Chinese region of Tianjin (Chen et al., 2007).

There are several factors that may account for the variability detected in DDT concentrations in soils within the same region; e.g. each soil's physicochemical properties and microbial population, the suitability of each crop to be treated with Dicofol or the physical characteristics in the cultivation of each crop (degree of plowing for instance). Therefore, the variability in total DDT contents observed in this study is in agreement with data previously reported in the literature (Table 2).

### 3.2. Isomeric profiles

Parent *p,p'*-DDT and its metabolite *p,p'*-DDE were found with a frequency of 100% whilst the rest of species were quantified in a dissimilar manner (Table 1). Interestingly, albeit recent DDT levels registered in north-eastern Spain were higher than those reported in this study, the authors did find *p,p'*-DDT and *p,p'*-DDE in only 53

**Table 2**  
Concentrations of DDTs (ng/g d.w.) in different agricultural study soils worldwide.

Location	Sampling year	DDTs (ng/g d.w.)				Reference	
		Mean	Median	Geometric mean	Range		
Spain	Top soil ~ 10 cm	2007/08	1.79	0.52	0.59	0.08–11.1	This study
Spain	Top soil ~ 5 cm	1990	18.2	14.7	14.8	3.49–46.0	Hernández et al., 1992
Spain	Top soil ~ 10 cm	2004/05/06	–	–	–	0.11–58.2	Hildebrant et al., 2009
Mexico	Top soils ~ 10 cm	2006	70.5	66.5	–	31.8–136	Waliszewski et al., 2008
Nigeria	Top soils ~ 15 cm. Illegal DDT use suggested	2004/05	70.3	–	–	31.1–562	Oyekunle et al., 2010
China	Top soils ~ 10 cm	2007	–	–	–	4.04–156	Sun et al., 2009
China	Top soils 5–30 cm	2004	–	67.3	64.6	7.61–663	Gao et al., 2008
China	Top soils ~ 15 cm	2007	21.4	–	–	0.44–247	Jiang et al., 2009
China	Top soils ~ 10 cm	2006	186	142	–	6.29–679	Yang et al., 2008
Canada	Top soils ~ 20 cm	1999/2000	–	–	–	5–18,200	Bidleman et al., 2006
New Zealand	Top soils ~ 7.5 cm	2001/02	–	–	–	<30–34,500	Gaw et al., 2006
Czech Republic	Top soils ~ 25 cm	1992–20097	113.7	34.2	–	4.0–1020	Holoubek et al., 2009

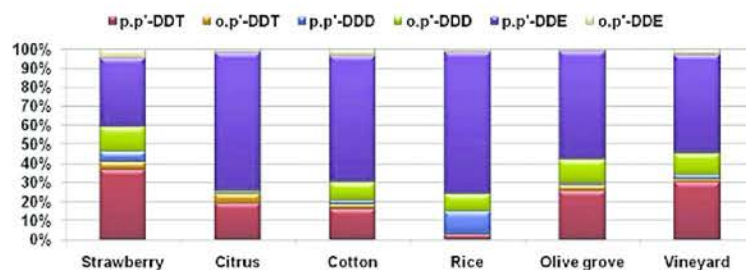


Fig. 2. DDT isomeric profile in each crop soil.

and 88% of the soils, respectively. Therefore, it seems that inputs of this pesticide may have been higher in the north-eastern area, but they also seem to have ceased earlier than inputs in south-western Spain.

Regarding each type of crop soil, DDT isomer profiles (Fig. 2) were similar among most of them with  $p,p'$ -DDE accounting for the highest contribution to DDT content, followed by  $p,p'$ -DDT and comparatively small contributions from the rest of DDT species. Nonetheless, a different proportion that seemed to point out a recent use of this pesticide was found in the case of strawberries soils, which showed a roughly equal amount of the two dominant  $p,p'$  isomers of DDT and DDE (~36.5%). Also different were rice soils in which  $p,p'$ -DDT was almost negligible (<3%), showing instead a relatively high contribution of  $p,p'$ -DDD (~12%).  $p,p'$ -DDD is commonly considered an anaerobic degradation product of  $p,p'$ -DDT; hence, its relatively high fraction in rice soils could be due to the anaerobic conditions occurring in irrigated soils.

### 3.3. DDT age and origin

Ratios between DDT isomers are commonly employed in the literature to gauge the age and origin of DDT contents. Specifically, the ratio  $R_{p,p'/p,p'} = [p,p'\text{-DDE} + p,p'\text{-DDD}] / [p,p'\text{-DDT}]$  is taken as indicator of fresh or weathered residues (Qiu et al., 2004). Although there are not solid guidelines as to what defines recent or old inputs, the value of 1 is normally assumed as the reference to distinguish between legacy and recent inputs. The median  $R_{p,p'/p,p'}$  found in this study was 2.74, ranging from 0.39 to 66.3. Over 43% of the samples showed values <2 for this ratio and ~17% values <1. All these soils were from crops of strawberry, vineyard and olive grove. These results may suggest a recent DDT use in the area, and especially in the crops mentioned. Examples of new uses (largely illegal) were discovered in the past also in USA (Clark and Krynitsky, 1983) or Eastern Europe (Falandsz et al., 2001).

On the other hand, the ratio  $R_{o,p'/p,p'} = [o,p'\text{-DDT}] / [p,p'\text{-DDT}]$  is considered an indicator to discriminate between dicofol or technical DDT usage. Very different  $R_{o,p'/p,p'}$  values in dicofol formulations can be found in the literature with average values ranging from 0.2 to 7.0 (Qiu et al., 2005; Turgut et al., 2009). Given that  $R_{o,p'/p,p'}$  in technical DDT is typically ~0.19 (Wong et al., 2009) and that  $o,p'$ -DDT shows a shorter half life than  $p,p'$ -DDT in the environment (Li et al., 2006), it seems reasonable to assume influence of dicofol type contamination when encountering  $R_{o,p'/p,p'} > 0.2$ . Soils in this study showed a median  $R_{o,p'/p,p'}$  of 0.10 ranging from 0 to 0.71. Values of this ratio >0.2 were observed in ~27% of the soils thereby indicating a possible dicofol contamination; specifically, in 75, ~67 and ~27% of soils from citrus, cotton and strawberry crops, respectively. Interestingly, all of these were crops where the use of dicofol is currently permitted in Spain.

### 3.4. Enantiomeric fractions (EFs)

Concentrations of  $o,p'$ -DDT were high enough in 22 of the 32 soils to determine their EFs with values ranging from 0.324 to 0.590 (Table S2). The enantiomeric enrichment was statistically significant in 17 soils (Fig. 3). Of these, 9 EFs were <0.500 and 8 EFs >0.500. This distribution nearly at 50% was in agreement with previous studies that showed how the degradation in soils of each  $o,p'$ -DDT enantiomer tends to be equiprobable (Wiberg et al., 2001; Kurt-Karakus et al., 2005; Wong et al., 2008, 2009). Therefore, deviations from the racemic value (DEVrac) are also provided. DEVrac is defined as the absolute value of the difference between 0.500 (the racemic value) and a sample's EF (Kurt-Karakus et al., 2005). DEVrac values ranged from 0.012 to 0.176. Assuming that higher DEVrac values could be related to a longer enantiomeric degradation and therefore to an older input of DDT, a possible correlation between DEVrac and  $R_{p,p'/p,p'}$  was explored. However, the result was not significant ( $p = 0.937$ ).

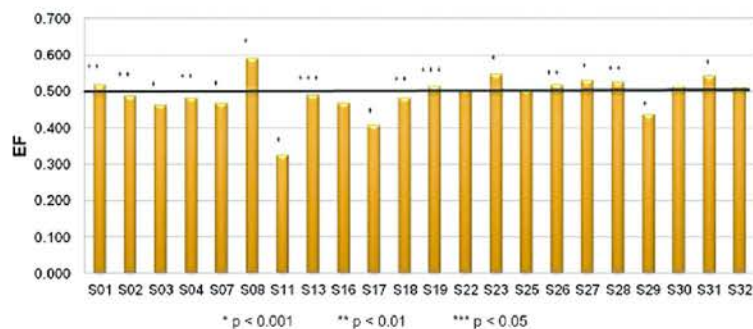


Fig. 3. EF values in the study soils.



3.5. Correlations and patterns

Fig. 4 shows the significant relationships found among the study variables, after log transformation to meet the criterion of normality. The correlation  $\log([\text{DDTs}])$  vs.  $\log(\text{SOM})$  was expected as it is well documented the tendency of DDTs to bind to organic matter in soils. The positive correlation between  $\log(R_{p,p'/p,p'})$  and

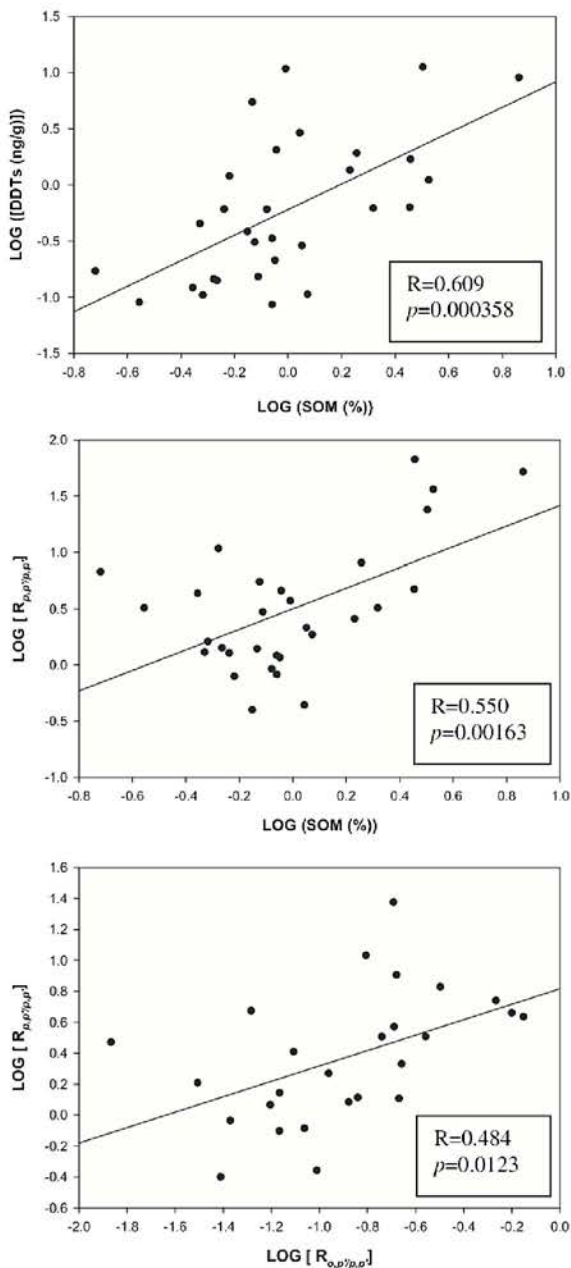


Fig. 4. Pearson's correlations statistically significant ( $p < 0.05$ ) obtained among the different study variables.

$\log(\text{SOM})$  could be explained based on the higher microbial activity normally associated to higher SOM. Higher microbial activity would mean higher rates of degradation thereby favoring enrichments of its more recalcitrant metabolites, DDE and DDD, over DDT. A positive relationship between  $\log(R_{p,p'/p,p'})$  and  $\log(R_{o,p'/p,p'})$  was found, albeit it was the least significant among the three correlations found and also the one with the lowest  $R$  coefficient. A plausible explanation for this finding is the presence of  $p,p'$ -Cl-DDT (1,2,2,2-tetrachloro-1,1-bis(4-chlorophenyl)ethane) as an abundant impurity in dicofol formulations (Qiu et al., 2005). Degradation of  $p,p'$ -Cl-DDT would lead to the formation of  $p,p'$ -DDE. Thus, dicofol usage could be responsible for both increased values of  $R_{o,p'/p,p'}$  and  $R_{p,p'/p,p'}$  in some soils. PCA was applied on the isomeric relative abundance in each soil to explore a possible

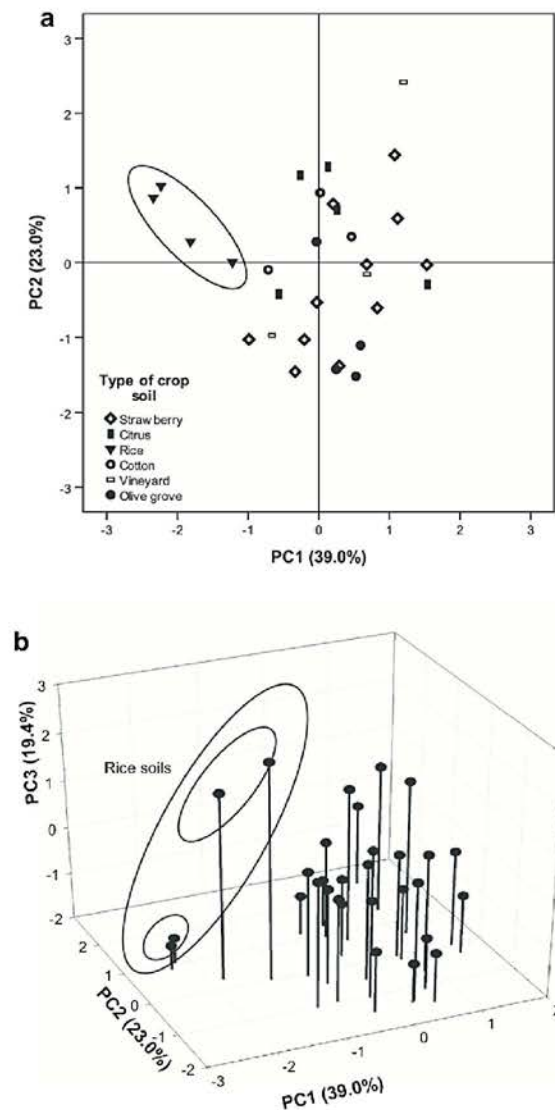


Fig. 5. Factor loadings and scores from the principal component analysis on the relative abundance of DDTs in crop soils: a) PC1 vs. PC2 and b) PC1 vs. PC2 vs. PC3.

pattern depending on the type of crop. The three first principal components had eigenvalues above 1 and accounted for 81.4% of the variance. However, in the two-dimensional (PC1 vs. PC2) and three-dimensional (PC1 vs. PC2 vs. PC3) representations (Fig. 5a and b) the only soils that could be clustered apart from the others were the corresponding to rice crops. This segregation was likely due to the higher abundance of *p,p'*-DDD and depletion of *p,p'*-DDT in these samples. At the same time the similarity in the relative contribution of DDT isomers detected within and among the rest of crop soils was responsible for the lack of any other clear pattern.

#### 4. Conclusions

DDT levels found in soils under the most characteristic crops from south-western Spain with an elevated agricultural activity were generally low in comparison to values reported in agricultural soils around the world. The range of total DDT content found was very wide within all crops. In spite of this, marked differences in concentrations were found among crops, reaching up to 33-fold between the most (rice) and the least (olive grove) contaminated soils. More than 30 years after the DDT ban in Spain, a plausible recent input of technical DDT was found in about 17% of the soils based on the values of the isomeric ratio  $R_{p,p'/p,p'}$ . Additionally, a dicofol type contamination was found in about 27% of the soils based on values of the ratio  $R_{o,p'/p,p'}$ . The possible detection of dicofol was consistent with the crops where its use is currently permitted. EFs calculated based on the *o,p'*-DDT content were different and ambivalent ( $0.500 < EFs > 0.500$  at ~50%) from the racemic value in most soils. They were transformed into DEVrac to quantify possible relationships with other study variables. Yet, the lack of correlations found seems to prove that, for DDT at least, EFs do not provide a good measure of overall degradation rates in soils. A significant correlation between  $R_{p,p'/p,p'}$  and  $R_{o,p'/p,p'}$  was found. A reasonable explanation proposed for this outcome is that due to the impurities present in dicofol formulations, the fingerprint left by the use of this acaricide may alter values of both ratios.

Despite being restricted worldwide and for long periods of time in the case of many countries, DDT continues to be a ubiquitous contaminant whose environmental concentrations are reported to have not declined in some areas. Overall, this study contributed to update the current knowledge about the occurrence and fate of DDTs in agricultural areas. Given that the main route of human exposure to DDTs is via dietary intake, the monitoring of DDTs burden in soils and especially in those used for human food crops should be regarded still today as a necessary precaution.

#### Acknowledgments

The authors would like to thank CSIC for their financial support (PIF, Ref. 200680F0162). The Monitoring team (ICTS, Reserva Biológica de Doñana, EBD-CSIC) is thanked for their help during the first stages of the field sampling.

#### Appendix. Supplementary information

Supplementary information associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.envpol.2011.07.027.

#### References

Babu, G.S., Farooq, M., Ray, R.S., Joshi, P.C., Viswanathan, P.N., Hans, R.K., 2003. DDT and HCH residues in Basmati rice (*Oryza sativa*) cultivated in Dehradun (India). Water, Air, and Soil Pollution 144, 149–157.

- Beard, J., 2006. DDT and human health. Science of the Total Environment 355, 78–89.
- Bidleman, T.F., Leone, A.D., Wong, F., Van Vliet, L., Szeto, S., Ripley, B.D., 2006. Emission of legacy chlorinated pesticides from agricultural and orchard soils in British Columbia, Canada. Environmental Toxicology and Chemistry 25 (6), 1448–1457.
- Blasius, M.E., Goodmanlowe, G.D., 2008. Contaminants still high in top-level carnivores in the southern California bight: levels of DDT and PCBs in resident and transient pinnipeds. Marine Pollution Bulletin 56, 1973–1982.
- Boletín Oficial del Estado (BOE) Núm 308, December 24th, 1975. Ministerio de Agricultura. Orden del 4 de diciembre por la que se restringe el uso de ciertos plaguicidas (in Spanish).
- Chen, S.H., Xu, F.L., Dawson, R., Jiao, X.C., Tao, S., 2007. Adsorption and absorption of dichlorodiphenylethane (DDT) and metabolites (DDD and DDE) by rice roots. Environmental Pollution 146, 256–261.
- Clark, D.R., Krynitsky, A.J., 1983. DDT: recent contamination in New Mexico and Arizona? Environment 25, 27–31.
- Council Directive 79/117/EEC of 21 December 1978 prohibiting the placing on the market and use of plant protection products containing certain active substances. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/consleg/1979/L/01979L0117-20040520-en.pdf>.
- de Geus, H.-J., Wester, P.G., de Boer, J., BrinkmanTh, U.A., 2000. Enantiomer fractions instead of enantiomer ratios. Chemosphere 41, 725–727.
- Environment Canada, 2007. Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health. [http://www.ccme.ca/assets/pdf/rev\\_soil\\_summary\\_tbl\\_7.0\\_e.pdf](http://www.ccme.ca/assets/pdf/rev_soil_summary_tbl_7.0_e.pdf) (last accessed February 15, 2011).
- Eskenazi, B., Chevrier, J., Rosas, L.G., Anderson, H.A., Bornman, M.S., Bouwman, H., Chen, A., Cohn, B.A., de Jager, C., Henshel, D.S., Leipzig, F., Leipzig, J.S., Lorenz, E.C., Snedeker, S.M., Stapleton, D., 2009. The Pine River statement: human health consequences of DDT use. Environmental Health Perspectives 117, 1359–1367.
- Falandysz, J., Brudnowska, B., Kawano, M., Wakimoto, T., 2001. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in soils and sediments from the cities of Kraków, Chorzów and Katowice in southern Poland. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 40, 173–178.
- Gómara, B., González, M.J., Baos, R., Hiraldo, F., Abad, E., Rivera, J., Jiménez, B., 2008. Unexpected high PCB and total DDT levels in the breeding population of red kite (*Milvus milvus*) from Doñana National Park, south-western Spain. Environment International 1, 73–78.
- Gao, F., Jia, J., Wang, X., 2008. Occurrence and ordination of dichlorodiphenyl-trichloroethane and hexachlorocyclohexane in agricultural soils from Guangzhou, China. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 54, 155–166.
- Garrison, A.W., Nzengung, V.A., Avants, J.K., Ellington, J.J., Jones, W.J., Rennels, D., Wolfe, N.L., 2000. Phytodegradation of *p,p'*-DDT and the enantiomers of *o,p'*-DDT. Environmental Science & Technology 34, 1663–1670.
- Gaw, S.K., Wilkins, A.L., Kim, N.D., Palmer, G.T., Robinson, P., 2006. Trace element and DDT concentrations in horticultural soils from the Tasman, Waikato and Auckland regions of New Zealand. Science of the Total Environment 355, 31–47.
- Geisz, H.N., Dickhut, R.M., Cochran, M.A., Fraser, W.R., Ducklow, H.W., 2008. Melting Glaciers: a probable source of DDT to the Antarctic marine ecosystem. Environmental Science & Technology 42, 3958–3962.
- Guo, Y., Yu, H.-Y., Zeng, E.Y., 2009. Occurrence, source diagnosis, and biological effect assessment of DDT and its metabolites in various environmental compartments of the Pearl River Delta, south China: a review. Environmental Pollution 157, 1753–1763.
- Harner, T., Wideman, J.L., Jantunen, L.M.M., Bidleman, T.F., Parkhurst, W.J., 1999. Residues of organochlorine pesticides in Alabama soils. Environmental Pollution 106, 323–332.
- Hernández, L.M., Fernández, M.A., González, M.J., 1992. Organochlorine pollutants in water, soils and earthworms in the Guadalquivir River, Spain. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 49, 192–198.
- Hildebrandt, A., Lacorte, S., Barceló, D., 2009. Occurrence and fate of organochlorinated pesticides and PAH in agricultural soils from the Ebro River basin. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 57, 247–255.
- Holoubek, I., Dušek, L., Sánka, M., Hofman, J., Čupr, Pavel, Jarkovský, J., Zbiral, J., Klánová, J., 2009. Soil burdens of persistent organic pollutants - their levels, fate and risk. Part I. Variation of concentration ranges according to different soil uses and locations. Environmental Pollution 157, 3207–3217.
- Jiang, Y.-F., Wang, X.-T., Jia, Y., Wang, F., Wu, M.-H., Sheng, G.-Y., Fu, J.-M., 2009. Occurrence, distribution and possible sources of organochlorine pesticides in agricultural soil of Shanghai, China. Journal of Hazardous Materials 170, 989–997.
- Kozul, D., Romanie, S.H., Kijakovic-Gaspic, Z., Veza, J., 2009. Levels of organochlorine compounds in the Mediterranean blue mussel from the Adriatic Sea. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 83, 880–884.
- Kurt-Karakus, P.B., Bidleman, T.F., Jones, K.C., 2005. Chiral organochlorine pesticide signatures in global background soils. Environmental Science & Technology 39, 8671–8677.
- Li, J., Zhang, G., Qi, S., Li, X., Peng, X., 2006. Concentrations, enantiomeric compositions, and sources of HCH, DDT and chlordane in soils from the Pearl River Delta, south China. Science of the Total Environment 372, 215–224.
- Muñoz-Arnanz, J., Bosch, C., Fernández, P., Grimalt, J.O., Jiménez, B., 2009. Optimization of a heart-cutting multidimensional gas chromatography-based method



- for the assessment of enantiomeric fractions of *o,p'*-DDT in environmental samples. *Journal of Chromatography A* 33, 6141–6145.
- Oyekunle, J.A.O., Ogunfowokan, A.O., Torto, N., Akanni, M.S., 2010. Determination of organochlorine pesticides in the agricultural soil of Oke-Osun farm settlement, Osogbo, Nigeria. *Environmental Monitoring and Assessment* 117 (1–4), 51–61.
- Qiu, X., Zhu, T., Li, J., Pan, H., Li, Q., Miao, G., Gong, J., 2004. Organochlorine pesticides in the air around the Taihu Lake, China. *Environmental Science & Technology* 39, 1368–1374.
- Qiu, X., Zhu, T., Yao, B., Hu, J., Hu, S., 2005. Contribution of Dicolol to the current DDT pollution in China. *Environmental Science & Technology* 39, 4385–4390.
- Ritter, R., Scheringer, M., MacLeod, M., Hungerbühler, K., 2011. Assessment of nonoccupational exposure to DDT in the tropics and the north: relevance of uptake via inhalation from indoor residual spraying. *Environmental Health Perspectives* 2011 (119), 707–712.
- Sibali, L.L., Okonkwo, J.O., Zvinowanda, C., 2009. Determination of DDT and metabolites in surface water and sediment using LLE, SPE, ACE and SE. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 83, 885–891.
- Sun, K., Zhao, Y., Gao, B., Liu, X., Zhang, Z., Xing, B., 2009. Organochlorine pesticides and polybrominated diphenyl ethers in irrigated soils of Beijing, China: levels, inventory and fate. *Chemosphere* 77, 1199–1205.
- Turgut, C., Gokbulut, C., Cutright, T.J., 2009. Contents and sources of DDT impurities in dicofol formulations in Turkey. *Environmental Science and Pollution Research* 16, 214–217.
- UNEP, 2001. Dichloro-diphenyl-trichloroethane (DDT). <http://chm.pops.int/Programmes/DDT/Overview/tabid/378/language/en-US/Default.aspx> (last accessed 15.02.11).
- US Environmental Protection Agency, Office of research and Development, 1996. Method for the Determination of Organochlorine Pesticides by Capillary Column Gas Chromatography. EPA8081A. US Government Printing Office, Washington, DC, pp. 1–44.
- Van den Berg, H., 2009. Global status of DDT and its alternatives for use in vector control to prevent disease. *Environmental Health Perspectives* 117, 1656–1663.
- Van der Gon, H.D., Van her Bolscher, M., Visschedijk, A., Zandveld, P., 2007. Emissions of persistent organic pollutants and eight candidate POPs from UNECE-Europe in 2000, 2010 and 2020 and the emission reduction resulting from the implementation of the UNECE POP protocol. *Atmospheric Environment* 41, 9245–9261.
- Waliszewski, S.M., Carvajal, O., Gómez-Arroyo, S., Amador-Muñoz, O., Villalobos-Pietrini, R., Hayward-Jones, P.M., Valencia-Quintana, R., 2008. DDT and HCH isomer levels in soils, carrot root, and carrot leaf samples. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 81, 343–347.
- Walkley, A., 1947. A critical examination of a rapid method for determination of organic carbon in soils - effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents. *Soil Science* 63, 251–257.
- Wiberg, K., Harner, T., Wideman, J.L., Bidleman, T.F., 2001. Chiral analysis of organochlorine pesticides in Alabama soils. *Chemosphere* 45, 843–848.
- Wong, F., Alegria, H.A., Jantunen, L.M., Bidleman, T.F., Salvador-Figueroa, M., Gold-Bouchot, G., Ceja-Moreno, V., Waliszewski, S.M., Infanzon, R., 2008. Organochlorine pesticides in soils and air of southern Mexico: chemical profiles and potential for soil emissions. *Atmospheric Environment* 42, 7737–7745.
- Wong, F., Robson, M., Diamond, M.L., Harrad, S., Truong, J., 2009. Concentrations and chiral signatures of POPs in soils and sediments: a comparative urban versus rural study in Canada and UK. *Chemosphere* 74, 404–411.
- Yang, X., Wang, S., Bian, Y., Chen, F., Yu, G., Gu, C., Jiang, X., 2008. Dicofol application resulted in high DDTs residue in cotton fields from northern Jiangsu province, China. *Journal of Hazardous Materials* 150, 92–98.
- Yi, H., Xi, Z., 2008. Trends of DDT research during the period of 1991 to 2005. *Scientometrics* 75, 111–122.

## Supplementary Information

### New DDT inputs after 30 years of prohibition in Spain. A case study in agricultural soils from south-western Spain

Juan Muñoz-Arnanz and Begoña Jiménez

#### Affiliations

Department of Instrumental Analysis and Environmental Chemistry, Institute of Organic Chemistry, CSIC. Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

#### Contents

1. Experimental section.....	97
1.1. Sampling collection .....	97
Table S1. Location coordinates, land use and sampling year of each soil sample analyzed in this study	
1.2. QA/QC .....	99
Table S2. Enantiomeric fractions (EF) of <i>o,p'</i> -DDT in soil samples	

## 1. Experimental section

### 1.1. Sample collection

**Table S1.** Location coordinates, land use and sampling year of each soil sample analyzed in this study

Sample code	Coordinates	Land use	Year
S01	N37° 07.892' W06° 32.572'	strawberry	2007
S02	N37° 03.641' W06° 18.295'	citrus	2007
S03	N36° 58.916' W06° 28.947'	Non-agricultural soil from DNP	2007
S04	N37° 10.399' W06° 50.945'	strawberry	2007
S05	N37° 15.748' W06° 48.099'	strawberry	2007
S06	N37° 17.663' W06° 42.726'	strawberry	2007
S07	N37° 17.701' W06° 37.227'	vineyard	2007
S08	N37° 16.972' W06° 36.069'	strawberry	2007
S09	N37° 18.731' W06° 34.210'	olive grove	2007
S10	N37° 10.738' W06° 29.521'	strawberry	2007
S11	N37° 17.580' W06° 17.767'	olive grove	2007
S12	N37° 16.267' W06° 13.769'	citrus	2007
S13	N37° 13.486' W06° 09.526'	rice	2007
S14	N37° 10.716' W06° 12.367'	cotton	2007
S15	N37° 06.546' W06° 14.218'	rice	2007
S16	N37° 06.471' W06° 18.067'	cotton	2007
S17	N37° 09.111' W06° 32.535'	strawberry	2007
S18	N37° 09.344' W06° 48.020'	strawberry	2008
S19	N37° 09.897' W06° 48.421'	strawberry	2008

S20	N37° 14.257' W06° 47.988'	strawberry	2008
S21	N37° 15.743' W06° 48.109'	strawberry	2008
S22	N36° 58.876' W06° 28.934'	Non-agricultural soil from DNP	2008
S23	N37° 06.088' W06° 36.740'	citrus	2008
S24	N37° 19.675' W06° 32.438'	vineyard	2008
S25	N37° 23.235' W06° 33.279'	citrus	2008
S26	N37° 23.319' W06° 34.671'	olive grove	2008
S27	N37° 19.576' W06° 36.003'	vineyard	2008
S28	N37° 19.576' W06° 36.003'	olive grove	2008
S29	N37° 16.227' W06° 13.739'	citrus	2008
S30	N37° 13.511' W06° 09.480'	rice	2008
S31	N37° 11.575' W06° 11.546'	rice	2008
S32	N37° 11.192' W06° 12.652'	cotton	2008

## 1.2. QA/QC

**Table S2.** Enantiomeric fractions (EF) of *o,p'*-DDT in soil samples. Standard deviations (SD) and relative standard deviations (RSD) are calculated based on three injections of each sample.

Sample code	Mean EF	SD	RSD (%)
S01	0.517	0.005	0.949
S02	0.486	0.001	0.105
S03	0.463	0.014	3.129
S04	0.482	0.005	1.096
S07	0.467	0.003	0.606
S08	0.590	0.007	1.138
S11	0.324	0.014	4.353
S13	0.488	0.004	0.811
S16	0.467	0.004	0.876
S17	0.407	0.002	0.606
S18	0.481	0.001	0.265
S19	0.513	0.003	0.511
S22	0.503	0.001	0.169
S23	0.547	0.005	0.972
S25	0.500	0.000	0.077
S26	0.518	0.004	0.863
S27	0.528	0.002	0.430
S28	0.526	0.005	0.995
S29	0.436	0.013	2.936
S30	0.512	0.008	1.569
S31	0.543	0.012	2.295

*Capítulo 4*

*Contaminantes Emergentes en Doñana:  
PBDEs y DP*



## 4.1. INTRODUCCIÓN

---

Durante los años 70 y 80, como ya se ha mencionado, se llevaron a cabo diversas investigaciones sobre la presencia de compuestos organoclorados como los DDTs o PCBs en el END, al igual que estudios sobre la contaminación por metales pesados efectuados también durante esas décadas, que de forma muy marcada proliferaron tras el *Desastre de Aznalcollar*. Sin embargo, los trabajos que se presentan en la presente memoria de tesis doctoral han sido los primeros, y de momento los únicos, publicados en relación a la presencia de contaminantes organohalogenados emergentes tales como PBDEs y DP en el área de Doñana.

Tras el *Desastre de Aznalcollar*, se establecieron diferentes investigaciones y tareas encaminadas a la monitorización, control y seguimiento de distintos contaminantes. Es por ello que el equipo de Seguimiento de la Estación Biológica de Doñana, en colaboración con el IQOG-CSIC planteó e inició la recolección de huevos infértiles de cigüeña blanca del END en los años 1999 y 2001. La oportunidad de disponer de esta colección de huevos, motivó y permitió iniciar la investigación sobre el contenido de PBDEs en los mismos por la potencial y muy valiosa información que podría obtenerse dadas las características que convierten a la cigüeña blanca en un organismo bioindicador muy apropiado. Además, los huevos infértiles, en general, representan un tipo de matriz muy conveniente para el estudio de este tipo de contaminantes por su elevado contenido en grasa, disponibilidad de una cantidad de muestra adecuada y por constituir, igualmente, una técnica de muestreo mínimamente invasiva.

De acuerdo con la reciente revisión llevada a cabo por Chen y Hale, la evaluación del contenido de PBDEs en huevos de aves ha sido llevada a cabo por diferentes autores (Chen y Hale 2010). Así, fundamentalmente se han investigado diferencias en la distribución interregional de estos xenobióticos (Elliott, Wilson et al. 2005; Van den Steen, Covaci et al. 2007), pero también comportamientos de bioacumulación y biomagnificación de los diferentes congéneres de PBDEs en función de los tejidos y de la especie (Voorspoels, Covaci et al. 2006; Chen, Mai et al. 2007; Gao,



Luo et al. 2009), y en mucha menor medida, su potencial tóxico en aves (Fernie, Shutt et al. 2009; McKernan, Rattner et al. 2009).

En el caso del presente trabajo de tesis doctoral, se aprovechó, además, la disponibilidad de una colección adicional de huevos infértiles del año 2005 de una colonia de *Ciconia ciconia* que cría en la región de Madrid, obtenidos gracias a la colaboración con el Dr. Jose Ignacio Aguirre, Profesor de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid. Esto permitió plantear un estudio comparativo de la presencia de PBDEs en la misma especie indicadora procedente de dos áreas con diferente impacto humano. A priori, dichas áreas presentan diferencias manifiestas en cuanto al tipo e intensidad de influencias antropogénicas a las que se encuentran sometidas: Doñana y su entorno como un área rural y eminentemente protegida pero con alto impacto de actividades agrícolas, en contraste con la región de Madrid de un marcado carácter urbano e industrial.

En los estadios iniciales de planificación y diseño del citado estudio de evaluación y comparación de PBDEs en huevos infértiles de cigüeña blanca de Madrid y Doñana, y en base a los trabajos publicados hasta entonces, existían determinadas carencias en cuanto al conocimiento existente en relación a la presencia de estos contaminantes bromados en aves. Por ejemplo, existía una patente escasez de datos disponibles de especies pertenecientes a cadenas tróficas terrestres, en comparación a la mucha más abundante información generada a partir de estudios enfocados en aves marinas o especies de cadenas tróficas estrictamente acuáticas (Chen y Hale 2010). Así, recurrentemente se había encontrado un perfil de abundancia en cuanto a los congéneres de PBDEs dominado por los congéneres -47, -99, -100, -153 y -154 (de Wit, Alaee et al. 2006). Por el contrario el BDE-209 generalmente se había detectado con escasa frecuencia y en muy bajas concentraciones por lo que se le predijo una muy leve capacidad de bioacumulación y biomagnificación, al menos en redes tróficas acuáticas (Hale, Alaee et al. 2003; Ross, Couillard et al. 2009). Esto se explicaba en base a la elevada masa molecular de dicho congénere (959 Da) y a su extrema hidrofobicidad ( $\log K_{ow} = 9,97$ ), lo que se traduciría en una muy baja biodisponibilidad para esta molécula que tendería a estar fuertemente asociada a material particulado en suelos y sedimentos. Por otro lado, también se sugirió que la ausencia de biomagnificación observada en niveles tróficos elevados de redes acuáticas podría responder a su previa transformación

por vía fotolítica (Söderström, Sellström et al. 2004) o microbiológica (Gerecke, Hartmann et al. 2005) en congéneres menos bromados y más biodisponibles y bioacumulables. Finalmente, también se postuló una ausencia de altas concentraciones de BDE-209 en los niveles altos de redes tróficas derivada de un metabolismo más eficiente de este compuesto en los organismos correspondientes a dichos niveles (Tomy, Pleskach et al. 2008; Tomy, Pleskach et al. 2009).

No obstante, en el 2004 Lindberg y colaboradores detectaron la presencia del BDE-209 en huevos de halcón peregrino (*Falco peregrinus*) de Suecia, lo que supuso el hallazgo, por primera vez, de este congénere en un predador terminal de una red trófica terrestre (Lindberg, Sellström et al. 2004). Desde entonces otros autores han encontrado la presencia del BDE-209 y otros congéneres de alto grado de bromación (octa- y nona-) en la misma u otras especies (Herzke, Berger et al. 2005; Naert, Van Peteghem et al. 2007; Gao, Luo et al. 2009; Holden, Park et al. 2009; Johansson, Sellström et al. 2009), pero generalmente siempre en aves rapaces. Además, sólo en los casos de aves de presa de China (Chen, Mai et al. 2007) y de E.E.U.U. (Chen, La Guardia et al. 2008) estos congéneres de alto grado de bromación habían sido cuantificados de forma mayoritaria en relación al contenido total de PBDEs. Pese a ello y tal como se ha mencionado con anterioridad, el conocimiento en relación a la presencia, bioacumulación y metabolización de este tipo de congéneres en biota y concretamente en aves seguía siendo muy limitado.

Consecuentemente, la investigación aquí planteada, además de planificarse para estudiar diferencias entre las dos regiones, se diseñó para estudiar un elevado número de PBDEs en una especie como la cigüeña blanca que ocupa una alta posición en su cadena trófica, poniendo especial interés en los congéneres con menor frecuencia estudiados hasta el momento: los de mayor grado de bromación, los cuales incluirían no solo al BDE-209 sino también a todos los congéneres octa- y nona- bromosustituidos. Para ello se contó con la colaboración del Dr. Mehran Alaei, de Environment Canadá (Burlington, Ontario) que puso a disposición instrumentación de espectrometría de masas de alta resolución con un equipo de sector magnético para el análisis de los citados congéneres, de octa- a deca- bromosustituidos, con un alto grado de sensibilidad y selectividad. Por otro lado, el análisis instrumental de los congéneres de PBDEs de menor grado de bromación, de tri- a hepta- bromosustituidos, se acometió por

espectrometría de masas de baja resolución utilizando la ionización química negativa (NCI) como método de ionización, modalidad en la que nuestro grupo de trabajo posee una reconocida experiencia (Gómara, Herrero et al. 2007). La NCI es una técnica de ionización molecular más suave que el impacto electrónico (EI). A diferencia de éste, en la NCI se produce la ionización previa de un gas (normalmente metano, amoníaco o isobutano) que actúa posteriormente ionizando los analitos de interés produciendo, generalmente, iones moleculares de los mismos más intensos que los obtenidos por EI. En el caso concreto de los PBDEs, la NCI no solo proporciona iones moleculares intensos de los diferentes congéneres, lo que incrementa la selectividad de su análisis, sino que además proporciona iones muy intensos correspondientes a la pérdida e ionización de átomos de bromo, lo que está directamente ligado a la alta sensibilidad que esta técnica proporciona para el análisis de estos retardantes de llama (Hites 2008).

Adicionalmente, y empleando igualmente la espectrometría de masas de alta resolución accesible a través del laboratorio del Dr. Mehran Alaee, se decidió ampliar la selección de contaminantes emergentes considerando el declorano plus, el cual desde su detección en muestras de aire, sedimentos y biota de los Grandes Lagos canadienses en el 2006 había suscitado un enorme interés en la comunidad científica, y del que se disponía de una reducidísima información en cuanto a su presencia, distribución y comportamiento medioambiental. De manera similar a los PBDEs, la atención sobre la presencia de DP en biota se había centrado, aunque en este caso de manera exclusiva, en organismos pertenecientes a cadenas tróficas acuáticas. Así pues, y siguiendo los pasos de otros autores (Tomy, Pleskach et al. 2007; Wu, Zhang et al. 2010) que habían obtenido una respuesta muy similar del DP en términos analíticos y de manera concreta en su extracción y en su comportamiento en etapas de purificación a la de los PBDEs, se decidió analizar las citadas muestras de huevos infértiles de Doñana y de Madrid. De esta forma, se persiguió el objetivo de obtener, por primera vez, información de la presencia y bioacumulación de este retardante de llama clorado en una especie principalmente terrestre como la cigüeña blanca. A la vez se investigó la presencia de potenciales productos de degradación del mismo que tan solo habían sido detectados con anterioridad en dos ocasiones y en muestras abióticas (sección 2.1.5.).

## REFERENCIAS

- Chen, D. and R. C. Hale (2010). "A global review of polybrominated diphenyl ether flame retardant contamination in birds." Environment International **36**(7): 800-811.
- Chen, D., M. J. La Guardia, et al. (2008). "Polybrominated diphenyl ethers in peregrine falcon (*Falco peregrinus*) eggs from the northeastern US." Environmental Science and Technology **42**(20): 7594-7600.
- Chen, D., B. Mai, et al. (2007). "Polybrominated diphenyl ethers in birds of prey from Northern China." Environmental Science and Technology **41**(6): 1828-1833.
- de Wit, C. A., M. Alaee, et al. (2006). "Levels and trends of brominated flame retardants in the Arctic." Chemosphere **64**(2): 209-233.
- Elliott, J. E., L. K. Wilson, et al. (2005). "Polybrominated diphenyl ether trends in eggs of marine and freshwater birds from British Columbia, Canada, 1979-2002." Environmental Science and Technology **39**(15): 5584-5591.
- Fernie, K. J., J. L. Shutt, et al. (2009). "Environmentally relevant concentrations of DE-71 and HBCD alter eggshell thickness and reproductive success of American kestrels." Environmental Science and Technology **43**(6): 2124-2130.
- Gao, F., X.-J. Luo, et al. (2009). "Brominated flame retardants, polychlorinated biphenyls, and organochlorine pesticides in bird eggs from the Yellow River Delta, North China." Environmental Science and Technology **43**(18): 6956-6962.
- Gerecke, A. C., P. C. Hartmann, et al. (2005). "Anaerobic degradation of decabromodiphenyl ether." Environmental Science and Technology **39**(4): 1078-1083.
- Gómara, B., L. Herrero, et al. (2007). "Feasibility of electron impact and electron capture negative ionisation mass spectrometry for the trace determination of tri- to decabrominated diphenyl ethers in human samples." Analytica chimica acta **597**(1): 121-128.
- Hale, R. C., M. Alaee, et al. (2003). "Polybrominated diphenyl ether flame retardants in the North American environment." Environment International **29**(6): 771-779.
- Herzke, D., U. Berger, et al. (2005). "Brominated flame retardants and other organobromines in Norwegian predatory bird eggs." Chemosphere **61**(3): 441-449.
- Hites, R. A. (2008). "Electron impact and electron capture negative ionization mass spectra of polybrominated diphenyl ethers and methoxylated polybrominated diphenyl ethers." Environmental Science and Technology **42**(7): 2243-2252.
- Holden, A., J. S. Park, et al. (2009). "Unusual hepta- and octabrominated diphenyl ethers and nonabrominated diphenyl ether profile in California, USA, peregrine falcons (*Falco peregrinus*): More evidence for brominated diphenyl ether 209 debromination." Environmental Toxicology and Chemistry **28**(9): 1906-1911.
- Johansson, A. K., U. Sellström, et al. (2009). "Polybrominated diphenyl ether congener patterns, hexabromocyclododecane, and brominated biphenyl 153 in eggs of peregrine falcons (*Falco peregrinus*) breeding in Sweden." Environmental Toxicology and Chemistry **28**(1): 9-17.
- Lindberg, P., U. Sellström, et al. (2004). "Higher brominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecane found in eggs of peregrine falcons (*Falco peregrinus*) breeding in Sweden." Environmental Science and Technology **38**(1): 93-96.

- McKernan, M. A., B. A. Rattner, et al. (2009). "Toxicity of polybrominated diphenyl ethers (de-71) in chicken (*Gallus gallus*), mallard (*Anas platyrhynchos*), and American kestrel (*Falco sparverius*) embryos and hatchlings." Environmental Toxicology and Chemistry **28**(5): 1007-1017.
- Naert, C., C. Van Peteghem, et al. (2007). "Distribution of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in birds of prey from Switzerland." Chemosphere **68**(5): 977-987.
- Ross, P. S., C. M. Couillard, et al. (2009). "Large and growing environmental reservoirs of Deca-BDE present an emerging health risk for fish and marine mammals." Marine Pollution Bulletin **58**(1): 7-10.
- Söderström, G., U. Sellström, et al. (2004). "Photolytic debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209)." Environmental Science and Technology **38**(1): 127-132.
- Tomy, G. T., K. Pleskach, et al. (2009). "Trophodynamics of some PFCs and BFRs in a western Canadian Arctic marine food web." Environmental Science and Technology **43**(11): 4076-4081.
- Tomy, G. T., K. Pleskach, et al. (2007). "Isomers of dechlorane plus in Lake Winnipeg and Lake Ontario food webs." Environmental Science and Technology **41**(7): 2249-2254.
- Tomy, G. T., K. Pleskach, et al. (2008). "Enantioselective bioaccumulation of hexabromocyclododecane and congener-specific accumulation of brominated diphenyl ethers in an eastern Canadian Arctic marine food web." Environmental Science and Technology **42**(10): 3634-3639.
- Van den Steen, E., A. Covaci, et al. (2007). "Accumulation, tissue-specific distribution and debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209) in European starlings (*Sturnus vulgaris*)." Environmental Pollution **148**(2): 648-653.
- Voorspoels, S., A. Covaci, et al. (2006). "Levels and distribution of polybrominated diphenyl ethers in various tissues of birds of prey." Environmental Pollution **144**(1): 218-227.
- Wu, J.-P., Y. Zhang, et al. (2010). "Isomer-specific bioaccumulation and trophic transfer of Dechlorane Plus in the freshwater food web from a highly contaminated site, South China." Environmental Science and Technology **44**(2): 606-611.

## 4.2. PREDOMINANCIA DEL BDE-209 Y OTROS POLIBROMODIFENIL ÉTERES DE ALTO GRADO DE BROMACIÓN EN HUEVOS DE COLONIAS DE CIGÜEÑA BLANCA (*Ciconia ciconia*) DE ESPAÑA

---

Tal y como se ha descrito con anterioridad, existía una manifiesta carencia de información en términos de contaminantes emergentes como los PBDEs en el END y su entorno, en contraste con las diferentes investigaciones llevadas a cabo en el mismo área en relación a distintos CO, y muy especialmente a metales pesados. Asimismo, y pese a los numerosos estudios conducidos a escala mundial sobre contaminación por estos retardantes de llama, seguía existiendo un patente déficit de conocimiento en relación a la presencia y niveles en el medio ambiente de los congéneres de mayor grado de bromación, incluyendo al BDE-209, que sólo recientemente se ha empezado a determinar.

El objetivo principal de este trabajo fue la investigación de la contaminación por PBDEs en colonias de cigüeña blanca residentes del END, comparándola con la de colonias de la región de Madrid que, por su marcado carácter urbano/industrial, deberían tener un impacto antropogénico diferente. Para ello se emplearon huevos infértiles como matriz biológica de biomonitorización, incluyendo en su análisis no sólo a los congéneres más comúnmente estudiados hasta la fecha, sino ampliando el alcance del mismo a todos los congéneres octa-, nona- y deca- bromosustituídos.

Un total de 23 y 10 huevos infértiles de *Ciconia ciconia* fueron recogidos en las temporadas de cría de los años 1999 y 2001 en el END y de 2005 en Madrid, respectivamente. Las muestras fueron inicialmente homogeneizadas y liofilizadas. La extracción de los contaminantes se llevó a cabo mediante un proceso de dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) utilizando gel de sílice como agente dispersante, sulfato sódico anhidro como agente dispersante y deshidratante, y una mezcla de acetona:hexano (1:1, v:v) como agente eluyente. Previamente a la extracción, cantidades

conocidas de patrones de PCBs y PCDD/Fs marcados con  $^{13}\text{C}$  fueron añadidas a las muestras para poder controlar el grado de eficiencia de todo el proceso analítico. La purificación de los extractos obtenidos se llevó a cabo por cromatografía en columna tubular rellena con sílices neutra, modificada con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (44% y 22% p:p) y modificada con KOH (36% p:p). Subsiguientemente y mediante utilización de cartuchos de carbón grafitico y diferentes mezclas de eluyentes se obtuvieron tres fracciones a partir de los extractos purificados, conteniendo cada una de ellas distintas familias de contaminantes. El contenido cuantitativo de todos los congéneres de PBDEs se localizó en la primera de las fracciones, obtenida mediante la elución del extracto con 15 mL de hexano y 20 mL de hexano:tolueno (99:1, v:v).

Doce congéneres de PBDEs de tres hasta siete átomos de bromo fueron determinados y cuantificados por GC-NCI-MS, mediante inyecciones de muestra de 1  $\mu\text{L}$  y el empleo de una columna de 15 metros DB-5ms de bajo sangrado. La cuantificación de los congéneres se llevó a cabo mediante la construcción y uso de curvas de calibrado de 7 puntos de concentración, utilizando el  $^{13}\text{C}$ -BDE-139 como patrón interno de inyección. Adicionalmente, dieciséis congéneres de PBDEs de ocho hasta diez átomos de bromo fueron determinados por GC-HRMS, mediante inyecciones de muestra de 1  $\mu\text{L}$  y el empleo de una columna de 15 metros DB-5ht. La cuantificación de los congéneres se llevó a cabo mediante la construcción y uso de curvas de calibrado de 5 puntos de concentración, utilizando el  $^{13}\text{C}$ -BDE-138 como patrón interno de inyección.

Los PBDEs fueron cuantificados en todas las muestras de huevo analizadas, obteniéndose diferencias significativas (t-test,  $p < 0,001$ ) en los valores encontrados para las cigüeñas del END (media de 1,64 ng/g, peso fresco) y de Madrid (media de 9,08 ng/g, peso fresco). También se encontraron diferencias en las contribuciones relativas de cada congénere al contenido total de PBDEs en función del área de estudio, las cuales se postularon asociadas de manera prioritaria a dietas diferenciadas en las cigüeñas de cada región. La contaminación por PBDEs en ambos casos estuvo claramente dominada por aquellos congéneres de mayor grado de bromación, y especialmente por la contribución del BDE-209 que representó una proporción media del 44,1% y del 38,6% en las cigüeñas de END y Madrid, respectivamente. El mismo perfil de abundancia BDE-207>BDE-208>BDE-206 fue hallado en la mayoría de los huevos, sin embargo, dicho

perfil no había sido identificado con anterioridad en ninguna mezcla comercial de PBDEs. De igual manera, el congénere BDE-202 fue detectado en la mayor parte de las muestras, y sin embargo nunca había sido detectado como componente de ninguna mezcla técnica.

Esta investigación, ha puesto de relieve claras diferencias en los niveles de contaminación por PBDEs detectados entre el END y Madrid, muy probablemente explicadas en función del grado de urbanización e industrialización de las áreas estudiadas. Adicionalmente, la determinación en la mayor parte de las muestras del BDE-202 y del perfil de abundancia BDE-207>BDE-208>BDE-206, se interpretaron como indicios de la degradación medioambiental y/o metabólica que el BDE-209 podía haber sufrido en congéneres de menor grado de bromación. Este hecho, lejos de ser trivial, permite esgrimir argumentos en contra de la defendida estabilidad del BDE-209 en el medioambiente y por tanto de la supuesta inocuidad de la mezcla deca-BDE, principalmente compuesta por el citado congénere. En consecuencia, los resultados de este estudio contribuyen a aumentar la información ambiental sobre deca-BDE y por lo tanto puede ayudar a apoyar decisiones encaminadas hacia la prohibición o eliminación progresiva de dicho compuesto.

Este estudio ha dado lugar a una publicación científica y se ha presentado en un congreso internacional según se detalla a continuación.

**Publicación:**

Título: Predominance of BDE-209 and other higher brominated diphenyl ethers in eggs of white stork (*Ciconia ciconia*) colonies from Spain

Autores: Juan Muñoz-Arnanz, Mónica Sáez, Jose Ignacio Aguirre, Raquel Baos, Fernando Hiraldo, Grazina Pacepavicius, Mehran Alaei and Begoña Jiménez

Revista: Environment International

Volumen/Páginas/Editorial/Año: 37/572-576/Elsevier/2011

**Congreso:**

29<sup>th</sup> International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants. DIOXIN 2009

Título: High prevalence of BDE 209 and other high brominated diphenyl ethers in white storks (*Ciconia ciconia*) from two areas of Spain

Tipo de participación: Comunicación Oral

Lugar celebración: Beijing, China

Fecha: 23-28/Agosto/2009





Contents lists available at ScienceDirect

Environment International

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

## Predominance of BDE-209 and other higher brominated diphenyl ethers in eggs of white stork (*Ciconia ciconia*) colonies from Spain

Juan Muñoz-Arnanz<sup>a</sup>, Mónica Sáez<sup>a</sup>, José I. Aguirre<sup>b</sup>, Fernando Hiraldo<sup>c</sup>, Raquel Baos<sup>c</sup>, Grazina Pacepavicius<sup>d</sup>, Mehran Alaei<sup>d</sup>, Begoña Jiménez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Instrumental Analysis and Environmental Chemistry, Institute of Organic Chemistry, CSIC, Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department of Zoology and Physical Anthropology, Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>c</sup> Department of Applied Biology, Estación Biológica de Doñana, CSIC, Avda. Américo Vespucio s/n, 41092 Sevilla, Spain

<sup>d</sup> Aquatic Ecosystem Protection Research Division, Environment Canada, 867 Lakeshore Road, P.O. Box 5050, Burlington, Ontario L7R 4A6, Canada

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 15 March 2010

Accepted 26 November 2010

Available online 28 December 2010

#### Keywords:

PBDEs

BDE-209

Eggs

Birds

White stork

Doñana National Park

### ABSTRACT

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are ubiquitous pollutants for which there is still a lack of knowledge about the environmental behavior and fate of the higher brominated congeners (octa- to deca-BDEs). In this study, the PBDE content and congener profiles in failed eggs from two colonies of white stork (*Ciconia ciconia*) in Spain were studied. The average total PBDE concentration was 1.64 ng/g (wet weight, w.w.) for the rural colony and 9.08 ng/g (w.w.) for the urban colony. Higher brominated BDEs dominated the congener profiles of both colonies. Of particular interest was the determination of BDE-209 as the dominant congener accounting for 44.1% and 38.6% of the total PBDE content in the rural and urban colonies, respectively. BDE-202, considered an indicator of BDE 209 debromination, was detected in 83% and all of the samples from rural and urban colonies, respectively. The observed congener profile in which BDE-207 > BDE-208 > BDE-206 does not correspond to any known technical PBDE mixture and is evidence for possible BDE-209 degradation.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are a family of brominated flame retardants (BFRs) with 209 possible congeners of varying degrees of halogenation. These compounds have been used profusely over the past few decades to prevent fire in a wide array of consumer products including plastics, electronic circuitry, polyurethane foams, and textiles among others. The fact that these are non-matrix bound additives facilitates their release from the products that contain them. That, along with their lipophilicity and resistance to chemical degradation, has resulted in their ubiquitous distribution in the environment (Hites, 2004; Yogui and Sericano, 2007). The nature and environmental behavior of some PBDEs fulfill the criteria for being recently considered as persistent organic pollutants (POPs) under the Stockholm Convention (UNEP, 2009). Growing evidence of some BDEs' deleterious effects regarding ecosystems and human health has led to the ban of the three commercial formulations of PBDEs in the European Union. Specifically, the penta- and octa-mixtures were banned in Europe as of 2004, followed by the ban on the deca-BDE

formulation in 2008 (European Court of Justice, 2008). Besides Europe, Canada banned the production of all PBDEs in 2006 (Canada Gazette, 2006) and in the United States, manufacturers voluntarily ceased production of the penta- and octa-formulations by the end of 2004 and some restrictions on the deca-BDE have already been placed in some states. Recently, the two manufacturers of deca-BDE in the United States have committed to phase out total production, importation, and sales of this formulation by the end of 2013 (US Environmental Protection Agency, 2009). With the exception of these examples in the United States, Canada, and Europe, there are no other regulations governing the production or use of the deca-BDE mixture.

Decisions to ban or phase out the deca-BDE formulation are in response to increasing information showing that BDE-209 could bioaccumulate in different organisms and degrade and metabolize into less brominated, more bioavailable, persistent, and toxic congeners (Stapleton et al., 2004; Kierkegaard et al., 2007; Van den Steen et al., 2007; Segev et al., 2009). However, even though PBDEs are one of the most studied groups of pollutants, there is still an important gap in knowledge regarding the environmental behavior and fate of BDE-209 and the higher brominated BDEs. The number of scientific papers studying these congeners is still small in comparison to the high number of studies focused on PBDEs. This may partially be due to several challenges involved in the analytical determination of these congeners (photolytic and thermal degradation), combined with a lack of commercially available analytical standards which has

\* Corresponding author. Department of Instrumental Analysis and Environmental Chemistry, Institute of Organic Chemistry, CSIC, Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain.

E-mail address: [bjimenez@iqog.csic.es](mailto:bjimenez@iqog.csic.es) (B. Jiménez).

only recently been remedied (Stapleton, 2006; Kierkegaard et al., 2009).

The use of birds as bioindicators or sentinels of environmental health has been recognized for some time (Furness, 1993). Birds that are near or at the top of the food chain are susceptible to bioaccumulation and biomagnification. Consequently, these species may be more sensitive to the effects of contaminant exposure and bioaccumulation. The use of infertile eggs has been extensively reported and regarded as a useful non-destructive tool for the study of contaminants in bird populations (Merino et al., 2005; Jiménez et al., 2007). Regarding PBDE content and congener profiles, several studies conducted on birds have revealed remarkable interspecies variability (Law et al., 2006). These differences are attributed not only to distinct metabolic rates but also to diet and habitat since the availability and use of PBDEs in different ecosystems and environments influences the exposure of birds to PBDEs.

For instance, most avian species having an aquatic-based diet show a common congener profile dominated by BDE-47, -99, -100, -153, and -154. Moreover, if detected, higher brominated BDE congeners such as BDE-183 and particularly BDE-209 are found at very low concentrations. This has been partially explained by the low bioavailability of BDE-209 due to its high molecular weight and hydrophobicity and its tendency to bind to soil and sediment. In terrestrial food webs, the presence of BDE-183 and -209 was first reported in 2004 by Lindberg et al. in top predators such as peregrine falcons. Since then, several studies have detected levels of BDE-209 and some nona-, octa- and hepta-BDEs in falcons and other birds of prey from Norway (Herzke et al., 2005), Switzerland (Naert et al., 2007), Sweden (Johansson et al., 2009), China (Chen et al., 2007; Gao et al., 2009), and the United States (Chen et al., 2008; Holden et al., 2009; Chen et al., 2010). With the exception of some birds of prey from China and the United States, both the reported concentrations of higher brominated BDEs, including BDE-209, and their contribution to the total PBDE content have been low.

The objective of this study was to investigate the PBDE content and congener profile in the white stork as a top predator with different feeding habits depending on the foraging area. Special attention was paid to the higher brominated BDE congeners. For that purpose, white stork eggs were obtained from two colonies with marked differences in terms of their habitats. One of the colonies (Madrid colony) was located in an urban/industrial area, near the city of Madrid, where nests were built in anthropogenic habitats where the presence of

rubbish dumps could provide the storks with a constant food source (Martínez, 1995). The other colony inhabited Doñana National Park (DNP) and its surroundings (DNP colony) in southwestern Spain, which is considered an ecologically sensitive rural area and sanctuary for numerous bird species. In this colony, white storks were observed to breed in open nests at the top of wild olive trees located in a natural area far from urban or industrial influences. Therefore, the DNP storks consume a natural diet involving terrestrial and aquatic species such as crayfish, terrestrial insects, earthworms, and amphibians among others.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sample collection

A total of 33 added eggs of white stork were collected. Twenty-three were obtained from Doñana National Park during the breeding seasons of 1999–2000, and ten eggs were collected from Madrid during the breeding season of 2005 (Fig. 1). Nests were carefully monitored during the breeding period and all of them were sampled at the same time intervals, so it was assumed that all eggs had the same water loss. Samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. Before residue analysis, eggs were examined, and none of them was embryonated. Egg content was used for chemical analysis and the remaining eggshell was kept for further structural analysis.

### 2.2. Analytical procedure

The whole egg content was lyophilized and quantities of approximately 2 g were used for residue analysis according to the analytical procedure described in detail elsewhere (Merino et al., 2005). Briefly, samples were spiked with  $^{13}\text{C}$ -labeled surrogate standards and the extraction was based on a matrix solid phase dispersion (MSPD) procedure. Further cleanup was performed by using acidic and basic silica gel multilayer columns. A final fractionation of the studied compounds and other possible interferences was carried out by using Supelclean<sup>TM</sup> Supelco ENVI<sup>TM</sup>-Carb tubes. Three fractions were eluted: the first fraction contained the bulk of PBDEs along with ortho-PCBs and DDTs, whereas the second and third fractions contained non-ortho substituted PCBs and PCDD/Fs, respectively. The first fraction containing PBDE congeners was used in the present work. Non-ortho-PCBs and PCDD/Fs obtained in the second and third fractions constituted

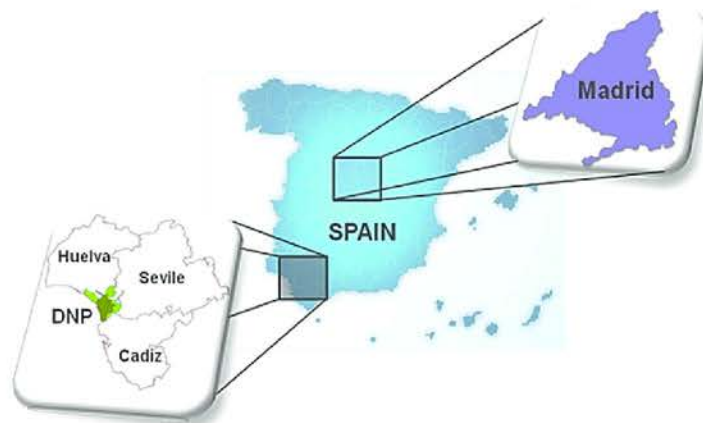


Fig. 1. Geographic distribution of the white stork colonies sampled. DNP stands for Doñana National Park.



part of a separated work (Muñoz-Arnanz et al., 2008). Lipid content of each sample was calculated gravimetrically (additional details provided in Supplementary Information).

Prior to instrumental analysis,  $^{13}\text{C}_{12}$ -BDE 138 or  $^{13}\text{C}_{12}$ -BDE 139 were added to all extracts as injection standards to correct for instrument variability. Twelve tri- to hepta-substituted PBDE congeners (BDE-17, -28, -47, -66, -85, -99, -100, -153, -154, -183, -184, and -191) were analyzed by high resolution gas chromatography low resolution mass spectrometry (HRGC-LRMS) using a 6890 N gas chromatograph coupled with a 5975 quadrupole mass spectrometer (Agilent, Palo Alto, CA) operated in selected ion monitoring mode (SIM) with electron capture negative ionization (ECNI). The GC injection port was configured for 1  $\mu\text{L}$  pulsed hot splitless injections (5 psi during 4 min) at a temperature of 260 °C. Gas chromatographic separation prior to MS was achieved using a 15 m  $\times$  0.20 mm  $\times$  0.20  $\mu\text{m}$  DB-5MS low bleed column (J&W Scientific, USA). The GC column was maintained at 120 °C for 4.2 min, then ramped at 30 °C/min to 200 °C, ramped again at 5 °C/min to 275 °C, ramped once again at 40 °C/min to 300 °C and maintained for 10 min, and finally ramped at 10 °C/min to 310 °C and held for 2 min. Helium was used as the carrier gas at a constant flow rate of 1.5 mL/min. Methane was used as reaction gas. The temperatures of the transfer line, source, and quadrupole were set at 300 °C, 150 °C, and 150 °C, respectively. The identification of target compounds was based on detection, at the corresponding retention time, of  $m/z$  79 and 81 (corresponding to bromine atoms) plus 2 more ions corresponding to the cluster of  $[\text{M}-\text{H}_x\text{Br}_y]^+$  which were specific to each congener.

Sixteen higher brominated PBDE congeners, from octa- to deca-substituted (BDE-194, -195, -196, -197 + 204, -198 + 199 + 200 + 203, -201, -202, -205, -206, -207, -208, and -209) were analyzed by high resolution gas chromatography high resolution mass spectrometry (HRGC-HRMS) using a Micromass AutoSpec Ultima coupled to an Agilent 6890 GC equipped with a CTC A200s autosampler. The GC injection port was configured for 1  $\mu\text{L}$  split/splitless injections at a temperature of 280 °C. Gas chromatographic separation prior to MS was achieved using a 15 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.10  $\mu\text{m}$  DB-5HT column (J&W Scientific, USA). The GC column was maintained at 100 °C for 2 min, then ramped at 25 °C/min to 250 °C, ramped at 1.5 °C/min to 270 °C,

ramped at 25 °C/min to 325 °C and held for 5 min. Helium was used as the carrier gas in constant pressure mode. Analyte ionization was performed by electron ionization (EI) at an electron voltage ranging from 30 to 40 eV depending on the optimization parameters of the instrument. Source and transfer line temperatures were both set at 280 °C and the resolving power of the analyzer was 10,000. Quality assurance/control criteria are provided in the Supplementary Information.

### 2.3. Data analysis

All concentrations are given in wet weight (w.w.). For comparative purposes, the mean content of lipids in the analyzed eggs was  $7.32 \pm 0.96\%$  in the case of DNP and  $7.18 \pm 0.73\%$  in the case of Madrid. Samples with concentrations below the detection limits were assigned a value of zero. Statistical analyses were carried out with SigmaPlot for Windows version 11.0 (Systat Software Inc., CA, USA). Data were not normally distributed (Shapiro-Wilk test,  $p < 0.05$ ). The data were  $\log_{10}$ -transformed in order to meet normality. The level of significance was set at  $\alpha = 0.05$ .

## 3. Results and discussion

### 3.1. Congener patterns and levels

PBDEs were found in all the samples analyzed (Table 1). Of the 28 different PBDE congeners measured in this study, 17 were in at least 50% of the white stork eggs. The following fifteen congeners were found in both colonies: BDE-154, -183, -196, -197, -198, -199, -200, -201, -202, -203, -204, -206, -207, -208, and 209. Interestingly, 12 of these 15 congeners contained 8 or more bromine atoms which had only been scarcely reported in wildlife to date. It is also worth noting that BDE-47, -99, -100, and -153, often dominant in biological samples, were not detected in some samples (Table 1). The study of the relative contributions of PBDEs revealed a marked presence of deca-, nona-, and octa-BDEs in comparison to the rest of congeners (Fig. 2). Specifically, 70% and 87% of BDE congeners from DNP and the Madrid colony, respectively, had 8 or more bromine atoms. Of special relevance is the contribution of BDE-209 which has been previously reported in terrestrial food webs. In this study, however, not only was it detected in over 95% of the eggs analyzed but it also accounted for the highest contribution to the total PBDE content in both colonies.

The average concentration for total PBDEs in white storks from DNP was 1.64 ng/g w.w. (median value, 0.832 ng/g), ranging between 0.214 and 9.50 ng/g. The levels found for

**Table 1**  
Arithmetic mean, median, range and detection frequencies (% > LOD) of PBDE concentrations (ng/g w.w.) in white stork eggs from the colonies of Madrid and DNP. ND: Not Detected.

Congeners	DNP (n=23)				Madrid (n=10)			
	Mean	Median	Range	Percentage > LOD	Mean	Median	Range	Percentage > LOD
BDE-17	0.019	0	ND–0.218	13.6	0.0003	0	ND–0.003	10
BDE-28	0.029	0.010	ND–0.183	59.1	ND	ND	ND	0
BDE-47	0.023	0	ND–0.172	36.4	0.107	0.111	ND–0.150	90
BDE-66	0.0001	0	ND–0.003	4.55	0.0009	0	ND–0.008	10
BDE-85	0.032	0	ND–0.674	22.7	0.008	0	ND–0.069	20
BDE-99	0.046	0	ND–0.339	50	0.089	0	ND–0.311	30
BDE-100	0.052	0	ND–0.460	27.3	0.034	0	ND–0.114	30
BDE-153	0.090	0	ND–0.522	40.9	0.086	0	ND–0.389	30
BDE-154	0.097	0.037	ND–0.744	95.5	0.161	0.156	0.009–0.259	100
BDE-183	0.064	0.041	0.003–0.289	100	0.690	0.629	0.309–1.24	100
BDE-184	0.003	0	ND–0.023	18.2	ND	ND	ND	0
BDE-191	0.030	0	ND–0.330	31.8	0.003	0.007	ND–0.020	30
BDE-194	0.004	0	ND–0.070	17.4	0.086	0.081	ND–0.146	88.9
BDE-195	0.0003	0	ND–0.007	4.35	ND	ND	ND	0
BDE-196	0.048	0.031	ND–0.187	95.7	0.703	0.553	0.166–1.60	100
BDE-197 + 204	0.086	0.065	ND–0.287	95.7	0.638	0.521	ND–1.27	88.9
BDE-198 + 199 + 200 + 203	0.017	0.014	ND–0.074	82.6	0.286	0.153	0.064–0.840	100
BDE-201	0.016	0.011	ND–0.079	95.7	0.224	0.158	ND–0.505	88.9
BDE-202	0.013	0.008	ND–0.086	82.6	0.105	0.087	0.023–0.292	100
BDE-205	0.0002	0	ND–0.005	8.70	ND	ND	ND	0
BDE-206	0.019	0.010	ND–0.162	65.2	0.218	0.126	0.036–0.952	100
BDE-207	0.167	0.072	ND–1.24	91.3	1.47	1.20	0.435–3.85	100
BDE-208	0.060	0.024	ND–0.465	91.3	0.657	0.498	0.157–1.91	100
BDE-209	0.724	0.327	ND–6.74	95.7	3.50	2.71	0.603–8.46	100
$\Sigma$ PBDEs	1.64	0.832	0.214–9.50		9.08	6.59	2.79–20.5	

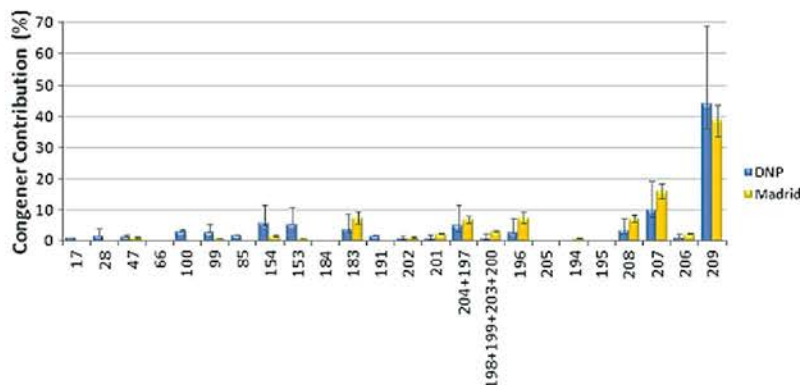


Fig. 2. PBDE congener profiles of both colonies of white stork. Error bars represent 25 and 75 percentiles.

the Madrid colony were significantly higher ( $p < 0.001$ ), with an average concentration of 9.08 ng/g w.w. (median value, 6.59 ng/g) for total PBDEs and ranging from 2.79 to 20.5 ng/g. Since a positive correlation between PBDE levels and the degree of urbanization and industrial development has been previously described (Chen et al., 2008), these results were a priori expected given the differences in the levels of anthropogenic influences between the two sites (i.e. rural vs. urban/industrial). To the best of our knowledge, there are no previous studies reporting PBDE concentrations in white storks, making it impossible to evaluate temporal trends within this species. In addition, it is important to note that these eggs were not collected in the same year—the eggs from DNP were collected during the breeding seasons of 1999–2001 and those from the Madrid colony were sampled in 2005. However, concentrations of PBDEs measured in the stork eggs from both colonies are within the range reported for eggs of other avian species of the European continent having lower and higher trophic positions than the white storks. Concentrations in the white stork eggs were similar to the concentrations reported in the eggs of the great tit (0.36–12.1 ng/g w.w.), which is a species at a lower trophic position and that consumes a strictly terrestrial diet of invertebrates and plant parts (Van den Steen et al., 2009). Compared to PBDE concentrations in the peregrine falcon eggs (77–406 ng/g w.w.), a species that has one of the highest trophic positions since it consumes other avian species, PBDE levels in the eggs of the storks were lower (Herzke et al., 2005).

In light of these values, it seems likely that PBDE levels for white storks are partially related to their relative position in the food web. Nevertheless, the possible influence of different PBDE mixture uses in different areas cannot be disregarded.

### 3.2. Differences among colonies

There were distinct differences between the two colonies in relation to the contribution of each homolog group to the total  $\Sigma$ PBDEs (Fig. 3). Contrasting with the higher BDE-209 burden in the Madrid colony, the ratio [BDE-209]/[octa- and nona-BDEs] was 0.8 for the Madrid colony and 1.7 for the DNP colony. These differences may be attributed to different dietary habits or metabolic rates of these two colonies. Since both colonies are made up of the same species with different dietary habits, it is more likely that diet was the main factor contributing to these differences. This hypothesis is also confirmed by the congener pattern observed for lower brominated BDE congeners. A

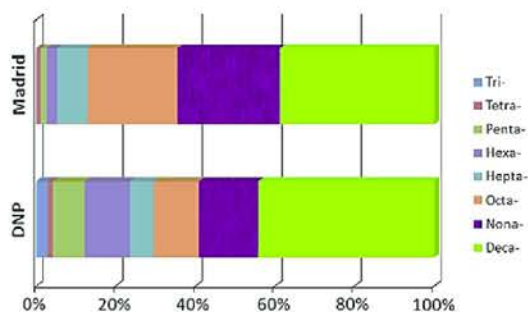


Fig. 3. Relative contribution of each PBDE homolog group to  $\Sigma$ PBDEs in each colony.

higher abundance of congeners such as BDE-47, -99, -100, -153, and -154 have been generally found in most aquatic food webs in comparison to terrestrial food webs. This is the particular case for most of these lower BDE congeners for DNP storks in comparison to the Madrid specimens (Figs. 2 and 3). It is known that white storks from Madrid mainly feed at garbage dumps, whereas white storks from DNP partially feed on aquatic vertebrates and invertebrates (e.g. crayfish). Therefore, these differences for lower brominated BDE congeners between the two colonies are more likely to be related to diet rather than to the use of different technical PBDE mixtures.

### 3.3. BDE-209. Bioaccumulation and debromination

BDE-209 has been previously reported as the dominant congener in some terrestrial species such as red foxes (Voorspoels et al., 2006) and grizzly bears (Christensen et al., 2005). To date, BDE-209 has been only detected as the dominant congener in some terrestrial birds of prey in China (Chen et al., 2007; Gao et al., 2009) and the United States (Park et al., 2009). In this study, the BDE-209 contribution to the total PBDE content was as high as 38.6% and 44.1% for the Madrid and DNP white storks, respectively. This is a remarkable finding that supports growing evidence that BDE-209 is bioavailable and has a tendency to bioaccumulate in some terrestrial species. Our results also agree with those reported by Chen et al. (2007) who found that among those species for which BDE-209 accounted for the highest contribution, the most contaminated birds showed the lowest BDE-209 relative burdens. The relative contribution of BDE-209 in DNP white storks is statistically higher ( $p < 0.001$ ) than that of Madrid white storks, whereas the  $\Sigma$ PBDEs is statistically greater for the latter birds. This finding, however, contrasts with data reported by Park et al. (2009), who found not only greater PBDE contents in urban peregrine falcons but also greater BDE-209 contributions. In that study, the authors support their findings postulating a direct uptake of BDE-209 in urban food webs based on fewer biological transfers. According to this hypothesis, fewer biological transfers would indicate a less preferential uptake of lower brominated BDEs in comparison to BDE-209. While this may be correct, in the case of the white stork, a higher relative content of BDE-209 corresponds to a lower relative content of nona-BDEs and vice versa. Again, this distinction between the two white stork populations is likely to be associated with uptake differences rather than dissimilar metabolic rates.

The detection of some of the higher BDE congeners may serve to further support the existing evidence for BDE-209 biodegradation or/and environmental debromination. Thus, the congener profile found in the white storks for the debromination products BDE-207>BDE-208>BDE-206 differed from the congener profiles described for the technical octa-BDE (BDE-207>BDE-206>BDE-208) and deca-BDE formulation (BDE-206>BDE-207>BDE-208) (La Guardia et al., 2006). Moreover, it also differed from the common profile found in abiotic matrices where BDE-206 is detected as the dominant nona-BDE congener (Holden et al., 2009). Our results are in agreement with data reported for eggs from US peregrine falcons (Chen et al., 2008) and European starlings in a BDE-209 exposure study (Van den Steen et al., 2007), suggesting that part of these nona-BDE congeners may stem from either biodegradation or simple debromination of BDE-209. The congener BDE-202 was detected in all and about 83% of the egg samples from the Madrid and DNP colonies, respectively. The presence of this congener has never been reported in any commercial PBDE mixture (Stapleton et al., 2005). Ruling out this technical origin, the detection of BDE-202 in the white stork eggs studied may result from two different sources as follows: (i) debromination of BDE-209 in the environment and subsequent uptake and bioaccumulation and/or (ii) as a metabolic product of higher BDE congeners. BDE-202 has been found previously in other studies on biota and postulated as a BDE-209 debromination product (Christensen et al., 2005).



### 3.4. Toxicological considerations

It is known that, in general, for birds and other oviparous species, the transfer from the mother to eggs of those contaminants with low Kow is favored over those compounds with a higher Kow value (Wu et al., 2009). Other parameters such as the molecular geometry and size, the degree of halogenation, or the rate of metabolism greatly influence the transfer as well. As a result, each group of organohalogen compounds may exhibit a different behavior in the maternal transfer. Specifically for PBDEs, it has been described how the transfer of the higher brominated BDE congeners is hindered in glaucous gulls (Verreault et al., 2006). Assuming a similar outcome in the maternal transfer for white storks, the relative weight of octa-, nona-, and deca-BDEs into the total PBDE content of adult white storks could be greater than what has been detected in eggs.

Several studies exist that have found a negative correlation between ΣPBDEs and reproductive success in different bird species (Ferne et al., 2009). The concentrations found for both colonies of white stork in this study are far below the suggested threshold of 1000 ng/g associated with reduced reproductive performance in ospreys (Henny et al., 2009). Nevertheless, the different interspecies sensitivity towards contaminants cannot be ignored. This, together with the increasing evidence of bioaccumulation and debromination of the higher brominated BDE congeners, should be an element taken into account to further support worldwide restriction/regulation policies on the deca-BDE technical formulation.

## 4. Conclusions

The present study emphasized BDE burdens dominated by the higher BDE congeners in two colonies of white stork from different areas of Spain. The contribution of BDE-209 was remarkably high in birds from these two colonies, a finding scarcely reported to date. The abundance of other higher BDEs, such as nona-BDEs, was markedly different in both colonies, suggesting distinctly different uptake of the congeners that was likely heavily influenced by dietary differences between the two colonies. The congener profile BDE-207 > BDE-208 > BDE-206, along with the presence of BDE-202, found in the white stork eggs analyzed in this study further supports the hypothesis that BDE-209 undergoes biodegradation or/and environmental debromination to lower BDE congeners. Results from this study contribute to increase the environmental information on DecaBDE and therefore could help to support decisions to ban or phase out the deca-BDE formulation.

## Acknowledgments

The authors would like to thank EGMASA, CSIC (Project Intramural de Frontera Ref. 200680F0162), and the Regional Government of Madrid (Project P-AMB-000352-0505) for their financial support. Dr. Sáez acknowledges her postdoctoral contract through project P-AMB-000352-0505.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at doi:10.1016/j.envint.2010.11.013.

## References

Canada Gazette. Polybrominated diphenyl ether regulations. <http://www.canadagazette.gc.ca/archives/p1/2006/2006-12-16/html/reg3-eng.html> (accessed March 2, 2010).

Chen D, Mai B, Song J, Sun Q, Luo Y, Luo X, et al. Polybrominated diphenyl ethers in birds of prey from northern China. *Environ Sci Technol* 2007;41:1828–33.

Chen D, La Guardia MJ, Harvey E, Amaral M, Wohlfort K, Hale RC. Polybrominated diphenyl ethers in peregrine falcon (*Falco peregrinus*) eggs from the northeastern U.S. *Environ Sci Technol* 2008;42:7594–600.

Chen D, Hale RC, Watts BD, La Guardia MJ, Harvey E, Mojica EK. Species-specific accumulation of polybrominated diphenyl ether flame retardants in birds of prey from the Chesapeake Bay region, USA. *Environ Poll* 2010;158:1883–9.

Christensen JR, Macduffee M, Macdonald RW, Whiticar M, Ross PS. Persistent organic pollutants in British Columbia grizzly bears: consequence of divergent diets. *Environ Sci Technol* 2005;39:6952–60.

European Court of Justice 2008-04-01. Case C-14/06, 2008.

Ferne KJ, Shutt JL, Letcher RJ, Ritchie IJ, Bird DM. Environmentally relevant concentrations of DE-71 and HBCD alter eggshell thickness and reproductive success of American kestrels. *Environ Sci Technol* 2009;43:2124–30.

Furness RW. Birds as monitors of pollutants. In: Furness RW, Greenwood JJD, editors. *Birds as monitors of environmental change*. London: Chapman and Hall; 1993. p. 86–143.

Gao F, Luo XJ, Yang ZF, Wang XM, Mai BX. Brominated flame retardants, polychlorinated biphenyls, and organochlorine pesticides in bird eggs from the Yellow River delta, North China. *Environ Sci Technol* 2009;43:6956–62.

Henny CJ, Kaiser JL, Grove RA, Johnson BL, Letcher RJ. Polybrominated diphenyl ether flame retardants in eggs may reduce reproductive success of ospreys in Oregon and Washington, USA. *Ecotoxicology* 2009;18:802–13.

Herzke D, Berger U, Kallenborn R, Nygard T, Vetter W. Brominated flame retardants and other organobromines in Norwegian predatory bird eggs. *Chemosphere* 2005;61:441–9.

Hites RA. Polybrominated diphenyl ethers in the environment and in people: a meta-analysis of concentrations. *Environ Sci Technol* 2004;38:945–56.

Holden A, Park JS, Chu V, Kim M, Choi G, Shi Y, et al. Unusual hepta- and octabrominated diphenyl ethers and nonabrominated diphenyl ether profile in California, USA, peregrine falcons (*Falco peregrinus*): more evidence for brominated diphenyl ether-209 debromination. *Environ Toxicol Chem* 2009;28:1906–11.

Jiménez B, Merino R, Abad E, Rivera J, Olie K. Evaluation of organochlorine compounds (PCDDs, PCDFs, PCBs and DDTs) in two raptor species inhabiting a Mediterranean island, Spain. *Environ Sci Poll Res* 2007;14(1):60–7.

Johansson AK, Sellström U, Lindberg P, Bignert A, De Wit CA. Polybrominated diphenyl ether congener patterns, hexabromocyclododecane, and brominated biphenyl 153 in eggs of peregrine falcons (*Falco peregrinus*) breeding in Sweden. *Environ Toxicol Chem* 2009;28:9–17.

Kierkegaard A, Asplund L, De Wit CA, McLachlan MS, Thomas GO, Sweetman AJ, et al. Fate of higher brominated PBDEs in lactating cows. *Environ Sci Technol* 2007;41:417–23.

Kierkegaard A, Sellström U, McLachlan MS. Environmental analysis of higher brominated diphenyl ethers and decabromodiphenyl ethane. *J Chromatogr A* 2009;1216:364–75.

La Guardia MJ, Hale RC, Harvey E. Detailed polybrominated diphenyl ether (PBDE) congener composition of the widely used penta-, octa- and deca-PBDE technical flame-retardant mixture. *Environ Sci Technol* 2006;40:6247–54.

Law RJ, Allchin CR, De Boer J, Covaci A, Herzke D, Lepom P, et al. Levels and trends of brominated flame retardants in the European environment. *Chemosphere* 2005;64:187–208.

Lindberg P, Sellström U, Hågberg L, De Wit CA. Higher brominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecane found in eggs of peregrine falcons (*Falco peregrinus*) breeding in Sweden. *Environ Sci Technol* 2004;38:93–6.

Martínez E. El uso de vertederos por la Cigüeña Blanca como nuevas fuentes de alimentación. In: Biber O, Enggist P, Martí C, Salathe T, editors. *Proceedings of the International Symposium of White Stork (Western population)*; 1995. p. 159–62.

Merino R, Bordajandi LR, Abad E, Rivera J, Jiménez B. Evaluation of organochlorine compounds in peregrine falcons (*Falco peregrinus*) and their main prey (*Columba livia*) inhabiting central Spain. *Environ Toxicol Chem* 2005;24(8):2088–93.

Muñoz-Arnanz J, Blázquez E, Ábalos M, Abad E, Rivera J, Baos R, et al. Dioxins and related compounds in white storks (*Ciconia ciconia*) from Doñana National Park, southwestern Spain. *Organoh Comp* 2008;70:1562–5.

Naert C, Van Peteghem C, Kupper J, Jenni L, Naegeli H. Distribution of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in birds of prey from Switzerland. *Chemosphere* 2007;68:977–87.

Park JS, Holden A, Chu V, Kim M, Rhee A, Patel P, et al. Time-trends and congener profiles of PBDEs and PCBs in California peregrine falcons (*Falco peregrinus*). *Environ Sci Technol* 2009;43:8744–51.

Segev O, Kushmaro A, Brenner A. Environmental impact of flame retardants (persistence and biodegradability). *Int J Environ Res Public Health* 2009;6:478–91.

Stapleton HM. Instrumental methods and challenges in quantifying polybrominated diphenyl ethers in environmental extracts: a review. *Anal Bioanal Chem* 2006;386:807–17.

Stapleton HM, Alae M, Letcher RJ, Baker JE. Debromination of the flame retardant decabromodiphenyl ether by juvenile carp (*Cyprinus carpio*) following dietary exposure. *Environ Sci Technol* 2004;38:112–9.

Stapleton HM, Brazil B, Holbrook RD, Mitchelmore CL, Benedict R, Konstantinov A, et al. In vivo and in vitro debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209) by juvenile rainbow trout and common carp. *Environ Sci Technol* 2006;40:4653–8.

US Environmental Protection Agency. DecaBDE phase-out initiative. <http://www.epa.gov/optp/existingchemicals/pubs/actionplans/deccadbe.html> (accessed March 2, 2009).

UNEP-POPS-COP-NOTIF-DN-CN524. English.pdf. <http://chm.pops.int/2009>.

Van den Steen E, Covaci A, Jaspers VLB, Dauwe T, Voorspoels S, Eens M, et al. Accumulation, tissue-specific distribution and debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209) in European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Environ Pollut* 2007;148:648–53.

Van den Steen E, Pinxten R, Jaspers VLB, Covaci A, Barba E, Carere C, et al. Brominated flame retardants and organochlorines in the European environment using great tit eggs as a biomonitoring tool. *Environ Int* 2009;35:310–7.

Verreault J, Villa RA, Gabrielsen GW, Skaare JU, Letcher RJ. Maternal transfer of organohalogen contaminants and metabolites to eggs of Arctic-breeding glaucous gulls. *Environ Poll* 2006;144:1053–60.

Voorspoels S, Covaci A, Lepom P, Escutenaire S, Schepens P. Remarkable findings concerning PBDEs in the terrestrial top-predator red fox (*Vulpes vulpes*). *Environ Sci Technol* 2006;40:2937–43.

Wu JP, Luo XJ, Zhang Y, Chen SJ, Mai BX, Guan YT, et al. Residues of polybrominated diphenyl ethers in frogs (*Rana limncharis*) from a contaminated site, South China: tissue distribution, biomagnification, and maternal transfer. *Environ Sci Technol* 2009;43:5212–7.

Yogui GT, Sericano JL. Polybrominated diphenyl ether flame retardants in the U.S. marine environment: a review. *Environ Int* 2007;41:1828–33.

## Supplementary Information

### Predominance of BDE-209 and other higher brominated diphenyl ethers in eggs of white stork (*Ciconia ciconia*) colonies from Spain

Juan Muñoz-Arnanz<sup>1</sup>, Mónica Sáez<sup>1</sup>, José I. Aguirre<sup>2</sup>, Fernando Hiraldo<sup>3</sup>, Raquel Baos<sup>3</sup>, Grazina Pacepavicius<sup>4</sup>, Mehran Alaei<sup>4</sup> and Begoña Jiménez<sup>1\*</sup>

#### Affiliations

1. Department of Instrumental Analysis and Environmental Chemistry, Institute of Organic Chemistry, CSIC. Juan de la Cierva 3, 28006, Madrid, Spain
2. Department of Zoology and Physical Anthropology, Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain
3. Department of Applied Biology, Estación Biológica de Doñana, CSIC. Avda. Américo Vespucio s/n, 41092 Sevilla, Spain
4. Aquatic Ecosystem Protection Research Division, Environment Canada, 867 Lakeshore Road, P.O. Box 5050, Burlington, Ontario, Canada L7R 4A6

#### Contents

1. Experimental section.....	118
1.1. Reagents and standards .....	118
1.2. Determination of lipid content.....	118
1.3. Quality assurance and quality control QA/QC.....	119

## 1. EXPERIMENTAL SECTION

### 1.1 Reagents and standards

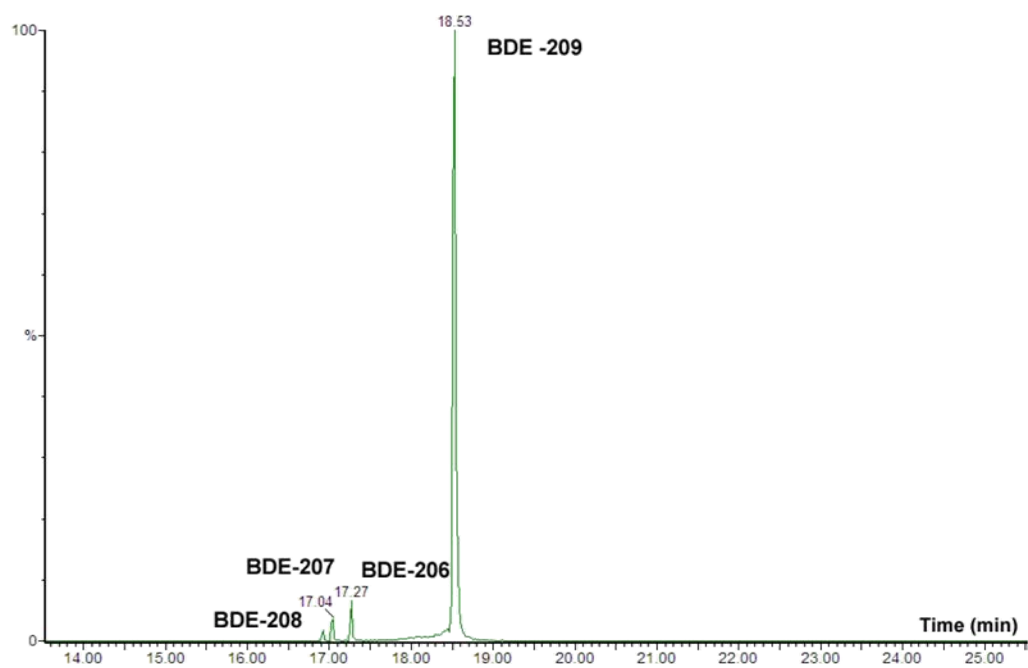
All native PBDE standards, injection standards ( $^{13}\text{C}_{12}$ -labeled BDE-138,-139) and the surrogate standard  $^{13}\text{C}_{12}$ -labeled BDE-209 were purchased from Wellington laboratories (Guelph, Ontario, Canada).  $^{13}\text{C}_{12}$ -labeled PCB-77,-126,-169 standards were used as surrogates as well and were purchased from Dr.Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). All solvents were pesticide residue grade including acetone and toluene purchased from SDS (Peypin, France) and n-hexane purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

### 1.2 Determination of lipid content

The lipid content was determined gravimetrically and based on the extraction of 0.5g of each sample with 100 mL of acetone:hexane (1:1). The extract was first rotaevaporated to nearly dryness and secondly dried for 1 hour at 110°C.

### 1.3 Quality assurance and quality control QA/QC

Quality assurance criteria were based on the application of quality control and quality assurance measures, which included the analysis of a blank with each batch of three samples covering the complete analytical procedure. Care was taken to minimize exposure to UV light throughout the whole analytical procedure. The recovery study of  $^{13}\text{C}_{12}$ -labeled PCB surrogates was carried out by GC-HRMS. The mean recovery for the  $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB surrogates was  $118.7 \pm 11.1\%$  ( $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB-77),  $126.7 \pm 12.6\%$  ( $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB-126),  $136.1 \pm 14.3\%$  ( $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB-169). The recovery study of  $^{13}\text{C}_{12}$ -BDE-209 was performed by GC-qMS with electron capture negative ionization (ECNI) operating in SIM and monitoring the ions  $m/z$  494 and 496. The mean recovery was  $60.9 \pm 3.9\%$ . Concentrations were not surrogate recovery corrected. BDE-209 standard was injected into the GC-HRMS system to check its degradation. Consistent ratios under 8% were measured when injecting 0.5 ng of BDE-209 which corresponded to its degradation into the three nona-BDE congeners (206, 207 and 208) [S1]



**Figure S1.** Mass chromatogram showing the registered degradation of 0.5 ng of BDE-209 into the nona-BDE congeners 206, 207 and 208.



## 4.3. DECLORANO PLUS Y POSIBLES PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN EN HUEVOS DE CIGÜEÑA BLANCA EN ESPAÑA

---

Durante los estadios iniciales de la presente tesis doctoral existía una ausencia absoluta de información sobre la posible presencia del DP, no sólo en el END, sino en todo el territorio nacional, dado que su descubrimiento en el medio ambiente databa del 2006.

Consecuentemente, el principal objetivo de este trabajo fue el de, mediante la utilización de la cigüeña blanca como especie bioindicadora, evaluar por primera vez la posible contaminación por DP y por los posibles productos de degradación del mismo en dos áreas muy diferenciadas en términos de influencias antropogénicas: el END y la región de Madrid.

Se partió de los extractos de las 33 muestras de huevos infértiles de *Ciconia ciconia* utilizados en el estudio anterior sobre la contaminación por PBDEs. En base a lo publicado por otros autores en cuanto a la similitud entre el DP y los PBDEs en su comportamiento analítico, se asumió una eficacia similar en los procesos de extracción y purificación para ambos. Sin embargo, inicialmente se comprobó que el contenido cuantitativo del DP se encontraba en la misma fracción en la que lo hacían los PBDEs, para lo cual se analizó y atestiguó la ausencia de este retardante de llama en las otras dos fracciones.

Los dos isómeros del DP (*syn* y *anti*), *anti*-[DP-1Cl], *anti*-[DP-2Cl] y 1,5-DPMA fueron analizados por GC-HRMS, mediante inyecciones de muestra de 1 µL y el empleo de una columna de 15 metros DB-5ht de bajo sangrado. Su cuantificación se llevó a cabo mediante la construcción y uso de curvas de calibrado de 5 puntos de concentración, utilizando el <sup>13</sup>C-PBDE-138 como patrón interno de inyección.

El dechlorano plus fue encontrado en todas las muestras analizadas. Los niveles cuantificados en las muestras de Madrid (media de 401 pg/g, peso fresco) fueron significativamente mayores (Mann-Whitney,  $p < 0,001$ ) que aquellos correspondientes a los huevos de cigüeñas residentes en el END (media de 105 pg/g, peso fresco). El *anti*-[DP-1Cl] fue encontrado en muy bajas concentraciones y sólo en un 10% de las muestras de cada región, sin embargo supuso el hallazgo de esta especie por primera vez en muestras de biota. Por el contrario, el *anti*-[DP-2Cl] y el 1,5-DPMA no fueron encontrados en ninguna muestra. La abundancia relativa de cada estereoisómero del DP, expresada como  $f_{anti}$ , fue muy similar en los huevos de ambos tipos de cigüeñas:  $0,66 \pm 0,12$  (END) y  $0,64 \pm 0,07$  (Madrid), no pudiéndose observar un claro enriquecimiento del isómero *syn* o *anti* con respecto a las proporciones del producto técnico. Se investigaron correlaciones entre los niveles de DP y PBDEs en ambas regiones, encontrándose sólo significativa aquella para el caso de las muestras del END (Spearman's rank  $r_s = 0,616$ ,  $p = 0,0023$ ).

Esta investigación ha permitido determinar la presencia del DP por primera vez en las áreas estudiadas y en muestras recogidas en 1999, 2001 y 2005. Por primera vez se ha detectado la bioacumulación de este retardante de llama en una especie principalmente terrestre como es la cigüeña blanca, y también, por primera vez, se ha detectado un posible producto de degradación, el *anti*-[DP-1Cl], en una muestra de biota. Los niveles de DP parecen encontrarse al menos un orden de magnitud por debajo del de los PBDEs en las mismas áreas investigadas. No obstante, es necesario continuar con estos estudios e incrementar el conocimiento sobre el comportamiento y evolución de las concentraciones de este contaminante en el medio ambiente.

Este estudio ha dado lugar a una publicación científica y se ha presentado en un congreso internacional según se detalla a continuación.

**Publicación:**

Título: Dechlorane plus and possible degradation products in white stork eggs from Spain

Autores: Juan Muñoz-Arnanz, Mónica Sáez, Raquel Baos, Fernando Hiraldo, Grazina Pacepavicious, Mehran Alaei and Begoña Jiménez

Revista: Environment International

Volumen/Páginas/Editorial/Año: 37/1164-1168/Elsevier/2011

**Congreso:**

30<sup>th</sup> International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants. DIOXIN 2010.

Título: Dechlorane Plus and possible environmental metabolites in white stork eggs

Tipo de participación: Comunicación Oral

Lugar celebración: San Antonio, TX USA

Fecha: 12-17/Septiembre/2010

---



## Dechlorane plus and possible degradation products in white stork eggs from Spain

Juan Muñoz-Arnanz<sup>a</sup>, Mónica Sáez<sup>a</sup>, Fernando Hiraldo<sup>b</sup>, Raquel Baos<sup>b</sup>, Grazina Pacepavicius<sup>c</sup>, Mehran Alaei<sup>c</sup>, Begoña Jiménez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Instrumental Analysis and Environmental Chemistry, Institute of Organic Chemistry, CSIC, Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department of Applied Biology, Doñana Biological Station, CSIC, Avda. Américo Vespucio s/n, 41092 Sevilla, Spain

<sup>c</sup> Aquatic Ecosystem Protection Research Division, Environment Canada, 867 Lakeshore Road, P.O. Box 5050, Burlington, Ontario, Canada L7R 4A6

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 February 2011  
Accepted 31 March 2011  
Available online 6 May 2011

#### Keywords:

DP  
Eggs  
Birds  
White stork  
Doñana National Park  
Spain

### ABSTRACT

The occurrence of the emerging chlorinated flame retardant Dechlorane Plus (DP) and three of its possible degradation products was investigated in white stork eggs from two colonies in Spain. The average DP concentrations were 401 pg/g wet weight (w.w.) for the urban/industrial colony and 105 pg/g w.w. for the rural colony. One possible degradation product, *anti*-[DP-1Cl], was found in approximately 10% of the samples. No significant stereoisomer enrichments were detected in any colony based on the average *anti*-DP fractional abundances found which agrees with previous studies in herring gulls. The relationship between DP and PBDE contents in both colonies was explored leading to different scenarios, i.e. no correlation was found in the urban colony but they were statistically correlated in the rural colony. To the best of our knowledge, this is the first study to report DP in a species from a terrestrial food web, and also to report a DP degradation product in biota.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Stricter policies have been placed on some brominated flame retardants (BFRs) such as polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) which were recently included in the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (United Nations Environment Programme, UNEP, 2009). There are, however, other FRs that are extensively used that remain unregulated. This is the case of Dechlorane Plus (DP, C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>12</sub>, CAS-13560-89-9), which was first synthesized in the late 1960s as a substitute for Dechlorane or Mirex (C<sub>10</sub>Cl<sub>12</sub>). DP has since been used in commercial polymeric products such as cable coatings, electronic connectors and plastic roofing materials (Hoh et al., 2006). Currently, DP is an unregulated FR, even though it is considered to be a high production volume (HPV) chemical and thereby subject to the United States Environmental Protection Agency's HPV challenge (US Environmental Protection Agency, 2010). Its current use may increase since it has been recently regarded as a possible replacement for the Deca-BDE mixture in the European Union (The European Commission, 2007).

Technical DP is synthesized by a Diels-Alder reaction between 2 equivalents of hexachlorocyclopentadiene and 1.5 equivalents of 1,5-cyclooctadiene to form two stereoisomers: *syn*- and *anti*-. It is sold in three different commercial mixtures: DP-25, DP-35 and DP-515. These three formulations share a similar *syn*-: *anti*-isomer composition differing from

each other in their particle size (Wu et al., 2010). There is little published information about the toxicity of DP other than the report provided by its only manufacturer in the US (OxyChem, Niagara Falls, NY) which highlights some ecotoxicological effects in fish and potential effects on rabbit reproduction, such as increase of liver and ovary weights (US Environmental Protection Agency, 2004).

The environmental presence of both DP isomers was first reported in 2006 in air and sediment from the Great Lakes (Hoh et al., 2006). Since then it has been further reported in air (Ren et al., 2008; Venier and Hites, 2008), sediment (Qiu et al., 2007; Sverko et al., 2008), tree bark (Qiu and Hites, 2008), household dust (Zhu et al., 2007), biota (Gauthier et al., 2007; Gauthier and Letcher, 2009; Ismail et al., 2009; Kang et al., 2010; Shi et al., 2009; Tomy et al., 2007, 2008; Wu et al., 2010), and humans (Ren et al., 2009). These findings suggest that despite its size (654 Da) and its high lipophilicity (log *K*<sub>ow</sub> = 9.3), DP is a ubiquitous species, that is bioavailable and bioaccumulative to a certain extent. Moreover, a different biomagnification potential for each of the DP stereoisomers has been observed in aquatic food webs (Tomy et al., 2007, 2008; Wu et al., 2010) which is likely related to the different water solubility and environmental degradation potential of each isomer (Wu et al., 2010). Furthermore, recent studies have reported the presence of DP degradation products either by dehalogenation or retro-Diels-Alder processes (Sverko et al., 2008, 2010).

Despite the increasing number of recent scientific publications the knowledge about the environmental occurrence, behavior and fate of DP is still limited (Wu et al., 2010). The purpose of this study was to shed some light on the current knowledge gap in the occurrence of DP and some of its possible degradation products in biota from terrestrial

\* Corresponding author.

E-mail address: [bjimenez@iqog.csic.es](mailto:bjimenez@iqog.csic.es) (B. Jiménez).



food webs. Most studies dealing with DP in biota have been conducted on aquatic ecosystems (Gauthier et al., 2007; Gauthier and Letcher, 2009; Ismail et al., 2009; Kang et al., 2010; Shi et al., 2009; Sverko et al., 2010; Tomy et al., 2007, 2008; Wu et al., 2010) and to our knowledge this is the first study on DP conducted on a species with a mainly terrestrial diet.

The present work was focused on the white stork (*Ciconia ciconia*) from two different colonies in Spain. Previous studies have demonstrated that this species, as a top predator, could be used as a suitable sentinel species for the monitoring of persistent organic contaminants in different habitats (Muñoz-Arnanz et al., 2008, 2011). Specifically, differences in content and DP isomeric profiles were investigated in eggs obtained from white storks with different foraging areas. One of the colonies, near the city of Madrid (Spain), was selected as representative of an urban and industrial area. The other colony, Doñana National Park (DNP), was selected as an example of an ecologically sensitive rural area, far from urban and industrial influences, and sanctuary for numerous bird species in south-western Spain.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sample collection

A total of 33 failed eggs of white stork were obtained from two different colonies located in Doñana National Park (south-western Spain) and Madrid (central Spain) (Fig. 1). Further details about the samples were described in a previous work (Muñoz-Arnanz et al., 2011).

### 2.2. Analytical procedure

The whole egg content was lyophilized and quantities of approximately 2 g were used for residue analysis. Lipid content of each sample was determined gravimetrically as described elsewhere (Muñoz-Arnanz et al., 2011). Briefly, the extraction consisted of a matrix solid phase dispersion (MSPD)-based procedure. Further clean-up was based on acid and basic silica gel multilayer columns and a final fractionation using Carbon (Supelclean Supelco ENVI™-Carb) was carried out in order to obtain three analytical fractions. The first fraction contained the bulk of PBDEs, *ortho*-PCBs and DDTs, whereas the second and third fractions contained non *ortho* substituted PCBs and PCDD/Fs, respectively. Tomy et al. (2007) and Wu et al. (2010) found that DP was extracted in a similar manner and efficiency as PBDEs; therefore DP was analyzed in the first fraction of all egg samples. The second and third

fractions were analyzed in several samples to confirm the absence of DP.

### 2.3. Chemicals

The following standards were purchased from Wellington laboratories (Guelph, Ontario, Canada): DP stereoisomers, *syn*- and *anti*-, DP monoadduct 1,5-DPMA, DP suggested dechlorinated degradates *anti*-[DP-1Cl] and *anti*-[DP-2Cl] (Fig. 2), and injection standards <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-labeled BDE-138 and -139. Acetone and toluene purchased from SDS (Peypin, France) and n-hexane purchased from Merck (Darmstadt, Germany) were of Pestipur or equivalent grade.

### 2.4. Analytical determination

Both DP stereoisomers, *syn*- and *anti*-, 1,5-DPMA, *anti*-[DP-1Cl] and *anti*-[DP-2Cl] were analyzed by high resolution gas chromatography high resolution mass spectrometry (HRGC–HRMS) using a Micromass Autospec Ultima coupled to an Agilent6890 GC equipped with a CTC A200s autosampler. The GC injection port was configured for 1 µL split/splitless injections at a temperature of 280 °C. Gas chromatographic separation prior to MS was achieved using a 15 m × 0.25 mm × 0.10 µm DB5HT column (J&W Scientific, USA). The GC column was maintained at 100 °C for 2 min, then ramped at 25 °C/min to 250 °C, ramped at 1.5 °C/min to 260 °C, ramped at 25 °C/min to 325 °C and held for 10 min. Helium was used as the carrier gas in constant pressure mode. Sample ionization was performed by electron ionization (EI) at an electron voltage ranging from 30 to 40 eV depending on the optimization parameters of the instrument. Source and transfer line temperatures were both set at 280 °C and the resolving power of the analyzer was 10,000. The identification of target compounds was based on detection, at the corresponding retention time, of the following pairs of *m/z* ions: 271.82102/273.8072 (*syn*- and *anti*-DP), 237.8492/235.8521 (*anti*-[DP-1Cl]), 203.8881/201.8911 (*anti*-[DP-2Cl]), 381.9012/379.9041 (1,5-DPMA). The peaks were quantified when the isotope ratio between the two monitored ions was within 20% of the standard value. In our study, all samples where dechloranes were found above their LOQ, the isotopic ratio was consistently under 15% of the theoretical value. The LOQ was calculated based on a signal-to-noise ratio of 10. The average LOQ calculated for each DP isomer in the analyzed samples was 0.786 pg/g and 0.539 pg/g for the *anti*- and *syn*-isomer, respectively.

Quality criteria were based on the application of quality control and quality assurance measures, which included the processing and analysis of method blank samples subjected to the complete analytical procedure. DP isomers were detected above their LOQs in most procedural blanks. The measured levels were subtracted from the corresponding batch of samples associated to each blank. Care was taken to minimize exposure to UV light throughout the whole analytical procedure.

### 2.5. Data analysis

All concentrations are given in wet weight (w.w.). For comparative purposes, the mean lipid content was 7.32 ± 0.96% in the eggs from DNP and 7.18 ± 0.73% in the eggs from Madrid. Statistical analyses were carried out with SigmaPlot for Windows version 11.0 (Systat Software Inc, CA, USA). Concentration data were not normally distributed even after log-transformation (Shapiro–Wilk test, *p* < 0.05). Therefore, a Mann–Whitney test was performed to compare contaminant levels between both colonies of white storks, and linear correlations between contaminant burdens were expressed as Spearman's rank correlation coefficients (*r<sub>s</sub>*) where the  $\alpha$  for significance was set at 0.05.



Fig. 1. Geographic location of the white stork colonies studied. DNP stands for Doñana National Park.

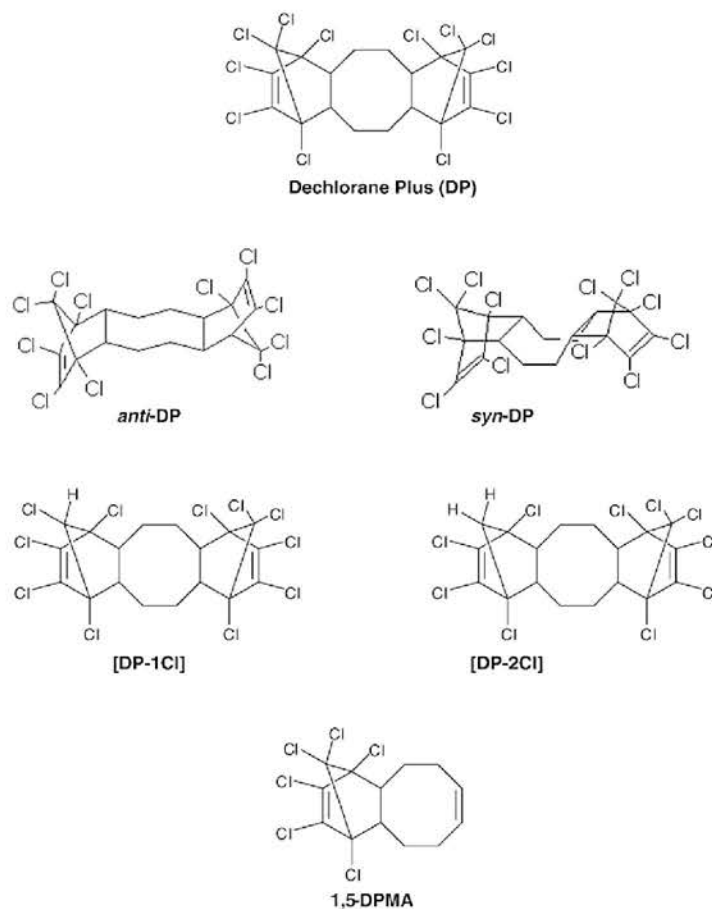


Fig. 2. Structures of Dechlorane Plus (DP), *anti*-DP, *syn*-DP, [DP-1Cl], [DP-2Cl] and 1,5-DPMA (Dechlorane Plus monoadduct).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Levels of DP and degradates

Dechlorane Plus was found in all the eggs analyzed (Table 1). The average concentration for total DP in white storks from DNP was 105 pg/g w.w. (median value 84.6 pg/g), ranging between 2.58 and 468 pg/g. The levels found for the Madrid colony were significantly higher (Mann–Whitney,  $p \leq 0.001$ ), with an average concentration of 401 pg/g w.w. (median value 306 pg/g) for total DP ranging from 56.8 to 1400 pg/g. Based on the nature of products in which DP is employed, and similarly to what has been previously described as well for PBDE and PCB contents (Van den Steen et al., 2009), higher levels in urban than in rural environments were *a priori* expected. In the urban colony, a 4-fold higher DP average concentration was observed. Similar results were reported on a survey on air samples in China, where the mean DP concentration in urban areas was about 5 times higher than that in rural areas (Ren et al., 2008).

DP concentrations in white storks were well below values found in herring gull (*Larus argentatus*) eggs from the Laurentian Great Lakes, the only bird species in which DP levels in eggs have been reported up to date. The average DP concentration for these herring gull colonies ranged between 1500 and 4500 pg/g w.w. (Gauthier et al., 2007). The fact that herring gulls are an aquatic species and white storks, a mainly terrestrial species may partially account for the DP concentration differences observed. Moreover, the colonies from the Laurentian Great Lakes are geographically located in the proximity of a DP manufacturing plant and therefore more likely are exposed to higher environmental levels of this chemical. Additionally, presently unknown DP bioconcentration and bioaccumulation effects may be involved.

Neither the retro-Diels–Alder product 1,5-DPMA nor the dehalogenation product *anti*-[DP-2Cl] were detected above their quantification limits in any sample. The other DP dehalogenation product investigated in this study, *anti*-[DP-1Cl], was found in about 10% of the samples from each colony. To the best of our knowledge, the average concentrations of 2.35 pg/g in DNP and 0.548 pg/g in Madrid are reported here for the first time in biota.

Table 1

Average, median, range and detection frequencies of *syn*- and *anti*-DP, *anti*-DP fractional abundance values ( $f_{anti}$ ) and total PBDE concentrations (pg/g w.w.) in white stork eggs from the colonies of Madrid and DNP.  $f_{anti}$  are provided with their standard deviations ( $\pm$ SD) since they follow normal distributions. PBDEs data from Muñoz-Arnanz et al. (2011).

	Madrid (n = 10)				DNP (n = 23)			
	Average	Median	Range	% > LOQ	Average	Median	Range	% > LOQ
Total DP	401	306	56.8–1400	100	105	84.6	2.58–468	100
<i>anti</i> -DP	267	203	<LOQ–1010	95.6	73.0	56.7	0.59–345	100
<i>syn</i> -DP	134	113	<LOQ–383	91.3	40.6	29.2	2.44–135	100
$f_{anti}$ ( $\pm$ SD)	0.64 ( $\pm$ 0.07)	0.65	0.55–0.73	–	0.66 ( $\pm$ 0.12)	0.68	0.40–0.87	–
$\Sigma$ PBDEs	9080	6590	2790–20500	100	1640	830	210–9500	100



### 3.2. Isomeric DP ratios

*Syn*- and *anti*-DP were quantified in about 96 and 91% of the samples from DNP, respectively. Both stereoisomers were detected and quantified in all the samples from Madrid. In order to study the possible stereoselective enrichment of DP isomers, the fractional abundance of the *anti*-isomer ( $f_{anti}$ ) was calculated as  $f_{anti} = [anti-DP] / ([anti-DP] + [syn-DP])$ . The average values for  $f_{anti} = 0.66 \pm 0.12$  for DNP was similar to that calculated for Madrid  $f_{anti} = 0.64 \pm 0.07$ . In addition, these results were similar to the technical DP value of  $f_{anti} = 0.65$  reported by Tomy et al. (2007). Nevertheless, a different value has been reported by Hoh et al. (2006) for technical DP where  $f_{anti} = 0.75$ –0.80. According to these data, and depending on the technical value considered, it appears that, if any, only a slight enrichment of the *syn*-isomer could have taken place through the food web of the white stork in both study areas. This situation is also similar to the stereoisomer enrichment described in eggs of herring gulls with  $f_{anti} = 0.69 \pm 0.08$  (Gauthier and Letcher, 2009).

Previous reports in the literature suggested that the *anti*-isomer would be more reactive and thereby susceptible to biological attack based on its less hindered spatial conformation (Hoh et al., 2006). In addition, it has been demonstrated that the *anti*-isomer degrades faster under UV light than the *syn*-isomer (Sverko et al., 2008). However, different stereoisomer enrichments have been found throughout different aquatic food webs. Tomy et al. (2007) have described an *anti*-isomer biomagnification through the food web of Lake Winnipeg and at the same time the absence of a stereoisomer biomagnification in the food web of Lake Ontario. On the contrary, Wu et al. (2010) have described a net *syn*-enrichment through the food web from a reservoir close to an electronic waste recycling site in south China.

### 3.3. DP vs PBDEs

PBDE levels in eggs of both white stork colonies were analyzed in a previous study (Muñoz-Armanz et al., 2011). Similarly, to what has been described for DP concentrations, the average concentration of PBDEs was about 5.5 times higher in samples from Madrid compared to those of the DNP colony (Table 1). PBDE concentrations were 1 to 2 orders of magnitude higher than those of total DP. Despite these differences in concentrations and based on their common nature as flame retardants, a possible correlation between DP and PBDE levels was investigated (Fig. 3). Spearman's rank coefficients for the Madrid colony showed no clear correlation

between DP and PBDEs ( $p > 0.05$ ), even after ignoring two samples regarded as outliers. In contrast, a certain correlation was found in the colony of DNP ( $r_s = 0.616$ ,  $p = 0.0023$ ). Since DP has been postulated as a possible replacement for the Deca-BDE mixture, the common occurrence of DP and BDE-209 was studied as well. The results were almost identical to those found for DP and total PBDE content, i.e. levels were not correlated in the Madrid colony ( $r_s = 0.190$ ,  $p = 0.619$ ) and correlated in the colony of DNP ( $r_s = 0.608$ ,  $p = 0.00352$ ). This was expected as BDE-209 was the predominant BDE congener in white storks reaching mean contributions of about 38 and 44% in the urban and rural colonies, respectively. Currently, there is not enough evidence to indicate similar bioaccumulation behaviors in biota, and specifically in these bird species, for these two types of contaminants. However, it is unexpected to find such a different outcome for the same species depending on the colony. These results might be linked to the ease at which certain flame retardants are released from commercial products containing them. Thus, in the city of Madrid where it is reasonable to assume a greater release of FRs in general and of PBDEs in particular, the differences between the environmental contents of DP and PBDEs may change acutely in time leading to non-equilibrium conditions and therefore confounding a clear correlation. This could be especially enhanced in the case of a more limited set of samples such as the Madrid colony ( $n = 10$ ). On the contrary, DNP is likely to be under the influence of more diffuse sources of FR contaminants and likely under higher equilibrium conditions. Furthermore, the set of samples for DNP colony is considerably greater ( $n = 23$ ), which in turn would ease the finding of possible correlations.

## 4. Conclusions

To the best of our knowledge, in this study, we have described for the first time the presence of DP in birds from a mainly terrestrial food web. Both stereoisomers were found with a fractional abundance similar to that reported for the technical product. Our findings in white stork eggs are in contrast with stereoisomer enrichments detected in some aquatic food webs. The occurrence of *anti*-[DP-ICI] in biota, postulated as a dechlorination DP product, constitutes an additional and important relevance of our study not previously reported yet. It seems that there is growing evidence for DP environmental ubiquity, and that the current knowledge about this FR as a contaminant is still very limited. The levels reported up to date in different environmental matrices tend to be orders of magnitude lower than those of other FRs such as PBDEs. However, currently DP is widely used and it will likely be used in higher quantities if it is chosen as a replacement for other regulated FRs. There is a need for further studies to gain a better understanding of the environmental occurrence, behavior and fate of this chemical.

## Acknowledgments

The authors thank EGMASA, CSIC (Project Intramural de Frontera Ref. 200680F0162) and the Regional Government of Madrid (Project P-AMB-000352-0505) for their financial support. Dr. Sáez acknowledges her postdoctoral contract through project P-AMB-000352-0505. The Monitoring team (ICTS, Reserva Biológica de Doñana, EBD-CSIC) and J.I. Aguirre are thanked for the field sampling.

## References

- Gauthier LT, Hebert CE, Weseloh DVC, Letcher RJ. Current-use flame retardants in the eggs of herring gulls (*Larus argentatus*) from the Laurentian Great Lakes. *Environ Sci Technol* 2007;41:4561–7.
- Gauthier LT, Letcher RJ. Isomers of Decachlorane Plus flame retardant in the eggs of herring gulls (*Larus argentatus*) from the Laurentian Great Lakes of North America: temporal changes and spatial distribution. *Chemosphere* 2009;75:115–20.
- Hoh E, Zhu L, Hites RA. Decachlorane Plus, a Chlorinated Flame Retardant, in the Great Lakes. *Environ Sci Technol* 2006;40:1184–9.
- Ismail N, Gewurtz SB, Pleskach K, Whittle M, Helm PA, Marvin CH, et al. Brominated and chlorinated flame retardants in Lake Ontario, Canada, lake trout (*Salvelinus namaycush*) between 1979 and 2004 and possible influences of food web changes. *Environ Toxicol Chem* 2009;28:910–20.
- Kang JH, Kim JC, Jin GZ, Park H, Baek SY, Chang YS. Detection of Decachlorane Plus in fish from urban-industrial rivers. *Chemosphere* 2010;79:850–4.
- Muñoz-Armanz J, Blázquez E, Ábalos M, Abad E, Rivera J, Baos R, et al. Dioxins and related compounds in white storks (*Ciconia ciconia*) from Doñana National Park, southwestern Spain. *Organohalogen Compd* 2008;70:1562–5.
- Muñoz-Armanz J, Sáez M, Aguirre JI, Hiraldo F, Baos R, Pacepavičius C, et al. Predominance of BDE-209 and other higher brominated diphenyl ethers in eggs of white stork (*Ciconia ciconia*) colonies in Spain. *Environ Int* 2011;37:572–6.

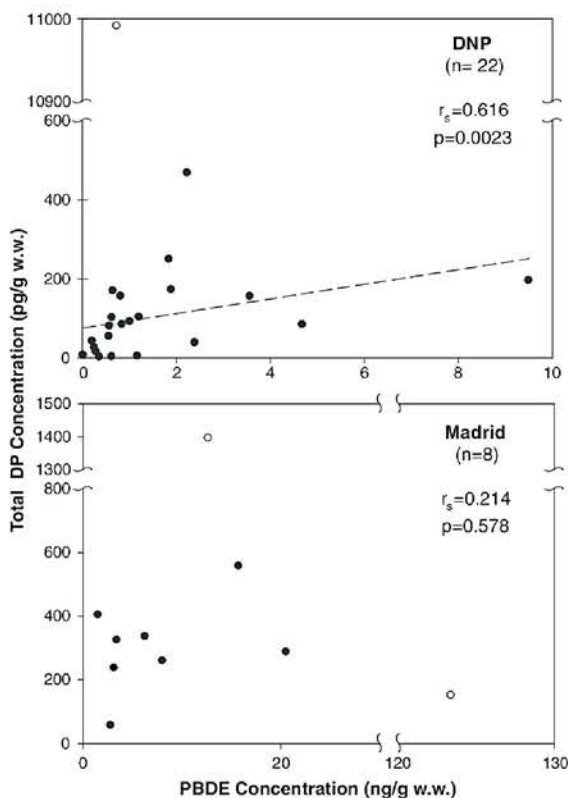


Fig. 3. Scatter plots of total DP vs total PBDE contents in both colonies of white stork.

- Qiu X, Marvin CH, Hites RA. Dechlorane Plus and other flame retardants in a sediment core from Lake Ontario. *Environ Sci Technol* 2007;41:6014–9.
- Qiu X, Hites RA. Dechlorane Plus and other flame retardants in tree bark from the northeastern United States. *Environ Sci Technol* 2008;42:31–6.
- Ren N, Sverko E, Li YF, Zhang Z, Harner T, Wang D, et al. Levels and isomer profiles of Dechlorane Plus in Chinese air. *Environ Sci Technol* 2008;42:6476–80.
- Ren G, Yu Z, Ma S, Li H, Peng P, Sheng G, et al. Determination of Dechlorane Plus in serum from electronics dismantling workers in south China. *Environ Sci Technol* 2009;43:9453–7.
- Shi T, Chen SJ, Luo XJ, Zhang XL, Tang CM, Luo Y, et al. Occurrence of brominated flame retardants other than polybrominated diphenyl ethers in environmental and biota samples from southern China. *Chemosphere* 2009;74:910–6.
- Sverko E, Tomy GT, Marvin CH, Zaruk D, Reiner E, Helm PA, et al. Dechlorane Plus levels in sediment of the lower Great Lakes. *Environ Sci Technol* 2008;42:361–6.
- Sverko E, Reiner EJ, Tomy GT, MccRindle R, Shen L, Arsenault G, et al. Compounds structurally related to Dechlorane Plus in sediment and biota from Lake Ontario (Canada). *Environ Sci Technol* 2010;44:574–9.
- The European Commission. The European Commission report on potential alternatives to deca-BDE (January 2007). [http://ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/Existing-Chemicals/Review\\_on\\_production\\_process\\_of\\_decaBDE.pdf](http://ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/Existing-Chemicals/Review_on_production_process_of_decaBDE.pdf) (last access Oct 30, 2009).
- Tomy GT, Pleskach K, Ismail N, Whittle DM, Helm PA, Sverko E, et al. Isomers of dechlorane plus in Lake Winnipeg and Lake Ontario food webs. *Environ Sci Technol* 2007;41:2249–54.
- Tomy GT, Thomas CR, Zidane TM, Murison KE, Pleskach K, Hare J, et al. 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* 2008;42:5562–7.
- US Environmental Protection Agency. High production volume (HPV) challenge. <http://www.epa.gov/chemrtk/index.htm> (last access Nov 10, 2010).
- US Environmental Protection Agency. Dechlorane Plus, CAS No. 13560-89-9, High 341 production volume (HPV) chemical challenge program: test plan (August 2004). <http://www.epa.gov/HPV/pubs/summaries/dechlorp/c15635.pdf> (last access Nov 10, 2010).
- United Nations Environment Programme (UNEP). Stockholm convention on persistent organic pollutants, adoption of amendments to annex A, B and C. [http://chm.pops.int/Portals/0/download.aspx?d=UNEP-POPS-TREATY-NOTIF-CN524\\_2009.En.pdf](http://chm.pops.int/Portals/0/download.aspx?d=UNEP-POPS-TREATY-NOTIF-CN524_2009.En.pdf) 2009 (last access Nov 18, 2010).
- Van den Steen E, Pinxten R, Jaspers VLB, Covaci A, Barba E, Carere C, et al. Brominated flame retardants and organochlorines in the European environment using great tit eggs as a biomonitoring tool. *Environ Int* 2009;35:310–7.
- Venier M, Hites RA. Flame retardants in the atmosphere near the Great Lakes. *Environ Sci Technol* 2008;42:4745–51.
- Wu JP, Zhang Y, Luo XJ, Wang J, Chen SJ, Guan YT, et al. Isomer-specific bioaccumulation and trophic transfer of Dechlorane Plus in the freshwater food web from a highly contaminated site, south China. *Environ Sci Technol* 2010;44:606–11.
- Zhu J, Feng YL, Shoeib M. Detection of Dechlorane Plus in residential indoor dust in the city of Ottawa, Canada. *Environ Sci Technol* 2007;41:7694–8.



Capítulo 5

*Evolución de COP y DP en Doñana*



## 5.1. INTRODUCCIÓN

---

Paralelamente a la investigación desarrollada para llevar a cabo la determinación de contaminantes emergentes como los PBDEs y el DP en las muestras del END y de Madrid, detallada en el Capítulo 4, se procedió al análisis del contenido de compuestos organohalogenados, todos ellos COP, de un carácter más clásico, como es el caso de los PCBs, DDTs, y PCDD/Fs. Para el caso concreto de las dioxinas y furanos y de los PCBs *no-orto*, cuya determinación instrumental requiere de un alto grado de sensibilidad y selectividad que normalmente se aborda mediante espectrometría de masas de alta resolución con instrumentos de sector magnético, se contó con la colaboración del Dr. Esteban Abad del Laboratorio de Dioxinas perteneciente al Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua (IDAEA), dependiente a su vez del CSIC. Dado que los resultados obtenidos en las investigaciones anteriores mostraron claras diferencias para todos los contaminantes en función de cada zona, se decidió llevar a cabo una nueva investigación más ambiciosa que además evaluase la posible evolución de todos estos contaminantes en el tiempo en ambas áreas de estudio. Para ello se trabajó con nuevas colecciones disponibles de huevos infértiles de la misma especie indicadora, la cigüeña blanca, de las mismas zonas previamente consideradas. En el caso de Doñana y su entorno las nuevas muestras disponibles del año 2010 suponían una diferencia aproximada de diez años respecto a las primeras muestras obtenidas durante los años 1999/2001. Para el caso de la región de Madrid las nuevas muestras supusieron un periodo ligeramente inferior de tan solo seis años (huevos de 2005 y 2011).

También se llevó a cabo el análisis de isótopos estables en los huevos infértiles muestreados para poder integrar a la discusión, basada en los niveles de contaminantes analizados, información concreta y empírica correspondiente a la dieta de las cigüeñas blancas estudiadas que pudiera mejorar la interpretación de los niveles encontrados en esta especie.

La base o principio de la determinación de los isótopos de nitrógeno reside en el conocido enriquecimiento que se produce del  $^{15}\text{N}$  con respecto al  $^{14}\text{N}$  a medida que aumentan los niveles de una cadena trófica, debido a que el isótopo más pesado tiende a

acumularse de manera preferencial desde la dieta ingerida a los tejidos de un organismo consumidor dado. De esta manera la relación  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  se utiliza comúnmente como un indicador de la posición de un organismo en una cadena trófica determinada (Hobson 1992). En consecuencia, el análisis de isótopos estables y en concreto del nitrógeno ( $^{15}\text{N}$  y  $^{14}\text{N}$ ) y del carbono ( $^{13}\text{C}$  y  $^{12}\text{C}$ ) es una herramienta cada vez más empleada en estudios de contaminación por la valiosa información que aporta para la interpretación de los niveles de contaminantes que se encuentran en una determinada especie (Fisk, Hobson et al. 2001; Christensen, MacDuffee et al. 2005; Krahn, Pitman et al. 2008).

En el caso de los isótopos del carbono también existe un cierto fraccionamiento del  $^{13}\text{C}$  y  $^{12}\text{C}$  en función del nivel trófico, pero es mucho más pequeño que el producido para el N y por lo tanto carece de utilidad práctica en este sentido. Sin embargo, debido a las diferentes formas de fijación del  $\text{CO}_2$  atmosférico que las plantas de distintos medios desarrollan durante la fotosíntesis, la relación  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  proporciona información sobre el tipo de vegetación que ingieren los organismos herbívoros, y que a su vez se transferirá a organismos superiores de una cadena trófica.

La explicación de este fenómeno es muy sencilla. Casi el 99 % del  $\text{CO}_2$  atmosférico contiene el carbono ligero  $^{12}\text{C}$ . Una pequeña parte, el 1,1 % del  $\text{CO}_2$ , es algo más pesado, ya que contiene  $^{13}\text{C}$ . En el proceso de absorción fotosintética de  $\text{CO}_2$ , la vegetación terrestre y el fitoplancton marino practican una discriminación en contra de las moléculas pesadas, prefiriendo el  $^{12}\text{C}$  al  $^{13}\text{C}$ . De esta forma el carbono atrapado en los vegetales continentales contiene una menor proporción de  $^{13}\text{C}$  que el carbono del  $\text{CO}_2$  atmosférico.

El 85 % de las plantas superiores (casi todas las arbóreas) son del tipo C3 lo que indica que el primer compuesto orgánico fabricado en su fotosíntesis tiene 3 átomos de carbono. Las plantas C3 presentan unas proporciones de  $^{13}\text{C}$  inferiores a las de los compuestos homólogos con 4 átomos de carbono que sintetizan las plantas del tipo C4, también en el primer paso de la fotosíntesis. Esto es debido a la mayor discriminación en contra del  $^{13}\text{C}$  que llevan a cabo las plantas C3 en comparación con las C4, que por el contrario tienden a emplear indistintamente ambos isótopos en la fijación del C atmosférico. La mayoría de las plantas del tipo C4, aproximadamente el restante 15% de las plantas superiores, son hierbas tropicales.

Las plantas acuáticas presentan relaciones intermedias a las producidas por las plantas terrestres, por lo que en su conjunto la relación  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  puede proporcionar información sobre el tipo de vegetación C3 vs. C4 y del carácter terrestre vs. acuático del hábitat de alimentación de un organismo estudiado (Kelly 2000). En resumen, el estudio combinado de las relaciones isotópicas del nitrógeno y del carbono en un determinado tejido de un organismo dado puede proporcionar información muy útil en relación al tipo y procedencia de la dieta ingerida por dicho organismo, la cual puede ayudar en la interpretación del grado y origen de determinados contaminantes presentes en el mismo.

La magnitud de la variación de las relaciones isotópicas del N y C entre diferentes matrices o tejidos es muy pequeña; por ello usualmente en su análisis suele emplearse la notación delta ( $\delta$ ) que se expresa en unidades por millar y se calcula según la siguiente expresión:

$$\delta X(\text{‰}) = \left( \frac{R_{\text{muestra}}}{R_{\text{patrón}}} - 1 \right) \times 1000$$

en donde X puede ser el  $^{15}\text{N}$  o  $^{13}\text{C}$ ,  $R_{\text{muestra}}$  corresponde a la relación isótopo pesado/isótopo ligero de la muestra analizada y  $R_{\text{patrón}}$  corresponde a la misma relación pero de un patrón internacional de referencia (Michener and Lajtha 2007).

## REFERENCIAS

- Christensen, J. R., M. MacDuffee, et al. (2005). "Persistent organic pollutants in British Columbia grizzly bears: consequence of divergent diets." Environmental Science and Technology **39**(18): 6952-6960.
- Fisk, A. T., K. A. Hobson, et al. (2001). "Influence of chemical and biological factors on trophic transfer of persistent organic pollutants in the Northwater Polynya marine food web." Environmental Science and Technology **35**(4): 732-738.
- Hobson, K. (1992). "Determination of trophic relationships within a high Arctic marine food web using  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  analysis." Marine Ecology Progress Series **84**: 9-18.

- Kelly, J. F. (2000). "Stable isotopes of carbon and in the study of avian and mammalian trophic ecology." Canadian Journal of Zoology **78**(1): 1-27.
- Krahn, M. M., R. L. Pitman, et al. (2008). "Use of chemical tracers to assess diet and persistent organic pollutants in Antarctic Type C killer whales." Marine Mammal Science **24**(3): 643-663.
- Michener, R. H. and K. Lajtha (2007). Stable isotopes in ecology and environmental science, Blackwell Pub.

## 5.2. DIFERENCIAS EN NIVELES Y COMPORTAMIENTO DE CONTAMINANTES CLÁSICOS Y EMERGENTES EN HUEVOS DE CIGÜEÑA BLANCA DE ESPAÑA COMPARADOS EN EL INTERVALO (1999-2011)

---

Las investigaciones presentadas en el Capítulo 4 hicieron posible conocer por vez primera el estado de contaminación por PBDEs y DP en el END y en la región de Madrid, tras la recolección y análisis de huevos de *Ciconia ciconia* en 1999/2001 y 2005, respectivamente. La posterior obtención de nuevas colecciones de huevos de la misma especie y de las mismas áreas, permitieron planificar un estudio más ambicioso y global tanto en el tiempo como en la selección del número y tipo de contaminantes.

Concretamente, en este trabajo se investigaron las diferencias en la contaminación por COP, durante intervalos de aproximadamente 10 años en el END y 6 años en la región de Madrid, considerando los COP clásicos tales como: PCBs, DDTs y PCDD/Fs, a la par que los PBDEs y DP, considerados emergentes. Además, se llevó a cabo el análisis de isótopos estables ( $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$ ) en todas las muestras con objeto de mejorar la interpretación de los niveles de los contaminantes determinados en las mismas.

Para ello, además de las colecciones de huevos infértiles de cigüeña blanca analizadas anteriormente (23 huevos del END de 1999/2001 y 10 huevos de Madrid de 2005) se analizaron dos nuevas colecciones constituidas por 10 huevos del END del 2010 y 14 huevos de la región de Madrid del 2011.

La totalidad de 57 muestras de huevos infértiles fue analizada siguiendo el mismo esquema analítico anteriormente descrito en el Capítulo 4. De las tres fracciones extraídas, la primera contuvo no solo la proporción cuantitativa de los PBDEs y DP, sino también de los PCBs *orto* sustituidos. En la segunda fracción se extrajeron los PCBs no-

*orto* sustituidos, mientras que PCDD/Fs se separaron íntegramente en la tercera fracción.

Diferentes técnicas instrumentales fueron utilizadas en la determinación de los distintos analitos en función del tipo de contaminante, congénere y/o año de procedencia de las muestras:

#### PCBs *orto* sustituidos y DDTs

- GC- $\mu$ ECD para las muestras del END 1999/2001 y Madrid 2005
- GC-MS para las muestras del END 2010 y Madrid 2011 (con inyección on-column para el caso del análisis de los DDTs)

PCDD/Fs y PCBs no *orto* sustituidos: GC-HRMS para todas las muestras

#### PBDEs

- GC-NCI-MS para congéneres tri a hepta bromosustituidos de todas las muestras
- GC-HRMS para congéneres octa, nona y deca bromosustituidos de todas las muestras

#### DP

- GC-HRMS para las muestras del END 1999/2001 y Madrid 2005
- GC-NCI-MS para las muestras del END 2010 y Madrid 2011

Los resultados de los análisis revelaron una presencia generalizada del conjunto de los contaminantes investigados en todas las muestras, acorde con la naturaleza de COP de la mayor parte de los mismos. En general, la mayor parte de los contaminantes fueron hallados en concentraciones significativamente superiores en la región de Madrid. Sin embargo, los niveles de DDTs y PCBs constituyeron importantes excepciones, siendo mayores en el END, aunque no significativamente distintos a los de Madrid. Mientras que concentraciones más elevadas de DDTs se esperaban para el END en base al marcado carácter agrícola de la Comarca de Doñana, el hallazgo de niveles tan altos para los PCBs en el END fue inesperado, sugiriendo la probable presencia de fuentes no identificadas de bifenilos policlorados en esta zona cuyo origen continúa siendo objeto de investigación.



Independientemente del área de estudio y del intervalo de tiempo considerado ( $\approx 10$  años para el END vs. 6 años para Madrid), el patrón de comportamiento para cada tipo de contaminantes –clásicos o emergentes– fue muy similar. De este modo, fueron observados descensos acusados para los PCBs y PCDD/Fs en ambas áreas, siendo dichos descensos más moderados para los DDTs y especialmente en el END. La disminución de las concentraciones de PCDD/Fs experimentada en seis años en la región de Madrid, equiparó los niveles de dichos contaminantes en Madrid 2011 a los registrados en un área protegida y rural como es el END en el 2010, indicando así un aumento de la eficiencia de las medidas adoptadas en tiempos recientes para la reducción de la emisión de estos COP que son liberados al medio como subproductos no intencionados en procesos de combustión. Por el contrario, los contaminantes emergentes, tanto en el END como en Madrid, registraron grandes incrementos en sus concentraciones en los intervalos de años estudiados. Es interesante destacar uno de los principales resultados obtenidos de este estudio como es el notable incremento registrado en los niveles de DP. Éste igualó o superó al de los PBDEs en ambas áreas, lo que parece indicar un aumento cuantitativo del uso de dicho retardante de llama, para el que a día de hoy se desconoce en gran medida su comportamiento medioambiental y muy especialmente su capacidad tóxica.

Los valores medidos de  $\delta^{15}\text{N}$ , y especialmente de  $\delta^{13}\text{C}$ , no pudieron correlacionarse de manera significativa y general con el grado de contaminación de las muestras. No obstante, los valores medidos sí fueron significativamente distintos para las cigüeñas de cada región, refrendando la hipótesis inicial sobre la existencia de dietas diferenciadas entre éstas. Además, los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  y  $\delta^{13}\text{C}$  se mantuvieron relativamente inalterados para cada grupo de cigüeñas en los intervalos de tiempo estudiados, sugiriendo de esta forma el mantenimiento en el tiempo de cada tipo de dieta. Esto, a su vez, permitió validar el papel de la *Ciconia ciconia* como una especie bioindicadora apropiada para el estudio del tipo y grado de contaminación en las áreas seleccionadas en esta investigación.

Este estudio ha dado lugar a una publicación científica y se ha presentado en dos congresos, uno nacional y otro internacional según se detalla a continuación.

**Publicación:**

Título: Dissimilar Outcomes for Emerging and Legacy Contaminants in White Stork Eggs from Spain (1999-2011)

Autores: Juan Muñoz-Arnanz, Mónica Sáez, Alba Vicente, Jose Luis Roscales, Jose Ignacio Aguirre, Raquel Baos, Fernando Hiraldo, Grazina Pacepavicius, Mehran Alaei, Pilar Fernández, Begoña Jiménez

Revista: Science of the Total Environment (**Enviado**)

**Congresos:**

IV Reunión Nacional de Dioxinas, Furanos y Compuestos Orgánicos Persistentes Relacionados

Título: White storks do not deliver babies, but they do deliver good news on reduction of legacy POPs in Spain

Tipo de participación: Comunicación Oral

Lugar celebración: Alicante, España

Fecha: 26-28/Junio/2013

33<sup>th</sup> International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (POPs). DIOXIN 2013

Título: Legacy vs. emerging POPs and Dieldrin Plus in white stork eggs: very opposite outcomes in two breeding areas of Spain

Tipo de participación: Comunicación Oral

Lugar celebración: Daegu, Corea del Sur

Fecha: 26-30/Agosto/2013

---

## Dissimilar Outcomes for Emerging and Legacy Contaminants in White Stork Eggs from Spain (1999-2011)

Juan Muñoz-Arnanz<sup>1</sup>, Mónica Sáez<sup>1</sup>, Alba Vicente<sup>1</sup>, Jose Luis Roscales<sup>1</sup>, Jose I. Aguirre<sup>2</sup>, Fernando Hiraldo<sup>3</sup>, Raquel Baos<sup>3</sup>, Grazina Pacepavicius<sup>4</sup>, Mehran Alaei<sup>4</sup>, Laura Morales<sup>5</sup>, Esteban Abad<sup>5</sup>, Pilar Fernández<sup>6</sup>, Begoña Jiménez<sup>1</sup>

1. Department of Instrumental Analysis and Environmental Chemistry, Institute of Organic Chemistry, CSIC. Juan de la Cierva 3, 28006, Madrid, Spain
2. Department of Zoology and Physical Anthropology, Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, 28040, Madrid, Spain
3. Department of Applied Biology, Doñana Biological Station, CSIC. Avda. Américo Vespucio s/n, 41092 Sevilla, Spain
4. Aquatic Ecosystem Protection Research Division, Environment Canada, 867 Lakeshore Road, P.O. 10 Box 5050, Burlington, Ontario, Canada, L7R 4A6
5. Department of Environmental Chemistry, Institute of Environmental Assessment and Water Research, CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034, Barcelona, Spain
6. Departamento de Ciencias Analíticas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Educación a Distancia, Senda del Rey 9, 28040, Madrid, Spain

### ABSTRACT

In this study, the occurrence of halogenated organic compounds including classical (PCBs, DDTs and PCDD/Fs) and emerging (PBDEs and DP) contaminants were investigated in white stork eggs from two areas in Spain. One of the study areas, Doñana National Park (DNP), is a rural and protected space from which samples were collected in the years 1999, 2001 and 2010. The other study area was the urban and industrial region of Madrid from which samples were collected in the years 2005 and 2011. Generally, PCDD/Fs, PBDEs and DP were determined in higher concentrations in the urban/industrial area while DDTs were determined in higher concentrations in the rural/protected area. PCBs, however, were unexpectedly quantified in similar or higher levels in the rural than the urban area. No clear explanation was found for this unexpected finding for which further investigation is required. Classical contaminants, PCBs and DDTs, registered sharp declines in both study areas accordingly to their discontinued production and use. PCDD/F levels also declined sharply highlighting the efficiency of the measurements adopted to minimize the emissions of these contaminants. PBDEs and DP increased their concentration levels in both areas. The increase of DP was quantified in 5.89 times for DNP (within ~10 years) and in 10.2 times for Madrid (within six years). These data seem to indicate a heightened use in recent years of this unregulated flame retardant for which much is still unknown about its toxicity and environmental behaviour and fate.

**Keywords:** PCBs, DDTs, PCDD/Fs, PBDEs, DP, *syn*-DP, *anti*-DP, *f<sub>anti</sub>*, BDE-209, Doñana National Park

## 1. INTRODUCTION

Polychlorinated biphenyls (PCBs) and dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) are examples of legacy man-made organochlorine pollutants stemming from industrial and agricultural uses, respectively (Safe 1994; Borja, Taleon et al. 2005; Beard 2006). They are ubiquitous in the environment despite their production and use were discontinued in most parts of the world decades ago. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans (PCDD/Fs) have never been commercially produced. Instead, they are created in a different number of human activities and in natural processes (Hites 1990; Kulkarni, Crespo et al. 2008). As a result of their ubiquity and exceptional persistence they are as well examples of organochlorine legacy pollutants. Additionally, and owing to their toxicity, persistence, bioaccumulative potential and long-range transportation, PCBs, DDT and PCDD/Fs meet the criterion of persistent organic pollutants (POPs) under the Stockholm Convention (SC) (UNEP 2001)

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and dechlorane plus (DP) are additive halogenated flame retardants present in a wide variety of consumer products including plastics, electronics, textiles and building materials among others (Shaw 2010). They both are examples of emerging pollutants. Evidence derived from the great deal of research carry out on PBDEs and their environmental occurrence led to the inclusion in 2009 of the penta-BDE and octa-BDE commercial mixtures in the group of POPs under the SC (Stockholm Convention 2013). Prior to that action, the penta- and octa-mixtures were banned in Europe or voluntarily phased out in the US since 2004 (Harrad 2010). The third

existing commercial BDE mixture -the deca-BDE- was restricted in Europe in 2008 for electronic and electrical uses and it will be voluntarily phased out in the US by the end of 2013 (BSEF 2012). However, it is still unregulated in most parts of the world and largely present in an ample array of commercial products also persisting in the areas where its production and use is restricted.

DP was first synthesized as a substitute for dechlorane or mirex in the late 1960's. Since then it has been in use as flame retardant; albeit, its environmental presence was only first detected in 2006 (Hoh, Zhu et al. 2006). The research available on DP to date seems to highlight the persistence and ubiquity of this flame retardant in all environmental compartments (e.g. soils, air, biota, humans) along with certain biomagnification potential in aquatic foodwebs (Sverko, Tomy et al. 2011; Xian, Siddique et al. 2011). The environmental presence of some DP dechlorinated forms such as the undecachloropentacyclooctadiene, [DP-1Cl], and the decachloropentacyclooctadiene, [DP-2Cl], has been detected as well, and considered to be possible abiotic and/or biotic DP degradation products (Sverko et al. 2011; Xian et al. 2011).

Currently, DP is classified by the United States Environmental Protection Agency (USEPA) as a high-production-volume chemical (USEPA 2009), and the European Commission has listed it as a possible replacement for the today restricted deca-BDE mixture (Pakalin, Cole et al. 2007). Yet, very little is still known about DP's toxicity in biota or humans.

It is generally accepted that birds are very suitable bioindicators for the contamination state of the areas they inhabit

(Furness 1993; Becker 2003). Due to pollutant bioaccumulation and biomagnification processes, birds that occupy high positions in food webs of aquatic and terrestrial ecosystems are frequently useful bioindicators playing a role of either accumulative and/or sentinels for contaminants. Among the different bird sampling strategies, eggs have been employed in a great number of scientific researches to date (Becker, Cifuentes et al. 2001; Van den Steen, Jaspers et al. 2008; Verreault, Gabrielsen et al. 2010). Furthermore, the use of addled eggs as a non-destructive approach has been proven to be a valuable monitoring tool for contaminants such as POPs which are resistant to post-hatching microbiological degradation (Herzke, Kallenborn et al. 2002; Jaspers, Covaci et al. 2005). Contaminant burdens of female birds at the time of laying are expected to be reflected in the concentrations found in their eggs. Although there is a certain degree of variation depending upon species, most of the transferred pollutant burden corresponds to that recently associated to the fat and protein accumulated for a female at the breeding area (Becker 2003; Cifuentes, Becker et al. 2003).

The analysis of stable isotopes on animal tissues -including eggs- and specifically of nitrogen ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ) and carbon ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$ ) has become a common tool in the study of the trophic ecology of marine and terrestrial organisms (Kelly 2000). Due to the trophic fractionation that stable nitrogen isotopes undergo in food webs,  $\delta^{15}\text{N}$  is usually employed as an indicator of an organism's trophic position. Additionally, and due to the different baseline levels for stable carbon isotopes between aquatic and terrestrial ecosystems,  $\delta^{13}\text{C}$  is primarily used for information on dietary carbon sources (Kelly 2000; Michener and Lajtha 2007).

The white stork is a top predator and highly opportunistic feeder with a diet encompassing a wide variety of prey including invertebrates (insects, earthworms, mollusks and crustaceans) and vertebrates (amphibians, fish, small mammals and, rarely, the chicks or eggs of ground-nesting birds) (Negro, Tella et al. 2000; Kruszyk and Ciach 2010). In this study, addled eggs from white storks (*Ciconia ciconia*) were selected as monitoring tools for POPs and other halogenated pollutants like DP. Two different colonies with marked habitat differences were investigated. One of them was located at the region of Madrid in central Spain, under high anthropogenic pressures, and for which the presence of accessible garbage dumps nearby means a constant and reliable source of food (Blanco 1996; Aguirre 2006). In contrast to the most industrialized and urban area of Madrid, the second study colony inhabited Doñana National Park (DNP) and its surroundings. DNP is located at southwestern Spain and is regarded as an ecologically sensitive rural area being the largest reserve of bird species in Europe (Grimalt, Ferrer et al. 1999). White storks from this colony have a surplus of food resources due to the invasion and spread of what is one of their main prey, the North American red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) (Baos, Jovani et al. 2012).

Earlier works highlighted noticeable differences between the contents of emerging pollutants (PBDEs and DP) for these two colonies (Muñoz-Arnanz, Sáez et al. 2011a; Muñoz-Arnanz, Sáez et al. 2011b). Recent egg sampling campaigns made it available samples six and ten years older than those initially collected from the colonies of Madrid and DNP, respectively. Consequently, the main objectives of this study were (1) to investigate

burdens of pollutants (legacy and emerging) in eggs from each colony and its relationships with habitat and diet by using  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  to track food sources, and (2) to study the shift in time of legacy and emerging contaminants in both colonies.

## 2. MATERIALS & METHODS

### 2.1. Sample Collection

A total of 57 white stork addled eggs were collected. Twenty-three and ten eggs were sampled from Doñana National Park (Figure S1) during the breeding seasons of 1999-2001 and 2010, respectively. Ten and fourteen eggs were collected from the region of Madrid (Figure S1) during the breeding seasons of 2005 and 2011, respectively. After careful nest monitoring at each breeding season, sampling took place at the same time intervals. Consequently, a similar water loss was expected among eggs. Samples were kept at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis. Prior to residue analysis each egg was examined and none of them was embryonated.

### 2.2. Contaminant analysis

Egg samples were analyzed for PCBs (20 congeners *ortho*-chlorinated and 4 non-*ortho*-chlorinated), DDTs (*p,p'*-DDT and its two main metabolites *p,p'*-DDE and *p,p'*-DDD), PBDEs (28 congeners), DPs (*syn*- and *anti*-DP, *anti*-[DP-1Cl], *anti*-[DP-2Cl]) and PCDD/Fs (7 PCDDs and 10 PCDFs 2,3,7,8-chlorinated), following the procedures described elsewhere (Merino, Bordajandi et al. 2005). Details on the analytical procedure, chemicals used, lipid content determination, residue quantification and quality assurance and control are comprehensively provided in the Supplementary Information.

### 2.3. Stable isotope analysis

The determination of carbon and nitrogen stable isotopes in the egg samples was carried out at the Serveis Científico-Tècnics in the University of Barcelona (Barcelona, Spain) following the procedure described elsewhere (Muñoz-Arnanz, Roscales et al. 2012). Details on the sample preparation and stable isotope analysis are provided in the Supplementary Information.

### 2.4. Data analysis

Concentrations are given in both wet weight (w.w.) and lipid weight (l.w.) basis to facilitate the comparison with most studies. Values in l.w. basis are provided for comparison purposes, but generally no significant correlation was found between the contents of lipids and each type of contaminant for any location and year studied.

Eggs from DNP sampled in 1999 and 2001 were considered one set of eggs under the denomination of DNP 2000. This assumption was taken after testing the non-existence of statistically significant differences in the content of each type of contaminant between both subsets of eggs.

Samples with concentrations below the quantification limits (LOQs) were assigned a value of zero. Statistical analyses were carried out with SigmaPlot for Windows version 11.0 (Systat Software Inc, CA, USA) and IBM SPSS Statistics for Windows version 19 (SPSS Inc, IL, USA). Log-transformation was applied to meet the criterion of normality in data distributions. When log-transformation did not meet normality, non-parametric tests were applied. Pearson product-moment (parametric) or Spearman's rank order (non-parametric)

correlations were used to study possible relationships between study variables. Principal Component Analysis (PCA), with Varimax normalized rotation, was carried out on the relative abundance of the different congeners of PCBs, PCDD/Fs and PBDEs. A minimum significance level of  $\alpha=0.05$  was set throughout this study.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Legacy contaminants

##### 3.1.1. Occurrence and change in PCB levels

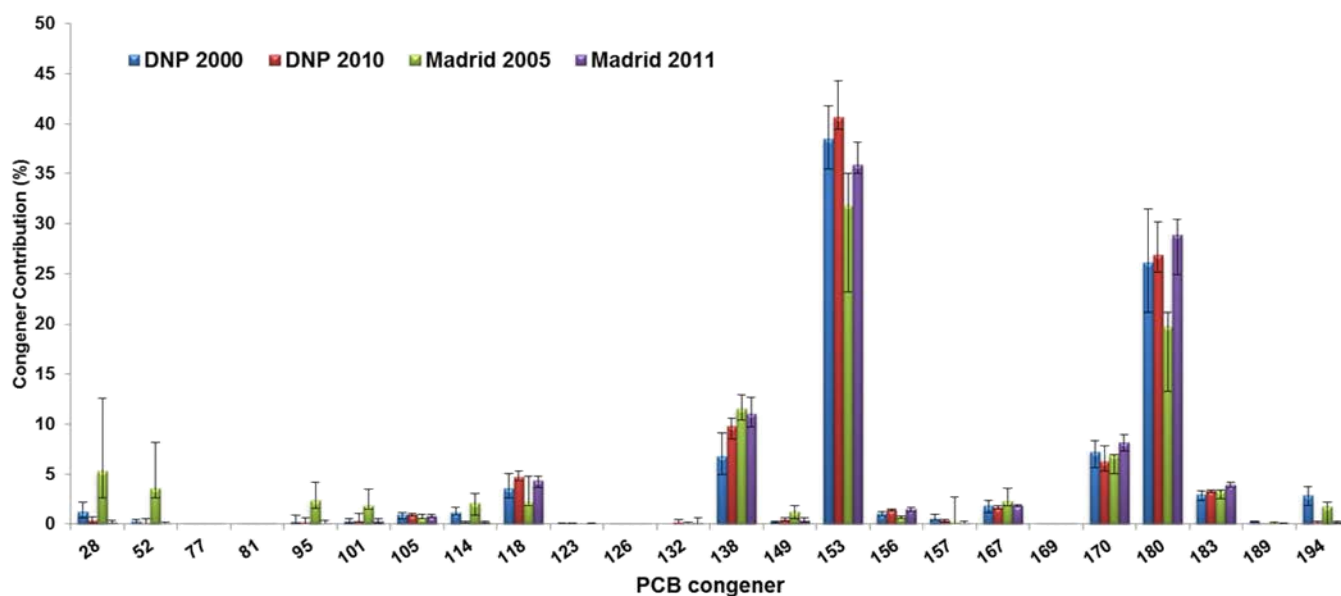
PCBs constituted the second most abundant group of pollutants in eggs from DNP and the most abundant in white stork eggs from Madrid (Table 1). They were quantified in all samples from both locations in all years (Table S7 and Figure S2). Some sparse data are available in the literature for comparison of PCB burdens in bird eggs from these study areas (Table 2). Hernandez and others (1988) reported PCBs in white stork eggs sampled from DNP in 1985 and 1986 in relatively similar concentrations to those found in this study for DNP in 2000. Nevertheless, this lack of alteration in PCB levels during a 15-year-period must be taken with caution given the important differences between the instrumental techniques used and the number of PCB congeners determined (not indicated in Hernandez and others, 1988). Data for DNP in 2000 are quite consistent with the levels reported for other avian species from the same area sampled about the same year (Table 2). A clear exception is the red kite that as a prey bird occupies a higher trophic position thereby exhibiting much greater levels of some contaminants. In comparison to DNP, there is a smaller similarity between the results found

for Madrid 2005 and the PCB levels reported in other studies on the same or similar areas (Table 2). Apart from inter-species dissimilarities, this scenario might be influenced by the greater difference in the sampling time in which those investigations were carried out. To the best of our knowledge there are no available data to compare on PCB levels in avian eggs either for DNP or Madrid in the recent years.

After performing a non-parametric Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's method for multiple comparisons, statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) in total PCB contents were only found between DNP 2000/2010, Madrid 2005/2011 and DNP 2000/Madrid 2011. A sharp decrease in PCB levels during the time range studied was found in both localities according to the ratio of their median concentration values: 5.98 (DNP 2000/2010) and 6.49 (Madrid 2005/2011). This decrease was expected given the existing bans on the PCB production and use and the restrictions on the disposal and elimination of materials and equipment containing them. It was also expected to find marked differences between DNP as a rural and protected area and Madrid as a highly industrialized and urbanized region. However, not significant differences were found between DNP 2000/Madrid 2005, Madrid 2005/DNP 2010 or DNP 2010/Madrid 2011. Higher levels of PCBs in bird eggs from the Doñana area in comparison to eggs from areas in Spain with a greater industrial and/or urban influence have been reported in the past by different studies (Hernandez, Gonzalez et al. 1988; Hernández, González et al. 2008). No clear causes for this degree of PCB contamination at DNP has been provided other than the loads that the Guadalquivir river may transfer to the aquatic

ecosystem of DNP after flowing through a major urban and industrial center (the city of Seville) and before entering the park. In April of 1998, DNP was subjected to a serious pollution burden due to the spill of over six million cubic meters of acidic waste from the dyke of the Aznalcollar iron pyrite mine (Grimalt, Ferrer et al. 1999). As a result, short-term monitoring activities reported increased levels of metals and metalloids on humans and wildlife (Baos, Jovani et al. 2012). No studies, however, have linked the occurrence of this environmental disaster with a direct contamination with PCBs or other POPs. On top of the above mentioned, the results from this study show how the declining rate of PCB concentrations is greater in the Madrid area than in DNP even within a shorter period of time (six years in Madrid *vs.* ten years in DNP). This seems to point out the existence of PCB sources presumably in the surroundings of DNP which should warrant further investigation.

PCB profiles for both locations and all years were relatively similar (Figure 1). They were also relatively similar to those reported for the species listed in Table 2 from the same study areas. A PCA performed on the relative abundance of each PCB congener segregated white stork eggs from Madrid 2005 (Figure S3), mainly due to their higher contribution of lower chlorinated congeners such as PCB-28, -52, -95 and -101. Yet and commonly to all cases, two congeners PCB-153 and -180 dominated all profiles accounting for 52 to 67% of the total PCB content. Important contributions were found for congeners -138, -170 that accounted together for 14 to 19%, and for congeners -118 and -183 which represented together from 5 to 8% of the total PCB content. They are examples of penta- to hepta-chlorinated PCB congeners lacking vicinal hydrogen atoms in the *meta-para* and/or *ortho-meta* positions. Because of their degree of chlorination and substitution pattern, these congeners are highly resistant to biodegradation



**Figure 1.** Relative contribution of each PCB congener to the total PCB content in each location and year studied. Error bars represent 25 and 75 percentiles.



(Borja, Taleon et al. 2005) and biotransformation hindering metabolic processes mediated by the cytochrome P450 monooxygenase enzyme system (Kannan and Petrick 2009). As a result, these congeners are commonly found dominant in terrestrial and aquatic bird profiles around the world (Minh, Kunisue et al. 2002; Chen, Zhang et al. 2009; Quinn, Roos et al. 2013).

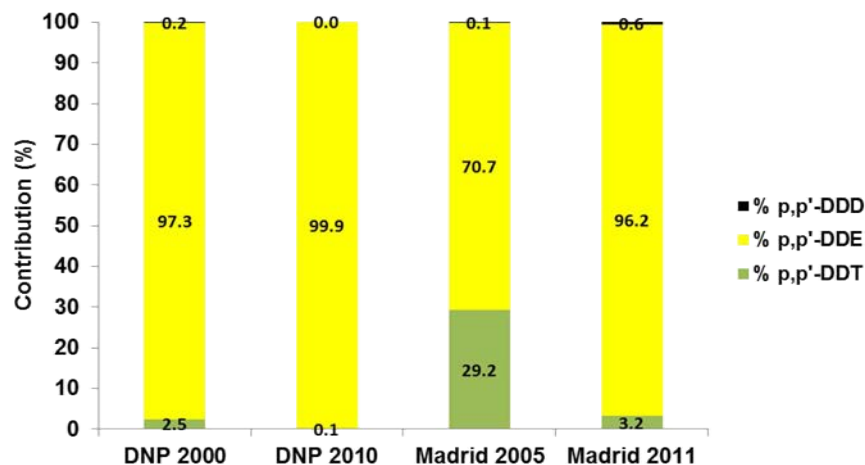
### 3.1.2. Occurrence and change in DDT levels

Conversely to PCBs, DDTs represented the most abundant group of pollutants in eggs from DNP and the second most abundant in white stork eggs from Madrid in 2005. Specific concentration values and distribution for each locality and year are provided in Tables 1 and S8 and Figure S4. A major contribution of DDTs to the total contaminant burden in white stork eggs from DNP was expected given the marked agricultural nature of DNP surroundings. Despite the ban on the use of DDT in Spain in 1977, the levels reported for Hernandez et al. (1988) for the same species and area were very similar (Table 2). The relative abundance of *p,p'*-DDT was, however, much higher in the samples from the mid 80's (Table 2 and Figure 2). Again, the same precautions as for PCB levels reported by that study have to be exerted. DDT levels in white storks from DNP were relatively similar to those reported in greater flamingo eggs from the same area in 1996, and notably inferior to those for red kite and imperial eagle eggs (with these both species occupying higher positions in their food webs). As with PCBs, there is a smaller similarity between the results found for Madrid 2005 and DDT levels reported in other studies on the

same or similar areas and relatively concomitant in time (Table 2). This is chiefly due to differences in the sampling years and to trophic inter-species differences. Also, to the best of our knowledge there are no available data to compare on DDT contents in avian eggs either for DNP or Madrid in the recent years.

A decrease in DDT levels was found in both localities according to the ratio of their median concentration values: 2.25 (DNP 2000/2010) and 4.48 (Madrid 2005/2011). It is worth noting how this decrease is less steep than that found for PCB levels. In fact, the differences in total DDT concentrations between DNP 2000/2010 and Madrid 2005/2011 were not significant ( $p > 0.05$ ) after performing a non-parametric Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's method for multiple comparisons. Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) were only observed between DNP 2000/Madrid 2005, DNP 2000/Madrid 2011 and DNP 2010/Madrid 2011.

*p,p'*-DDE not only accounted for the highest contribution of total DDTs in both locations, but also increased through time (Figure 2). This is consistent with the longer persistence that *p,p'*-DDE exhibits in abiotic matrices and in higher organisms as a chief product of the *p,p'*-DDT metabolic degradation (Fishbein 1974; Sidra and Walker 1980). The highest *p,p'*-DDT contribution was found in white storks from Madrid in 2005 (~29% of the total DDT content). Interestingly, a similar outcome was reported by Jiménez et al. (2004) for black kite eggs sampled in Madrid from 2001 to 2003 perhaps pointing to the existence of relatively recent DDT inputs in this area. However, no further information is available to



**Figure 2.**  $p,p'$ -DDT,  $p,p'$ -DDE and  $p,p'$ -DDD contribution to the total DDT content in each location and year studied.

corroborate this hypothesis. It is worth highlighting how new inputs of  $p,p'$ -DDT were detected in soils sampled in 2007 and 2008 under different crops in the surroundings of DNP (Muñoz-Arnanz and Jiménez 2011). Nonetheless, the reported concentrations were relatively low (median DDT content of 0.52 ng/g dry weight). This along with the facts that  $p,p'$ -DDE concentrations in white storks from DNP ranked the highest and that conversion of  $p,p'$ -DDT into  $p,p'$ -DDE progresses throughout foodwebs (Aguilar 1984), probably explain the apparent lack of reflection of new DDT inputs in white storks from DNP in 2010.

### 3.1.3. Occurrence and change in PCDD/F levels

2,3,7,8-substituted PCDD/Fs were quantified in all samples from all years and locations in the range of the low pg/g (Table 1 and S9, Figure S5). The level range found in eggs from DNP in 2000 (2.96 to 44.4 pg/g w.w) was similar to that reported in white stork

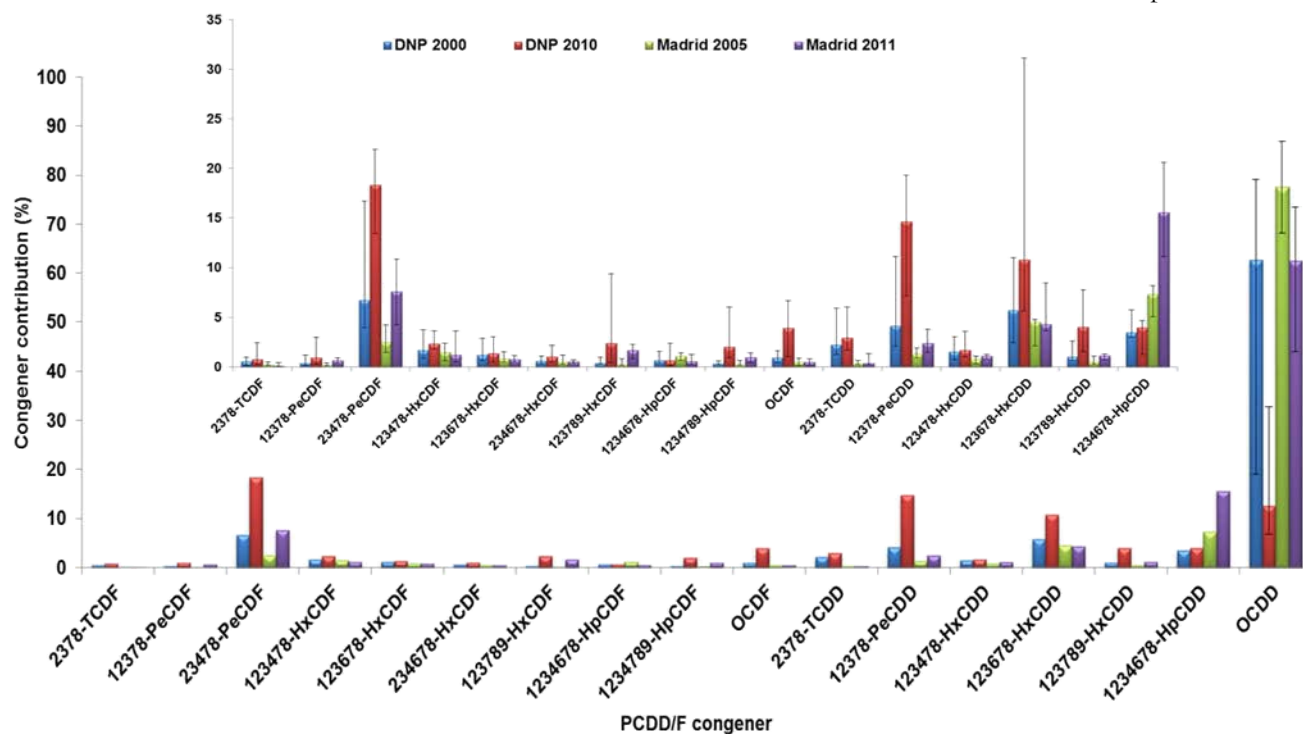
eggs from DNP in 1998 (4.56 to 69.6 pg/g w.w.) (Jiménez, Gómara et al. 2000) and also comparable to that found in red kites from DNP between 2000 and 2001 (7.22 – 42.0 pg/g w.w.) (Gómara, González et al. 2008). Despite inter-species differences, the reported average concentration in black kite eggs sampled in Madrid in 2001 and 2002 (36.6 pg/g w.w.) was also comparable to that found in white storks from Madrid 2005 (26.8 pg/g w.w. Table 1). As with PCBs and DDTs, no information on PCDD/Fs is available to perform comparisons on avian eggs either for DNP or Madrid in the last few years.

A decrease in PCDD/F levels was found in both localities according to the ratio of their median concentration values: 3.70 (DNP 2000/2010) and 7.27 (Madrid 2005/2011). After performing an ANOVA followed by the Holm-Sidak method for (parametric) multiple comparisons, significant differences ( $p < 0.001$ ) in PCDD/F contents were found between all locations and years except for one case: DNP 2010/Madrid 2011 ( $p = 0.766$ ). It is interesting to note how the

steep decrease recorded in Madrid from 2005 to 2011 placed the total PCDD/F content at a very parallel level as the one found for DNP in 2010.

PCDD/F profiles showed a certain degree of variability across locations and years (Figure 3) being DNP 2010 particularly different from the rest of them. This was corroborated by the PCA carried out on the relative abundance of each PCDD/F congener (Figure S6) in which samples from Madrid 2005, 2011 and most of DNP 2000 clustered together. PCDDs dominated the total content of PCDD/Fs in all years and locations (Figure S5) with median contributions from 71.4 to 92.0%. In general, the chief contributor to PCDD/F levels was the OCDD congener with median abundances from 62.5% to 77.6%, with the exception of DNP 2010 (12.6%). Other important contributors were 2,3,4,7,8-PeCDF (7.15%), 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD (5.65%) and

1,2,3,6,7,8-HxCDD (5.11%). Profiles for DNP 2000 and Madrid 2005 and 2011 relatively resemble those found in red kite eggs from Menorca Island (Spain) between 1994 and 2000 (Jiménez, Merino et al. 2007). The profile found in DNP 2010 is similar to that reported in peregrine falcon eggs from Madrid (2000 and 2001) (Merino, Bordajandi et al. 2005) and in red kite eggs from DNP (1999 to 2001) (Gómara, González et al. 2008). The predominance of OCDD is typically described in combustion processes from municipal solid waste incinerators (Buekens, Cornelis et al. 2000) as well as associated to the use of the today banned pentachlorophenol (Ryan and Pilon 1982). An abundance of 2,3,4,7,8-PeCDF is considered closely associated to technical PCBs (Van den Berg, Blank et al. 1987). However, the variability in congener patterns from avian species is strongly influenced by difference sources in different areas, feeding habits and dissimilarities in metabolic capacities



**Figure 3.** Relative contribution of each PCDF and PCDD congener to the total PCDD/F content in each location and year studied. Error bars represent 25 and 75 percentiles.

and rates (Tanabe, Watanabe et al. 2003). Hence, it is not possible to unequivocally assign each congener's abundance to a specific source.

### 3.2. Emerging contaminants

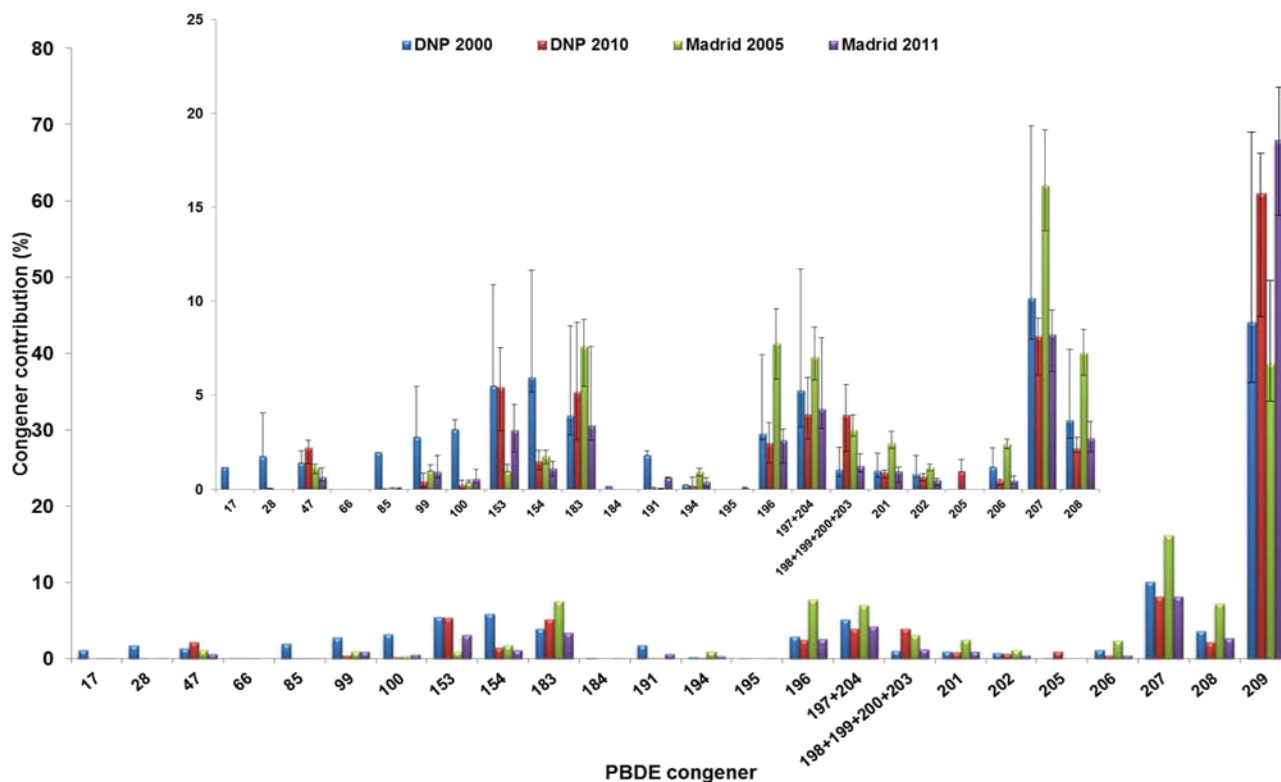
#### 3.2.1. Occurrence and change in PBDE levels

In average, PBDEs represented the third most abundant group of pollutants in both colonies (ranking second in Madrid 2011, Table 1 and Figure S7). Most congeners were quantified in all samples (Table S10). It is difficult to establish similar comparisons as those previously done with PCBs, DDTs and PCDD/Fs given the scarcity of published data on PBDEs in Spanish birds. To date, only Guerra et al. have reported PBDE values in peregrine falcon eggs from Spain sampled from 2003 to 2006 (Guerra, Alae et al. 2012). These authors found median (and range) concentrations of 227 (160 – 3,600) and 1,200 (710 – 5,300) in ng/g l.w. for falcons sampled in central and northern Spain, respectively. These values amply surpassed those found for white storks in this study except for the case of birds from Madrid 2011, which showed a median value roughly double (525 ng/g l.w.) than that reported for falcons from central Spain. Nonetheless, since they are different species, occupying different trophic positions and sampled at different areas and time, this comparison on PBDE levels should be cautiously exerted.

A substantial increase in PBDE levels was found in both localities according to the ratio of their median concentration values: 6.04 (DNP 2010/2000) and 3.72 (Madrid 2011/2005). The execution of an ANOVA followed by the *post hoc* Holm-Sidak method

showed significant differences ( $p < 0.05$ ) in PBDE contents between locations and years except for one case: DNP 2010/Madrid 2005 ( $p = 0.432$ ). A major presence of PBDEs in urban areas was expected; hence, it is worth highlighting how the increase of concentrations placed a rural and protected area such as DNP in 2010 at a similar level as that found for Madrid 2005. Moreover, it is unclear why the increase in DNP was much higher than that in Madrid. We hypothesize that it might respond to a relative moderation of point sources in Madrid, for which levels in 2005 were already considerably elevated.

PBDE profiles presented variability in terms of each BDE individual abundance, but all of them were dominated by the presence of BDE-209 (Figure 4). In a lesser extent, other higher brominated congeners such as BDE-183, -196, -197+204, and -207 were commonly abundant with contributions around 5% or higher. A PCA performed on the relative abundance of BDE congeners grouped together eggs from DNP 2010 and Madrid 2011 due to the heightened weight of BDE-209 (Figure S8). It also segregated most eggs from Madrid 2005 due to the greater abundance of specific congeners such as BDE-183, -196, -207 and -208. The pattern BDE-207 > BDE-208 > BDE-206 was observed in all profiles as a fingerprint for BDE-209 biodegradation and/or environmental debromination (Chen and Hale 2010; Muñoz-Arnanz, Sáez et al. 2011). Furthermore, BDE-202 was quantified in all samples from DNP 2010, Madrid 2005/2011 and ~83% of those from DNP 2000. This congener, whose presence has never been reported in any commercial BDE mixture, might be regarded as a BDE-209 debromination product either by environmental (bio)transformation or as a



**Figure 4.** Relative contribution of each PBDE congener to the total PBDE content in each location and year studied. Error bars represent 25 and 75 percentiles.

metabolic product from higher brominated congeners (Stapleton, Brazil et al. 2006; Chen and Hale 2010)

The predominance of BDE-209 grew stronger through time in both areas: DNP 2000 (44.1%) / DNP 2010 (61.0%) and Madrid 2005 (38.6%) / Madrid 2011 (68.1%). Accordingly, the ratio [BDE-209]/[octa- and nona-BDEs] increased as well in both locations: DNP 2000 (1.7) / DNP 2010 (2.9) and Madrid 2005 (0.8) / Madrid 2011 (3.0). This outcome is likely to respond to the intensified use of the deca-BDE mixture after the ban on the penta- and octa-BDE mixtures in 2004, as well as the accumulative release of PBDEs from the ever increasing and long-lasting commercial products containing them. In this regard, it is interesting to note how PBDE profiles found

in Spanish peregrine falcons were not dominated by BDE-209 and other higher brominated BDEs. Instead, BDE-153 was the most abundant congener with important contributions of BDE-47, -99, and -100. Based on the similar PBDE profiles registered in white stork eggs from two very distinct areas and different times, it is interesting to witness how PBDE profiles can differ that much between Spanish falcons and storks. Trophic differences may play an important role explaining it. The higher positions that peregrine falcons hold probably encompass a greater number of biological transfers along their respective food webs. In turn, this might involve a less preferential uptake of higher brominated BDEs. Furthermore, differences between metabolic capabilities and rates and possible contamination sources with marked

and distinct PBDE profiles cannot be ruled out.

### 3.2.2. Occurrence and change in DP levels

Both dechlorane plus isomers (*syn*- and *anti*-) were quantified in almost all samples from DNP and Madrid (Tables 1 and S11 and Figure S9). Concentration range values and frequency of quantification of DP isomers and dechlorinated DP products are provided in Table S11. The dechlorination product *anti*-[DP-1Cl] was quantified with increased frequency throughout the sampling time reaching a 100% of Madrid 2011 samples, while *anti*-[DP-2Cl] was not found in any sample. Guerra et al. also investigated DP burdens in eggs of peregrine falcon sampled in Spain from 2003 to 2006 (Guerra, Fernie et al. 2011). These authors reported median (and range) concentrations of 600 (300 – 3,600) and 2,300 (400 – 17,000) in pg/g l.w. for falcons from central and northern Spain, respectively. As opposed to PBDEs, these values were exceeded by those found for white storks, including the lowest levels measured in DNP 2000 that fell between the DP burdens detected for each type of peregrines. This might point out a higher bioaccumulation behavior of DP relative to that of PBDEs, at least in the species studied. The only dechlorination product found in Spanish peregrines was *anti*-[DP-1Cl] that was measured in ~38% from the northern specimens' eggs. Despite the opposite outcomes described for DP and PBDE burdens in storks and peregrines, in the evaluation of these comparisons the same precautions as those previously stated for PBDEs should be taken into account.

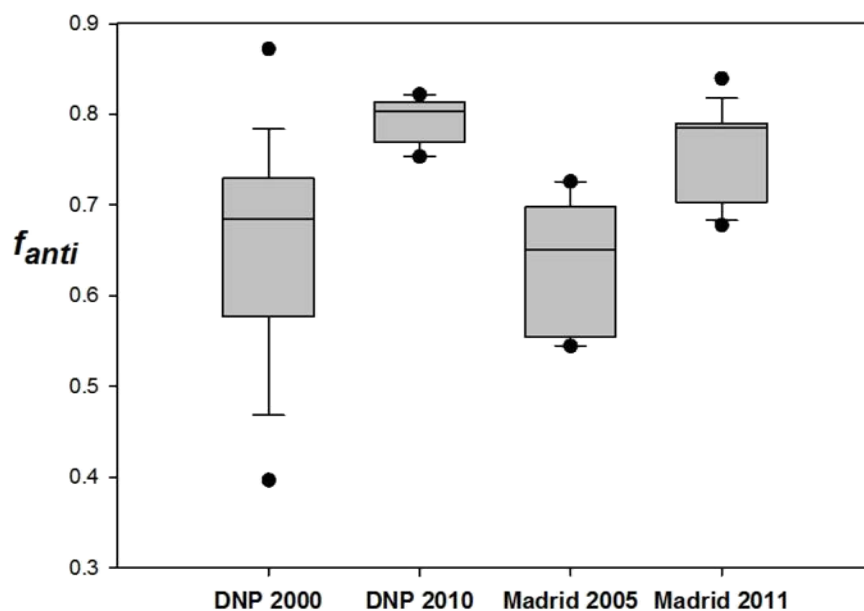
DP concentrations increased in both localities according to the ratio of their median values: 5.89 (DNP 2010/2000) and 10.2 (Madrid 2011/2005). This increase was rather similar to that for PBDEs in DNP and about 3 fold relative to that registered for PBDEs in Madrid. This remarkable rise of DP levels in Madrid within six years might be an indicator of a sustained proliferation of this flame retardant in consumer products. It also might be an indication of existing point sources of DP like garbage dumps that should warrant further investigation. Significant differences ( $p < 0.05$ ) were found between all localities and years after analysis by a Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's method for multiple comparisons. The only exception was DNP 2010 / Madrid 2005. Thus and similarly to what described for PBDEs, the increase in DP levels has placed the contamination of a rural and protected area such as DNP to a comparable situation as that occurring in an urban/industrial region like Madrid in 2005.

The *anti*-isomer fractional abundance  $f_{anti} = [anti-DP] / ([anti-DP] + [syn-DP])$  was determined to study a possible stereoselective enrichment of DP in white stork eggs (Figure 5). The following average  $\pm$  SD values were calculated for: DNP 2000 ( $0.66 \pm 0.12$ ), DNP 2010 ( $0.79 \pm 0.03$ ), Madrid 2005 ( $0.64 \pm 0.07$ ), and Madrid 2011 ( $0.76 \pm 0.05$ ). Non-significant differences ( $p > 0.05$ ) were only detected between DNP 2000/Madrid 2005 and DNP 2010/Madrid 2011 after performing a Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's *post hoc* method for multiple comparisons.

To date, a relatively wide variability in  $f_{anti}$  values has been observed in diverse biotic and abiotic matrices (Sverko, Tomy et al. 2011; Xian, Siddique et al. 2011). This might reflect

differences in the environmental degradation of each isomer along with species dissimilarities in uptake ratios, bioaccumulation and/or metabolic capabilities. A mean value of 0.68 (range of 0.59 to 0.8) for technical DP based on the different reported values was detailed by Wang et al. (Wang, Yang et al. 2010). Average  $f_{anti}$  values in white storks fell within this range. However, it is unclear why virtually the same *anti*-DP enrichment took place in DNP and Madrid transitioning from a similar  $f_{anti}$  value between them to a different but again similar value within ten and six years, respectively. Significant correlations with opposite trends between DP burdens and  $f_{anti}$  values have been found in birds. A negative relationship was described in muscle tissue of common kingfishers (*Alcedo atthis*) (Mo, Wu et al. 2013), whereas a positive correlation was determined in muscle and liver of Eurasian sparrowhawk (*Accipiter nisus*) (Chen et al. 2013). Similar

relationships were explored in white stork eggs from this study (Figure S10). DNP 2000 and 2010 and Madrid 2005 and 2011 exhibited a general trend, albeit non-significant, in which greater DP contents corresponded to higher  $f_{anti}$  values. The only significant correlation ( $p=0.0232$ ) was found for Madrid 2011, where conversely, DP and  $f_{anti}$  were negatively associated. From these data no clear conclusions could be drawn regarding a possible influence of DP levels on the isomeric composition. Manufacturing processes may exert an important influence on the DP isomeric composition found in consumer products (Chen, Wang et al. 2013), which is in agreement with the wide range (0.59 – 0.8) reported for  $f_{anti}$  in technical DP. Hence, a consistent shift over time towards technical DP presenting higher *anti*-DP relative contributions may partially account for the similar evolution of  $f_{anti}$  determined in DNP and Madrid in this study.



**Figure 5.** Box-and-whisker plots (boxes are depicted as first and third quartiles with the median indicated, and whiskers correspond to 10 and 90% percentiles) of fractional abundances ( $f_{anti} = [anti-DP]/([anti-DP] + [syn-DP])$ ) in white stork eggs from each location and year studied.

**Table 1.** Arithmetic mean, median, geometric mean and range of concentrations (w.w.; values in l.w. within parenthesis) of the study pollutants in white stork eggs from colonies of DNP and Madrid from different years.

	MEAN	MEDIAN	GEOMETRIC MEAN	RANGE
<b>PCBs (ng/g)</b>				
DNP 2000	715 (10,200)	445 (6,550)	502 (6,930)	76.2 – 3,180 (1,290 – 50,000)
DNP 2010	82.2 (1,430)	74.4 (1,130)	69.1 (1,210)	25.6 – 187 (411 – 3,000)
MADRID 2005	247 (3,400)	281 (3,710)	209 (2,920)	72.0 – 406 (1,150 – 5,880)
MADRID 2011	63.8 (1,360)	43.3 (965)	50.1 (1,070)	21.1 – 223 (392 – 3,560)
<b>non-ortho PCBs (pg/g)</b>				
DNP 2000	160 (2,360)	155 (2,120)	131 (2,110)	5.68 – 296 (552 – 4,640)
DNP 2010	58.2 (1,040)	46.6 (771)	53.0 (929)	26.8 – 105 (577 – 2,230)
MADRID 2005	168 (2,340)	171 (2,230)	152 (2,130)	74.1 – 263 (1,030 – 4,240)
MADRID 2011	36.6 (812)	25.3 (594)	31.6 (674)	16.6 – 87.0 (301 – 1,760)
<b>DDTs (ng/g)</b>				
DNP 2000	873 (12,600)	597 (9,320)	498 (8,520)	4.41 – 3,220 (1,260 – 50,600)
DNP 2010	332 (5,550)	265 (5,020)	218 (3,740)	34.2 – 861 (652 – 14,300)
MADRID 2005	84.6 (1,150)	73.4 (1,000)	63.2 (884)	17.1 – 165 (258 – 2,260)
MADRID 2011	19.8 (418)	15.0 (402)	16.1 (343)	5.82 – 67.8 (109 – 1,080)
<b>PCDD/Fs (pg/g)</b>				
DNP 2000	15.1 (217)	12.1 (181)	11.2 (164)	2.96 – 44.4 (50.2 – 674)
DNP 2010	3.24 (53.4)	3.27 (60.1)	3.10 (50.2)	1.34 – 4.51 (21.6 – 77.6)
MADRID 2005	26.8 (365)	23.4 (323)	22.4 (314)	7.01 – 52.3 (103 – 628)
MADRID 2011	3.45 (66.9)	3.22 (52.9)	2.84 (53.2)	0.87 – 10.4 (15.0 – 194)
<b>PBDEs (ng/g)</b>				
DNP 2000*	1.64 (22.2)	0.832 (12.9)	1.01 (13.9)	0.214 – 9.50 (3.66 – 125)
DNP 2010	6.08 (120)	5.05 (12.9)	5.24 (13.9)	1.96 – 13.3 (20.5 – 271)
MADRID 2005*	9.08 (122)	6.59 (98.6)	7.06 (97.6)	2.79 – 20.5 (44.9 – 302)
MADRID 2011	33.2 (739)	26.6 (681)	24.6 (525)	5.32 – 88.8 (106 – 1,990)
<b>DP (pg/g)</b>				
DNP 2000**	105 (1,480)	84.6 (1,220)	53.2 (800)	2.58 – 468 (35.5 – 5,890)
DNP 2010	609 (11,800)	498 (8,280)	456 (7,990)	143 – 1,340 (2,060 – 33,300)
MADRID 2005**	401 (5,330)	306 (4,340)	297 (4,150)	56.8 – 1,400 (913 – 17,400)
MADRID 2011	3,010 (69,300)	3,120 (60,700)	2,220 (47,400)	274 – 5,320 (5,440 – 178,000)

\*data in w.w. obtained from Muñoz-Arnanz, Sáez et al. 2011a

\*\* data in w.w. obtained from Muñoz-Arnanz, Sáez et al. 2011b



**Table 2.** Concentrations of PCBs and DDTs (ng/g w.w.) in bird eggs from DNP and Madrid areas reported up to date in different studies.

DNP	PCBs (ng/g w.w.)		DDTs (ng/g w.w.)		SAMPLING TIME	CITE
	GEOMETRIC MEAN	RANGE	GEOMETRIC MEAN	RANGE		
white stork ( <i>Ciconia ciconia</i> )	814	230 – 2,700	415 ( <i>p,p'</i> -DDE) 76 ( <i>p,p'</i> -DDT)	270 – 710  20 – 260	1985 – 1986	(Hernandez, Gonzalez et al. 1988)
greater flamingo ( <i>Phoenicopterus ruber</i> )	528	352 – 907	721 ( <i>p,p'</i> -DDE)	466 – 2,370	1996	(Guitart, Clavero et al. 2005)
booted eagle ( <i>Hieraetus pennatus</i> )	556 <sup>A</sup>	102 – 1,460	-	-	1999 – 2001	(Gómara y González 2006)
buzzard ( <i>Buteo buteo</i> )	-	82 – 12,600	-	-	1999 – 2001	(Gómara y González 2006)
red kite ( <i>Milvus milvus</i> )	36,700 <sup>A</sup>	519 – 110,000	3,800	177 – 34,200	1999 – 2001	(Gómara y González 2006; Gómara, González et al. 2008)
imperial eagle ( <i>Aquila adalberti</i> )	1,370	-	2,090 ( <i>p,p'</i> -DDE)	-	1989 – 2003	(Hernández, González et al. 2008)
MADRID / CENTRAL SPAIN	GEOMETRIC MEAN	RANGE	GEOMETRIC MEAN	RANGE	SAMPLING TIME	CITE
white stork ( <i>Ciconia ciconia</i> )	434	250 – 1,160	193 ( <i>p,p'</i> -DDE) 40 ( <i>p,p'</i> -DDT)	60 – 444 n.d. – 160	1985 – 1986	(Hernández, Gonzalez et al. 1988)
imperial eagle ( <i>Aquila adalberti</i> )	784	430 – 3,340	957 ( <i>p,p'</i> -DDE)	-	1989 – 2003	(Hernández, González et al. 2008)
peregrine falcon ( <i>Falco peregrinus</i> )	1,220	4,270 – 6,620**	518	227 – 1,920 144 – 203 ( <i>p,p'</i> -DDE)	2000 – 2001	(Merino, Bordajandi et al. 2005)
black Kite ( <i>Milvus migrans</i> )	5,340*	-	160 ( <i>p,p'</i> -DDE) 55.1 ( <i>p,p'</i> -DDT)	22.0 – 86.3 ( <i>p,p'</i> -DDT)	2001 – 2003	(Jiménez, Merino et al. 2004)

<sup>A</sup> stands for arithmetic mean

\*Arithmetic mean calculated from the values provided for 2001, 2002 and 2003

\*\*Range of arithmetic means from 2001, 2002 and 2003

**Table 3.** Arithmetic mean, median, geometric mean and range of WHO<sub>1998</sub>-TEQs (pg/g, w.w.) for each colony and year. Contribution of PCDDs, PCDFs, non-ortho PCBs and mono-ortho PCBs to total TEQs is also provided.

WHO <sub>1998</sub> -TEQs (pg/g, w.w.)	MEAN	MEDIAN	GEOMETRIC MEAN	RANGE	AVERAGE CONTRIBUTION (%)
<b>DNP 2000</b>					
TEQs PCDDs	1.14	1.14	0.899	0.080 – 3.62	4.68
TEQs PCDFs	1.17	1.16	0.930	0.050 – 3.16	5.70
TEQs NON-ORTHO PCBs	12.8	12.2	10.4	0.380 – 24.3	48.5
TEQs MONO-ORTHO PCBs	23.8	4.36	6.58	0.260 – 158	41.1
<b>TOTAL TEQs</b>	<b>41.0</b>	<b>29.4</b>	<b>24.5</b>	<b>1.28 – 189</b>	
<b>DNP 2010</b>					
TEQs PCDDs	0.575	0.551	0.510	0.228 – 1.20	9.76
TEQs PCDFs	0.636	0.589	0.584	0.269 – 0.962	10.6
TEQs NON-ORTHO PCBs	4.58	3.60	4.14	2.15 – 8.57	75.2
TEQs MONO-ORTHO PCBs	0.289	0.253	0.243	0.117 – 0.697	4.40
<b>TOTAL TEQs</b>	<b>6.24</b>	<b>5.25</b>	<b>5.68</b>	<b>3.34 – 11.4</b>	
<b>MADRID 2005</b>					
TEQs PCDDs	0.458	0.445	0.436	0.273 – 0.674	3.36
TEQs PCDFs	0.820	0.758	0.721	0.365 – 2.05	5.98
TEQs NON-ORTHO PCBs	12.1	13.4	10.9	5.15 – 17.7	80.7
TEQs MONO-ORTHO PCBs	1.29	1.13	1.04	0.289 – 2.82	9.94
<b>TOTAL TEQs</b>	<b>14.7</b>	<b>15.9</b>	<b>13.7</b>	<b>6.82 – 20.9</b>	
<b>MADRID 2011</b>					
TEQs PCDDs	0.108	0.086	0.081	0.008 – 0.368	3.01
TEQs PCDFs	0.242	0.163	0.191	0.036 – 0.637	6.47
TEQs NON-ORTHO PCBs	2.96	1.92	2.54	1.39 – 7.03	84.5
TEQs MONO-ORTHO PCBs	0.204	0.150	0.163	0.067 – 0.589	6.00
<b>TOTAL TEQs</b>	<b>3.51</b>	<b>2.29</b>	<b>3.01</b>	<b>1.69 – 8.14</b>	

### 3.3. Toxicity assessment and considerations

It is well established that the major toxic action of PCDD/F congeners 2,3,7,8-substituted and that of dioxin-like PCBs (non-*ortho* and mono-*ortho* substituted congeners) involves a common first step of binding with the cytosolic receptor AhR (Mandal 2005). Thus, the potential toxicity of mixtures of these analytes is normally assessed by the toxic equivalent quantity (TEQ) approach in which the toxicity of each congener is relativized to that of the most toxic one: the 2,3,7,8-TCDD (Schechter, Birnbaum et al. 2006). In the present study TEQs in white stork eggs were estimated using toxic equivalency factors (TEFs) for birds reported by Van den Berg (Van den Berg, Birnbaum et al. 1998) as shown in Table 3. The major contribution to total TEQs stemmed from the content of non-*ortho* PCBs in all locations, being particularly dominant in DNP 2010 and Madrid 2005 and 2011 (Table 3). In DNP 2000 the TEQ contribution of mono-*ortho* PCBs rivaled that of non-*ortho* PCBs, reflecting the much higher abundance of mono-*ortho* PCBs in this location and year (Tables 3 and Figure S2). The contribution of PCDDs and PCDFs to total TEQs was rather similar in DNP whereas in Madrid PCDDs always contributed more than PCDFs. Toxic threshold for some avian species, albeit not white stork, has been established. Thus, a no-observed-effect-level (NOEL) based on CYP1A induction of 37 pg TEQ/g and 100 pg TEQ/g w.w. on a whole egg have been suggested for osprey (*Pandion haliaetus*) and bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*) chicks, respectively (Elliott, Norstrom et al. 1996; Elliott, Wilson et al. 2001). About 29% of eggs from DNP 2000 surpassed the NOEL of 37 pg TEQ/g and about 10% of them surmounted

the NOEL of 100 pg TEQ/g. However, the TEQ content in all eggs from DNP 2010 and Madrid 2005 and 2011 was always lower than the NOEL of 37 pg/g, accordingly to the recorded reduction of these legacy contaminants. Despite inter-species sensitivity differences towards these types of AhR receptor-binding pollutants, the current TEQ levels found are not likely to affect the reproduction of white storks inhabiting either DNP or Madrid areas.

Likewise, the content of total PCB (mostly comprising *ortho*-PCBs) in eggs from DNP and Madrid was always inferior to that (4,000 ng/g w.w.) reported to cause reduced hatchability, embryo mortality and deformities in birds (Brunström and Halldin 2000). Similarly, the *p,p'*-DDE content in eggs from all locations and years was much lower than the threshold suggested for reduced hatching success in green-backed herons (*Butorides striatus*) (5,100 – 10,000 ng/g w.w.) (White, Fleming et al. 1988). As with the TEQ levels previously reported, and bearing in mind the great variability among different species towards pollutant's toxicity, it does not appear that the current total PCB and DDE concentrations found in this study are likely to exert deleterious effects in the reproduction of white storks.

To date, toxicological studies about PBDEs in birds are scant and mostly limited to the effects of congeners stemming from penta-BDE mixtures (e.g. DE-71). However, the biotransformation of BDE-209 into less brominated and more toxic and bioaccumulative congeners in European starlings (*Sturnus vulgaris*) has been shown by (Van den Steen, Covaci et al. 2007). A lowest-observed-effect-level (LOEL) of PBDEs

associated with impaired pipping and hatching success was described for concentrations of 1,800 ng/g w.w. in eggs for American kestrels (*Falco sparverius*) (McKernan, Rattner et al. 2009). Additionally, a total PBDE burden of 1000 ng/g w.w. was suggested by (Henny, Kaiser et al. 2009) as a threshold above which PBDE levels might lead to reduce reproductive performance in ospreys. Concentrations *in ovo* found for white storks in this study ranked between one and two orders of magnitude lower than those reference values for ospreys and kestrels. However, an increased usage of the deca-BDE mixture and a predominance of BDE-209 and other higher brominated BDEs have been found. The reduced knowledge about the specific toxicity of higher brominated congeners along with the likely biotransformation processes in avian organisms builds up uncertainty about possible deleterious effects in white stork's health and reproductive behavior.

In regard to DP, only two studies have addressed until today its possible toxicity in avian organisms. (Crump, Chiu et al. 2011) followed a combined *in vitro/in ovo* approach and concluded that DP did not significantly affect cytotoxicity or embryonic viability in domestic chickens at current environmental exposure concentrations. (Li, Yu et al. 2013) exposed male common quails (*Coturnix coturnix*) to commercial DP at different concentrations. After 90 days, these authors found dose-dependent and tissue-specific accumulation of DP isomers, and potential subchronic toxicities derived of oxidative stress in quails exposed to the highest concentrations. Based on these results, it does not seem likely that the concentrations measured in white storks - considerably lower than those employed and/or measured in these toxicity studies- have

been or are today of concern. Nonetheless, the little understanding on the effects of this emerging pollutant in most species together with the witnessed trends of increasing DP environmental occurrence make it not possible to carry out a risk assessment for white storks.

### 3.4. Isotopes and correlations

Determined values for  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  in white stork eggs are provided in Table S12 and Figure S11. A Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's method for multiple comparisons highlighted significant differences ( $p < 0.05$ ) for both stable isotope ratios between DNP and Madrid, but not in each location between different years. This seems to indicate that the diet of specimens from both colonies did not noticeably shift within the time range studied, and therefore marked variations in the contaminant burdens cannot be attributed to dietary differences. Consequently, sets of data from both years were combined and explored for each location. Nitrogen ratios were significantly greater (Mann-Whitney U-test:  $U=12$ ,  $p < 0.001$ ) in DNP (mean  $\pm$  SD,  $12.0 \pm 1.4\text{‰}$ ) than in Madrid ( $9.07 \pm 0.49\text{‰}$ ). Equally, the combined ratios of carbon were significantly different (Mann-Whitney U-test:  $U=55$ ,  $p < 0.001$ ) in DNP ( $-24.8 \pm 1.5\text{‰}$ ) from those in Madrid ( $-22.4 \pm 0.6\text{‰}$ ). These differences in stable isotope ratios could be the result of the expected dissimilarities between the white storks' diet from both colonies. The higher  $\delta^{15}\text{N}$  mean value in DNP along with its wider range may reflect a higher proportion of a broader animal origin in the food consumption of these birds. Similarly, a wider range of  $\delta^{13}\text{C}$  values was observed for the white storks inhabiting DNP, likely related to their higher intake of resources stemming from

an animal origin as well. Yet, the lower  $\delta^{13}\text{C}$  average value found in eggs from DNP does not fit with the greater contribution of aquatic resources –such as crayfish- assumed in the diet of DNP white storks. This might be explained on the basis of very specific carbon inputs that storks from Madrid may be incorporating from garbage dumps. Further, direct comparisons on isotopic levels between specimens from each area must be cautiously performed since values for the isotopic baselines of DNP and Madrid are not known.

Correlations between contaminant burdens and  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  were explored within each locality and year (Figure S12). Levels of pollutants did not significantly correlate with  $\delta^{13}\text{C}$  save for the case of PCBs in Madrid 2005. Regarding  $\delta^{15}\text{N}$ , only five significant positive correlations -out of twenty- were observed with contaminant burdens of DDTs, PCDD/Fs and DP. This low number of significant correlations with  $\delta^{15}\text{N}$  was somewhat unexpected given the known tendency for most study pollutants to biomagnify along trophic levels and even at an intra-species level. Interestingly, DP, whose biomagnification potential in terrestrial foodwebs is still unclear, correlated with  $\delta^{15}\text{N}$  in samples from Madrid 2005 and 2011. On the other hand, significant negative correlations were found for PCDD/Fs in Madrid 2011 and for DP in DNP 2010 difficult *a priori* to interpret and probably associated to local point sources of contamination.

#### 4. SUMMARY AND CONCLUSIONS

A decline in PCB, DDT and PCDD/F concentrations was quantified in DNP (from 2000 to 2010) and Madrid (from 2005 to 2011). This might be explained on the basis of their

discontinued production and use. Yet, it also may highlight the increasing compliance of regulatory international agreements like the Stockholm Convention, whose aim is the decrease and eventual elimination of these legacy POPs from the environment. Particularly interesting was the occurrence and evolution of PCBs in DNP. Reasons and sources explaining why an area like DNP showed as elevated or higher PCB levels as an urban/industrial area like Madrid should be investigated. The more prominent decline for PCDD/Fs in Madrid placed the concentrations of these undesired byproducts at comparable levels between DNP 2010 and Madrid 2011. This seems to point out increased efficiencies in the actions taken to minimize these POPs' emissions.

Emerging contaminants such as PBDEs and DP increased in both areas within the time range studied. The growing predominance of BDE-209 over time underlined the continuous and accumulative use of the deca-BDE mixture after the ban on the penta- and octa-BDE mixtures in Europe in 2004. The increase of DP was equal to or higher than that of PBDEs in DNP or Madrid, respectively. This appears to indicate an increasing use of this unregulated flame retardant for which still today there is a good deal of understanding lacking about its toxicity, behavior and fate. In general, neither  $\delta^{15}\text{N}$  nor  $\delta^{13}\text{C}$  were excellent predictors of the pollutant contents, most likely owing to a great spatial heterogeneity in contaminant sources existing in both study areas. However, the maintenance of each type of diet over time for white storks from both areas could be assumed based upon the isotopic values measured. This reinforces the role of white stork eggs as biomonitoring organisms for the contaminant burdens of

DNP and Madrid during the time range studied. Monitoring exercises are still of vital importance not only to check the efficiency of international agreements on the minimization and elimination of POPs, but also in the improvement of the current knowledge on the environmental occurrence of emerging pollutants.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Empresa de Gestión Medioambiental (EGMASA) and CSIC (Project Intramural de Frontera Ref. 200680F0162) for their financial support. The Monitoring team (ICTS, Reserva Biológica de Doñana, EBD-CSIC) is thanked for the field sampling.

#### REFERENCES

- Aguilar, A. (1984). "Relationship of DDE/ΣDDT in marine mammals to the chronology of DDT input into the ecosystem." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **41**(6): 840-844.
- Aguirre, J. I. (2006). "Factores que afectan la supervivencia juvenil de la Cigüeña Blanca (*Ciconia ciconia*)."Doctoral dissertation.
- Baos, R., R. Jovani, et al. (2012). "Developmental exposure to a toxic spill compromises long-term reproductive performance in a wild, long-lived bird: The white stork (*Ciconia ciconia*)."PLoS ONE **7**(4).
- Beard, J. (2006). "DDT and human health." Science of The Total Environment **355**(1): 78-89.
- Becker, P. H. (2003). Chapter 19 Biomonitoring with birds. Trace Metals and other Contaminants in the Environment. A. M. B. B.A. Markert and H. G. Zechmeister, Elsevier. **Volume 6**: 677-736.
- Becker, P. H., J. M. Cifuentes, et al. (2001). "Contaminants in Bird Eggs in the Wadden Sea: Spatial and Temporal Trends 1991-2000." Common Wadden Sea Secretariat, Trilateral Monitoring and Assessment Group.
- Blanco, G. (1996). "Population dynamics and communal roosting of white storks foraging at a Spanish refuse dump." Colonial waterbirds: 273-276.
- Borja, J., D. M. Taleon, et al. (2005). "Polychlorinated biphenyls and their biodegradation." Process Biochemistry **40**(6): 1999-2013.
- Brunström, B. and K. Halldin (2000). "Ecotoxicological risk assessment of environmental pollutants in the Arctic." Toxicology Letters **112-113**(0): 111-118.
- BSEF (2012). "Deca-BDE factsheet." Bromine Science and Environmental Forum. [http:// www.bsef.com](http://www.bsef.com)
- Buekens, A., E. Cornelis, et al. (2000). "Fingerprints of dioxin from thermal industrial processes." Chemosphere **40**(9): 1021-1024.
- Chen, D. and R. C. Hale (2010). "A global review of polybrominated diphenyl ether flame retardant contamination in birds." Environment International **36**(7): 800-811.
- Chen, D., Y. Wang, et al. (2013). "Dechlorane Plus flame retardant in terrestrial raptors from northern China." Environmental Pollution **176**: 80-86.
- Chen, D., X. Zhang, et al. (2009). "Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in various bird species from northern China." Environmental Pollution **157**(7): 2023-2029.
- Cifuentes, J. M., P. H. Becker, et al. (2003). "Seabird eggs as bioindicators of chemical contamination in Chile." Environmental Pollution **126**(1): 123-137.
- Crump, D., S. Chiu, et al. (2011). "The effects of Dechlorane Plus on toxicity and mRNA expression in chicken embryos: A comparison of *in vitro* and *in ovo* approaches." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **154**(2): 129-134.
- Elliott, J. E., R. J. Norstrom, et al. (1996). "Biological effects of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls in bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*) chicks." Environmental Toxicology and Chemistry **15**(5): 782-793.
- Elliott, J. E., L. K. Wilson, et al. (2001). "Assessment of biological effects of chlorinated hydrocarbons in osprey chicks." Environmental Toxicology and Chemistry **20**(4): 866-879.
- Fishbein, L. (1974). "Chromatographic and biological aspects of DDT and its metabolites." Journal of Chromatography A **98**(1): 177-251.
- Furness, R. W. (1993). "Birds as monitors of pollutants". Birds As Monitors of Environmental Change.
- Gómara, B. and M. J. González (2006). "Enantiomeric fractions and congener specific determination of polychlorinated biphenyls in eggs of predatory birds from Doñana National Park (Spain)." Chemosphere **63**(4): 662-669.
- Gómara, B., M. J. González, et al. (2008). "Unexpected high PCB and total DDT levels in the breeding population of red kite (*Milvus milvus*) from Doñana National Park, south-western Spain." Environment International **34**(1): 73-78.
- Grimalt, J. O., M. Ferrer, et al. (1999). "The mine tailing accident in Aznalcollar." Science of The Total Environment **242**(1-3): 3-11.
- Guerra, P., M. Alace, et al. (2012). "Emerging and historical brominated flame retardants in peregrine falcon (*Falco peregrinus*) eggs from Canada and Spain." Environment International **40**(1): 179-186.
- Guerra, P., K. Fernie, et al. (2011). "Dechlorane Plus and related compounds in peregrine falcon (*Falco peregrinus*) eggs from Canada and Spain."

- Environmental Science and Technology **45**(4): 1284-1290.
- Guitart, R., R. Clavero, et al. (2005). "Levels of persistent organochlorine residues in eggs of greater flamingos from the Guadalquivir marshes (Doñana), Spain." Journal of Environmental Science and Health Part B **40**(5): 753-760.
- Harrad, S. (2010). Persistent organic pollutants, Wiley Online Library.
- Henny, C. J., J. L. Kaiser, et al. (2009). "Polybrominated diphenyl ether flame retardants in eggs may reduce reproductive success of ospreys in Oregon and Washington, USA." Ecotoxicology **18**(7): 802-813.
- Hernandez, L. M., M. J. Gonzalez, et al. (1988). "Organochlorine and heavy metal residues in falconiforme and ciconiforme eggs (Spain)." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **40**(1): 86-93.
- Hernández, M., L. M. González, et al. (2008). "Influence of contamination by organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls on the breeding of the Spanish Imperial Eagle (*Aquila adalberti*)." Environmental Toxicology and Chemistry **27**(2): 433-441.
- Herzke, D., R. Kallenborn, et al. (2002). "Organochlorines in egg samples from Norwegian birds of prey: Congener-, isomer- and enantiomer specific considerations." Science of The Total Environment **291**(1-3): 59-71.
- Hites, R. A. (1990). "Environmental behavior of chlorinated dioxins and furans." Accounts of Chemical Research **23**(6): 194-201.
- Hoh, E., L. Zhu, et al. (2006). "Dechlorane Plus, a chlorinated flame retardant, in the Great Lakes." Environmental Science and Technology **40**(4): 1184-1189.
- Jaspers, V., A. Covaci, et al. (2005). "Brominated flame retardants and organochlorine pollutants in eggs of little owls (*Athene noctua*) from Belgium." Environmental Pollution **136**(1): 81-88.
- Jiménez, B., B. Gómara, et al. (2000). "An study of the toxic equivalents derived from PCDDs, PCDFs and Dioxin-like PCBs in two bird species (*Ciconia ciconia* and *Milvus migrans*) nesting in a protected area (Doñana National Park, SPAIN)." Organohalogen compounds **46**: 542-545.
- Jiménez, B., R. Merino, et al. (2007). "Evaluation of organochlorine compounds (PCDDs, PCDFs, PCBs and DDTs) in two raptor species inhabiting a Mediterranean island in Spain." Environmental Science and Pollution Research **14**(1): 61-68.
- Jiménez, B., R. Merino, et al. (2004). "Biomonitoring of organochlorine compounds (PCDDs, PCDFs, PCBs and DDTs) near a municipal solid waste incinerator using black kites (*Milvus migrans*) as sentinel organism." Organohalogen Compounds **66**: 1853-1856.
- Kannan, N. and G. Petrick (2009). "Ecological Risk Assessment Using High Resolution Analysis of Polychlorinated Biphenyls (PCBs)." Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry—Environmental Research in Asia pp:99-109
- Kelly, J. F. (2000). "Stable isotopes of carbon and in the study of avian and mammalian trophic ecology." Canadian Journal of Zoology **78**(1): 1-27.
- Kruszyk, R. and M. Ciach (2010). "White Storks, *Ciconia ciconia*, forage on rubbish dumps in Poland—a novel behaviour in population." European Journal of Wildlife Research **56**(1): 83-87.
- Kulkarni, P. S., J. G. Crespo, et al. (2008). "Dioxins sources and current remediation technologies—a review." Environment International **34**(1): 139-153.
- Li, Y., L. Yu, et al. (2013). "Accumulation and effects of 90-day oral exposure to dechlorane plus in quail (*Coturnix coturnix*)." Environmental Toxicology and Chemistry.
- Mandal, P. (2005). "Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology." Journal of Comparative Physiology B **175**(4): 221-230.
- McKernan, M. A., B. A. Rattner, et al. (2009). "Toxicity of polybrominated diphenyl ethers (de-71) in chicken (*Gallus gallus*), mallard (*Anas platyrhynchos*), and American kestrel (*Falco sparverius*) embryos and hatchlings." Environmental Toxicology and Chemistry **28**(5): 1007-1017.
- Merino, R., L. R. Bordajandi, et al. (2005). "Evaluation of organochlorine compounds in peregrine falcon (*Falco peregrinus*) and their main prey (*Columba livia*) inhabiting central Spain." Environmental Toxicology and Chemistry **24**(8): 2088-2093.
- Michener, R. H. and K. Lajtha (2007). Stable isotopes in ecology and environmental science, Blackwell Pub.
- Minh, T. B., T. Kunisue, et al. (2002). "Persistent organochlorine residues and their bioaccumulation profiles in resident and migratory birds from North Vietnam." Environmental Toxicology and Chemistry **21**(10): 2108-2118.
- Mo, L., J.-P. Wu, et al. (2013). "Dechlorane Plus flame retardant in kingfishers (*Alcedo atthis*) from an electronic waste recycling site and a reference site, South China: Influence of residue levels on the isomeric composition." Environmental Pollution **174**: 57-62.
- Muñoz-Arnanz, J. and B. Jiménez (2011a). "New DDT inputs after 30 years of prohibition in Spain. A case study in agricultural soils from southwestern Spain." Environmental Pollution **159**(12): 3640-3646.
- Muñoz-Arnanz, J., J. L. Roscales, et al. (2012). "Dechlorane plus in eggs of two gull species (*Larus michabellis* and *Larus audouinii*) from the southwestern Mediterranean Sea." Analytical Bioanalytical Chemistry **404**(9): 2765-2773.
- Muñoz-Arnanz, J., M. Sáez, et al. (2011a). "Predominance of BDE-209 and other higher brominated diphenyl ethers in eggs of white stork (*Ciconia*

- ciconia*) colonies from Spain." Environment International **37**(3): 572-576.
- Muñoz-Arnanz, J., M. Sáez, et al. (2011b). "Dechlorane plus and possible degradation products in white stork eggs from Spain." Environment International **37**(7): 1164-1168.
- Negro, J. J., J. L. Tella, et al. (2000). "Diet explains interpopulation variation of plasma carotenoids and skin pigmentation in nestling white storks." Physiological and Biochemical Zoology **73**(1): 97-101.
- Pakalin, S., T. Cole, et al. (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." European Commission, Directorate General Joint Research Center, European Chemicals Bureau.
- Quinn, L. P., C. Roos, et al. (2013). "Levels of PCBs in wild bird eggs: Considering toxicity through enzyme induction potential and molecular structure." Chemosphere **90**(3): 1109-1116.
- Ryan, J. and J. Pilon (1982). "Chlorinated dibenzodioxins and dibenzofurans in chicken litter and livers arising from pentachlorophenol contamination of wood shavings." Chlorinated Dioxins and Related Compounds (Edited by O. Hutzinger): 183-189.
- Safe, S. H. (1994). "Polychlorinated biphenyls (PCBs): Environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment." Critical Reviews in Toxicology **24**(2): 87-149.
- Schechter, A., L. Birnbaum, et al. (2006). "Dioxins: An overview." Environmental Research **101**(3): 419-428.
- Shaw, S. (2010). "Halogenated flame retardants: do the fire safety benefits justify the risks?" Reviews on environmental health **25**(4): 261-306.
- Sidra, M. S. and C. H. Walker (1980). "The metabolism of p,p'-DDT by the feral pigeon (*Columba livia*)." Pesticide Biochemistry and Physiology **14**(1): 62-71.
- Stapleton, H. M., B. Brazil, et al. (2006). "In vivo and in vitro debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209) by juvenile rainbow trout and common carp." Environmental Science and Technology **40**(15): 4653-4658.
- Stockholm Convention (2013). "Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants." <http://chm.pops.int>
- Sverko, E., G. T. Tomy, et al. (2011). "Dechlorane plus and related compounds in the environment: a review." Environmental Science and Technology **45**(12): 5088-5098.
- Tanabe, S., M. Watanabe, et al. (2003). "PCDDs, PCDFs, and Coplanar PCBs in Albatross from the North Pacific and Southern Oceans: Levels, Patterns, and Toxicological Implications." Environmental Science and Technology **38**(2): 403-413.
- UNEP (2001). "Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants." United Nations Environment Programme Chemicals (UNEP).
- USEPA (2009). "High Production Volume (HPV) Challenge." U.S. Environmental Protection Agency (USEPA)
- Van den Berg, M., L. Birnbaum, et al. (1998). "Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife." Environmental Health Perspectives **106**(12): 775.
- Van den Berg, M., F. Blank, et al. (1987). "Presence of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans in fish-eating birds and fish from The Netherlands." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **16**(2): 149-158.
- Van den Steen, E., A. Covaci, et al. (2007). "Accumulation, tissue-specific distribution and debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209) in European starlings (*Sturnus vulgaris*)." Environmental Pollution **148**(2): 648-653.
- Van den Steen, E., V. L. B. Jaspers, et al. (2008). "Variation, levels and profiles of organochlorines and brominated flame retardants in great tit (*Parus major*) eggs from different types of sampling locations in Flanders (Belgium)." Environment International **34**(2): 155-161.
- Verreault, J., G. W. Gabrielsen, et al. (2010). The Svalbard glaucous gull as bioindicator species in the European arctic: Insight from 35 years of contaminants research. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology **205**: 77-116.
- Wang, D.-G., M. Yang, et al. (2010). "An Asia-specific source of Dechlorane Plus: Concentration, isomer profiles, and other related compounds." Environmental Science and Technology **44**(17): 6608-6613.
- White, D. H., W. J. Fleming, et al. (1988). "Pesticide contamination and hatching success of waterbirds in Mississippi." The Journal of Wildlife Management: 724-729.
- Xian, Q., S. Siddique, et al. (2011). "Sources and environmental behavior of dechlorane plus — A review." Environment International **37**(7): 1273-1284.



## Supplementary Information

### Dissimilar Outcomes for Emerging and Legacy Contaminants in White Stork Eggs from Spain (1999-2011)

**Juan Muñoz-Arnanz<sup>1</sup>, Mónica Sáez<sup>1</sup>, Alba Vicente<sup>1</sup>, Jose Luis Roscales<sup>1</sup>, Jose I. Aguirre<sup>2</sup>, Fernando Hiraldo<sup>3</sup>, Raquel Baos<sup>3</sup>, Grazina Pacepavicius<sup>4</sup>, Mehran Alaei<sup>4</sup>, Laura Morales<sup>5</sup>, Esteban Abad<sup>5</sup>, Begoña Jiménez<sup>1</sup>**

1. Department of Instrumental Analysis and Environmental Chemistry, Institute of Organic Chemistry, CSIC. Juan de la Cierva 3, 28006, Madrid, Spain
2. Department of Zoology and Physical Anthropology, Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, 28040, Madrid, Spain
3. Department of Applied Biology, Doñana Biological Station, CSIC. Avda. Américo Vespucio s/n, 41092 Sevilla, Spain
4. Aquatic Ecosystem Protection Research Division, Environment Canada, 867 Lakeshore Road, P.O. 10 Box 5050, Burlington, Ontario, Canada, L7R 4A6
5. Department of Environmental Chemistry, Institute of Environmental Assessment and Water Research, CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034, Barcelona, Spain

## Contents

1. Experimental section .....	163
1.1. Sampling and study areas.....	163
1.2. Reagents and standards.....	165
1.3. Analytical procedure.....	166
1.3.1. Lipid determination .....	168
1.3.2. Stable isotope analysis.....	168
1.3.3. Instrumental determination of PCBs and DDTs in eggs from 1999/2001(DNP) and 2005 (Madrid).....	169
1.3.4. Instrumental determination of PCBs in eggs from 2010 (DNP) and 2011 (Madrid) ....	169
1.3.5. Instrumental determination of DDTs in eggs from 2010 (DNP) and 2011 (Madrid) ....	170
1.3.6. Instrumental determination of PCDD/Fs and non- <i>ortho</i> PCBs .....	170
1.3.7. Instrumental determination of PBDEs and DPs .....	171
1.3.8. QA/QC.....	172
2. Results .....	175
2.1. Lipid content .....	175
2.2. PCBs .....	175
2.3. DDTs.....	178
2.4. PCDD/Fs .....	179
2.5. PBDEs.....	181
2.6. DP .....	183
2.7. Stable isotopes.....	184
References .....	189

1. EXPERIMENTAL SECTION

1.1. Sampling and study areas

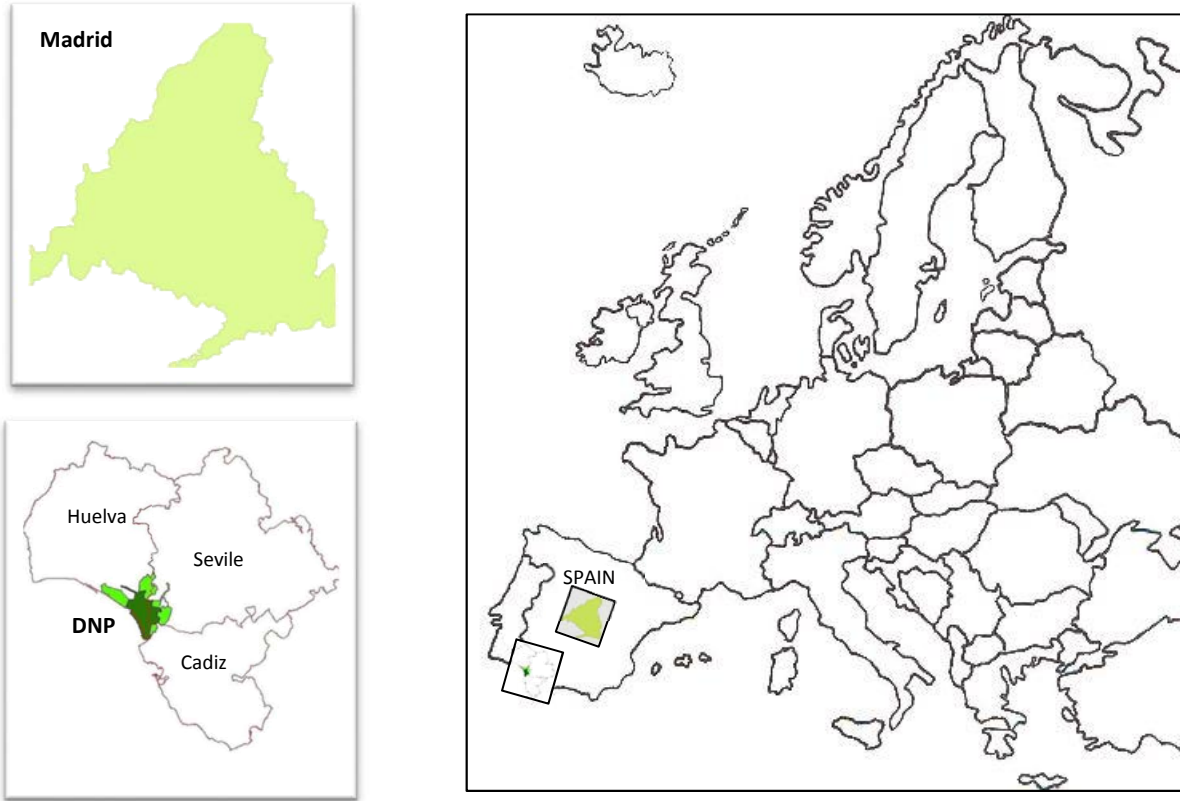


Figure S1. Geographic distribution of the white stork eggs sampled. DNP stands for Doñana National Park.

Table S1. Number of white stork eggs collected from each location and year.

Area	DNP		Madrid	
Year	1999 and 2001 (late May and early June)	2010 (late May and early June)	2005 (late May and early June)	2011 (late May and early June)
Eggs	23	10	10	14
	Egg and Year	Coordinates	Egg and Year	Coordinates
	E1—1999	37° 12' 24"- 37° 12' 41"N 6° 10' 16"- 6° 11' 32"W	E1—2005	40°28'54"N 3°22'20"W
	E2—1999	37° 12' 24"- 37° 12' 41"N 6° 10' 16"- 6° 11' 32"W	E2—2005	40°28'54"N 3°22'20"W
	E3—1999	37° 12' 24"- 37° 12' 41"N 6° 10' 16"- 6° 11' 32"W	E3—2005	40°28'54"N 3°22'20"W
	E4—1999	37° 12' 24"- 37° 12' 41"N 6° 10' 16"- 6° 11' 32"W	E4—2005	40°28'54"N 3°22'20"W

E5—1999	37° 07' 00"- 37° 07' 30"N 6° 27' 30"- 6° 27' 55"W	E5—2005	40°18'48"N 3°37'15"W
E6—1999	37° 07' 00"- 37° 07' 30"N 6° 27' 30"- 6° 27' 55"W	E6—2005	40°44'31"N 3°49'09"W
E7—1999	37° 07' 00"- 37° 07' 30"N 6° 27' 30"- 6° 27' 55"W	E7—2005	40°44'31"N 3°49'09"W
E8—2001	37° 12' 24"- 37° 12' 41"N 6° 10' 16"- 6° 11' 32"W	E8—2005	40°44'31"N 3°49'09"W
E9—2001	37° 12' 24"- 37° 12' 41"N 6° 10' 16"- 6° 11' 32"W	E9—2005	40°44'31"N 3°49'09"W
E10—2001	37° 12' 24"- 37° 12' 41"N 6° 10' 16"- 6° 11' 32"W	E10—2005	40°55'44"N 3°49'08"W
E11—2001	37° 12' 24"- 37° 12' 41"N 6° 10' 16"- 6° 11' 32"W	E1—2011	40°44'31"N 3°49'09"W
E12—2001	37° 12' 24"- 37° 12' 41"N 6° 10' 16"- 6° 11' 32"W	E2—2011	40°44'31"N 3°49'09"W
E13—2001	37° 12' 24"- 37° 12' 41"N 6° 10' 16"- 6° 11' 32"W	E3—2011	40°44'31"N 3°49'09"W
E14—2001	37° 12' 24"- 37° 12' 41"N 6° 10' 16"- 6° 11' 32"W	E4—2011	40°44'31"N 3°49'09"W
E15—2001	37° 07' 00"- 37° 07' 30"N 6° 27' 30"- 6° 27' 55"W	E5—2011	40°44'31"N 3°49'09"W
E16—2001	37° 07' 00"- 37° 07' 30"N 6° 27' 30"- 6° 27' 55"W	E6—2011	40°44'31"N 3°49'09"W
E17—2001	37° 07' 00"- 37° 07' 30"N 6° 27' 30"- 6° 27' 55"W	E7—2011	40°44'31"N 3°49'09"W
E18—2001	37° 07' 00"- 37° 07' 30"N 6° 27' 30"- 6° 27' 55"W	E8—2011	40°44'31"N 3°49'09"W
E19—2001	37° 07' 00"- 37° 07' 30"N 6° 27' 30"- 6° 27' 55"W	E9—2011	40°44'31"N 3°49'09"W
E20—2001	37° 12' 24"- 37° 12' 41"N 6° 10' 16"- 6° 11' 32"W	E10—2011	40°44'31"N 3°49'09"W
E21—2001	37° 12' 24"- 37° 12' 41"N 6° 10' 16"- 6° 11' 32"W	E11—2011	40°44'31"N 3°49'09"W
E22—2001	37° 12' 24"- 37° 12' 41"N 6° 10' 16"- 6° 11' 32"W	E12—2011	40°44'31"N 3°49'09"W
E23—2001	37° 12' 24"- 37° 12' 41"N 6° 10' 16"- 6° 11' 32"W	E13—2011	40°44'31"N 3°49'09"W
E1—2010	37° 12' 38.2 N 6° 11' 31.7 W	E14—2011	40°44'31"N 3°49'09"W
E2—2010	37° 12' 38.2 N 6° 11' 31.7 W		
E3—2010	37° 12' 38.2 N 6° 11' 31.7 W		
E4—2010	37° 12' 35.4 N, 6° 11' 08.1 W		
E5—2010	37° 12' 36.9 N 6° 11' 30.0 W		
E6—2010	37° 12' 31.6 N 6° 10' 21.4 W		
E7—2010	37° 12' 24.6 N 6° 11' 22.5 W		
E8—2010	37° 12' 41.3 N 6° 10' 35.8 W		
E9—2010	37° 07' 19.8 N 6° 27' 03.4 W		
E10—2010	37° 07' 22.8 N 6° 26' 49.2 W		

## 1.2. Reagents and standards

Comprehensive information about the analytical standards used in this study is displayed in the following table:

**Table S2.** Labeled and native chemical standards used in this study.

Group	Congeners	Acquired from
native PCBs	PCB-28, -52, -95, -101, -105, -114, -118, -123, -132, -138, -149, -153, -156, -157, -167, -170, -180, -183, -189, -194, -209	Dr.Ehrenstorfer (Augsburg, Germany)
labeled PCBs	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB-28, -52, -101, -138, -153, -180, -209 (PCB mix <b>EC-4058</b> )	Cambridge Isotope Lab. Inc. (Andover, USA)
	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB-77, -81, -126, -169	Dr.Ehrenstorfer (Augsburg, Germany)
	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB-77, -81, -105, -114, -118, -123, -126, -156, -157, -167, -169, -189 (PCB mix <b>WP-CVS</b> ); <sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB-70, -111, -138, -170 (PCB mix <b>WP-ISS</b> )	Wellington Laboratories (Guelph, Ontario, Canada)
native DDTs	<i>p,p'</i> -DDT, <i>o,p'</i> -DDT, <i>p,p'</i> -DDE, <i>o,p'</i> -DDE, <i>p,p'</i> -DDD, <i>o,p'</i> -DDD ( <b>Pesticide-Mix 164</b> )	Dr.Ehrenstorfer (Augsburg, Germany)
labeled DDTs	D <sub>8</sub> - <i>p,p'</i> -DDE, D <sub>8</sub> - <i>o,p'</i> -DDT, D <sub>8</sub> - <i>p,p'</i> -DDT	Dr.Ehrenstorfer (Augsburg, Germany)
native PBDEs	BDE-17,-28, -47, -66, -85, -99, -100, -153, -154, -183, -184, -191	Wellington Laboratories (Guelph, Ontario, Canada)
	BDE-194,-195,-196,-197,-198, -199, -200, -201, -202, -203, -204, -205, -206, -207, -208, -209 (BDE mix <b>BDE-OND</b> )	Wellington Laboratories (Guelph, Ontario, Canada)
labeled PBDEs	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -BDE-138,-139	Wellington Laboratories (Guelph, Ontario, Canada)
native DP <sub>s</sub>	<i>syn</i> -DP, <i>anti</i> -DP, <i>anti</i> -[DP-1Cl], <i>anti</i> -[DP-2Cl]	Wellington Laboratories (Guelph, Ontario, Canada)
labeled DP <sub>s</sub>	<sup>13</sup> C <sub>10</sub> - <i>syn</i> -DP, <i>anti</i> -DP	Cambridge Isotope Lab. Inc. (Andover, USA)
native PCDD/Fs	2,3,7,8-TCDD; 1,2,3,7,8-PeCDD; 1,2,3,4,7,8-/ 1,2,3,6,7,8-/ 1,2,3,7,8,9-HxCDD; 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD; OCDD; 2,3,7,8-TCDF; 1,2,3,7,8-/2,3,4,7,8-PCDF; 1,2,3,4,7,8-/ 1,2,3,6,7,8-/ 1,2,3,7,8,9-/ 2,3,4,6,7,8-HxCDF; 1,2,3,4,6,7,8-/ 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF; OCDF ( <b>EPA-1613 CVS</b> )	Wellington Laboratories (Guelph, Ontario, Canada)
labeled PCDD/Fs	2,3,7,8-TC[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]DD; 1,2,3,7,8-PeC[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]DD; 1,2,3,4,7,8-/ 1,2,3,6,7,8-HxC[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]DD; 1,2,3,4,6,7,8-HpC[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]DD; OC[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]DD; 2,3,7,8-TC[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]DF; 1,2,3,7,8-/ 2,3,4,7,8-PC[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]DF; 1,2,3,4,7,8-/ 1,2,3,6,7,8-/ 1,2,3,7,8,9-/2,3,4,6,7,8-HxC[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]DF; 1,2,3,4,6,7,8-/ 1,2,3,4,7,8,9-HpC[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]DF ( <b>EPA-1613LCS</b> ) 1,2,3,4-TC[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]DD; 1,2,3,7,8,9-HxC[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]DD ( <b>EPA-1613ISS</b> )	Wellington Laboratories (Guelph, Ontario, Canada)
others	1,2,3,4-tetrachloronafaleno (TCN)	Dr.Ehrenstorfer (Augsburg, Germany)

All solvents were pesticide residue grade including acetone, methanol, chloroform, isooctane and toluene purchased from SDS (Peypin, France), and n-hexane and nonane purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Silica gel (70-230 mesh) and sulfuric acid (analytical reagent grade, 95-97%) were also supplied by Merck, and anhydrous sodium sulfate by J.T. Baker (Deventer, Netherlands).

### 1.3. Analytical procedure

A matrix solid phase dispersion (MSPD)-based procedure was followed to carry out the extraction of organic pollutants. With that purpose, 5 g of silica gel (previously activated at 150 °C during 48 h) were homogeneously mixed with 20 g of anhydrous sodium sulfate and 2 g of previously lyophilized egg content. This mixture was placed into a glass open tubular column, spiked with labeled surrogates (table S3) and extracted with 500 mL of acetone:hexane (1:1, v:v). The resulting extract was rotaveporated to a few milliliters. Then, a clean-up step was carried out by transferring the extract into an glass open tubular column with subsequent layers (from top to bottom) of 13 g of silica gel modified with sulfuric acid at 22% w:w, 30 g of silica modified with sulfuric acid at 44% w:w, 9 g of neutral silica gel, 9 g of silica modified with potassium hydroxide at 36 % w:w, and 9 g of neutral silica. 100 mL of hexane were used as eluting solvent for the clean-up process. The resulting extract was rotaveporated to ~ 1 mL. Afterwards, a fractionation among the different families of organic pollutants was achieved by using Supelclean™ Supelco ENVI™-Carb tubes (Bellefonte, PA, USA). Initially, the extract was placed into a cartridge and by subsequently using (i) 15 mL of hexane and (ii) 20 mL of hexane:toluene (99:1, v:v), a first fraction was collected containing the bulk of *ortho* PCBs, PBDEs, DDTs and DPs. Then, a second fraction containing non-*ortho* PCBs was collected by using 20 mL of a mixture of hexane:toluene (75:25, v:v) as eluting solvent. A final third fraction was obtained containing the quantitative content of PCDD/Fs by turning over the cartridge and using 60 mL of toluene in “reverse flux.” The extract from each fraction was rotavaporated to ~ 1 mL, further evaporated to near dryness under a nitrogen stream and a finally redissolved in a few microliters with a solution of internal injection standard/s (table S4) prior to its instrumental analysis.

**Table S3.** Quantity of each surrogate spiked in the different egg samples (classified by year) of this study.

Surrogate	Quantity (pg)	Samples spiked (year)
<b>PBDEs</b>		
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -BDE-138	3,750	2010/2011
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -BDE-209	5,000	2010/2011

<b>DDTs</b>		
D <sub>8-<i>p,p'</i></sub> -DDE	5,000	2010/2011
D <sub>8-<i>o,p'</i></sub> -DDT	5,000	2010/2011
D <sub>8-<i>p,p'</i></sub> -DDT	5,000	2010/2011
<b><i>ortho</i> PCBs</b>		
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB-28	10,000	2010/2011
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB-52	10,000	2010/2011
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB-101	10,000	2010/2011
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB-138	10,000	2010/2011
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB-153	10,000	2010/2011
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB-180	10,000	2010/2011
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB-209	10,000	2010/2011
<b><i>non-ortho</i> PCBs</b>		
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB-77	1,000	2000/2005/2010/2011
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB-126	1,000	2000/2005/2010/2011
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB-169	1,000	2000/2005/2010/2011
<b>DPs</b>		
<sup>13</sup> C <sub>10-<i>syn</i></sub> -DP	2,000	2010/2011
<sup>13</sup> C <sub>10-<i>anti</i></sub> -DP	2,000	2010/2011
<b>PCDDs</b>		
2,3,7,8-TC[ <sup>13</sup> C <sub>10</sub> ]DD	1,000	2000/2005/2010/2011
1,2,3,7,8-PeC[ <sup>13</sup> C <sub>10</sub> ]DD	1,000	2000/2005/2010/2011
1,2,3,4,7,8-HxC[ <sup>13</sup> C <sub>10</sub> ]DD	1,000	2000/2005/2010/2011
1,2,3,6,7,8-HxC[ <sup>13</sup> C <sub>10</sub> ]DD	1,000	2000/2005/2010/2011
1,2,3,4,6,7,8-HpC[ <sup>13</sup> C <sub>10</sub> ]DD	1,000	2000/2005/2010/2011
OC[ <sup>13</sup> C <sub>10</sub> ]DD	2,000	2000/2005/2010/2011
<b>PCDFs</b>		
2,3,7,8-TC[ <sup>13</sup> C <sub>10</sub> ]DF	1,000	2000/2005/2010/2011
1,2,3,7,8-PeC[ <sup>13</sup> C <sub>10</sub> ]DD	1,000	2000/2005/2010/2011
2,3,4,7,8-PC[ <sup>13</sup> C <sub>10</sub> ]DF	1,000	2000/2005/2010/2011
1,2,3,4,7,8-HxC[ <sup>13</sup> C <sub>10</sub> ]DF	1,000	2000/2005/2010/2011
1,2,3,6,7,8-HxC[ <sup>13</sup> C <sub>10</sub> ]DF	1,000	2000/2005/2010/2011
1,2,3,7,8,9-HxC[ <sup>13</sup> C <sub>10</sub> ]DF	1,000	2000/2005/2010/2011
2,3,4,6,7,8-HxC[ <sup>13</sup> C <sub>10</sub> ]DF	1,000	2000/2005/2010/2011
1,2,3,4,6,7,8-HpC[ <sup>13</sup> C <sub>10</sub> ]DF	1,000	2000/2005/2010/2011
1,2,3,4,7,8,9-HpC[ <sup>13</sup> C <sub>10</sub> ]DF	1,000	2000/2005/2010/2011

**Table S4.** Description of the injection internal standard solutions used to redissolve each fraction from each set of samples prior to their instrumental analysis.

Fraction	Volume and concentration [pg/ $\mu$ L] of the internal standard/s used	Samples (year)
Fraction 1	50 $\mu$ L TCN [25 pg/ $\mu$ L] and PCB 209 [38 pg/ $\mu$ L]	2000/2005
	25 $\mu$ L of TCN [25 pg/ $\mu$ L] and $^{13}\text{C}_{12}$ -BDE-139 [50 pg/ $\mu$ L]	2010/2011
Fraction 2	10 $\mu$ L of WP-ISS [50 pg/ $\mu$ L]	2000/2005/2010/2011
Fraction 3	10 $\mu$ L of EPA-1613ISS [100 pg/ $\mu$ L]	2000/2005/2010/2011

### 1.3.1. Lipid determination

The lipid content was determined gravimetrically and based on the extraction of 0.5 g of each sample with 100 mL of acetone:hexane (1:1). The extract was first rotaevaporated to nearly dryness and secondly dried for 1 hour at 110°C.

### 1.3.2. Stable isotope analysis

A subsample (1-2 g) of each lyophilized egg was placed in a glass centrifuge tube. Lipid extraction of the dried powdered samples was conducted following the procedure described elsewhere (Logan et al. 2008). Briefly, a mixture ( $\sim$  10 mL) of chloroform: methanol (2:1) was added to the tube and vortexed for 30 s and centrifuged for 10 min at 400 r.p.m. The supernatant phase containing lipids was discarded. The procedure was repeated until the supernatant was completely clear and colorless. Then, samples were dried at 60° for 24h. Sample analysis was carried out following the procedure described in (Roscales et al. 2010). In short, from 0.36 to 0.4 of lipid-free egg samples were weighted to the nearest  $\mu$ g in tin buckets and crimped for combustion. Stable isotope ratios were determined by elemental analysis–isotope ratio mass spectrometry (EA–IRMS) using a ThermoFinnigan Flash 1112 elemental analyzer coupled to a Delta isotope ratio mass spectrometer via a CONFLOIII interface. Isotope ratios are conventionally expressed as parts per thousand (‰) according to the equation  $\delta X = [(R_{\text{sample}} / R_{\text{standard}}) - 1]$ , where X is  $^{15}\text{N}$  or  $^{13}\text{C}$  and R is the corresponding ratio  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  or  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ . Vienna Pee Dee Velemnite (VPDB) and atmospheric nitrogen (AIR) were used as standards for  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$ , respectively.



### 1.3.3. Instrumental determination of PCBs and DDTs in eggs from 1999/2001 (DNP) and 2005 (Madrid)

Twenty tri- to octa- (*ortho* and mono-*ortho*) substituted PCBs (PCB-28, -52, -95, -101, -105, -114, -118, -123, -132, -138, -149, -153, -156, -157, -167, -170, -180, -183, -189, -194) and DDTs (*p,p'*-DDT, *p,p'*-DDE and *p,p'*-DDD) were analyzed by gas chromatography with micro-electron capture detection (GC- $\mu$ ECD) using a 6890N gas chromatograph with a  $^{63}\text{Ni}$   $\mu$ -electron capture detector (Agilent, Palo Alto, CA, USA). The GC injection port was configured for 1 $\mu$ L hot splitless injections at a temperature of 270°C (1.0 min splitless time). Gas chromatographic separation was achieved by using a BPX5 fused silica capillary column (60m x 0.25 mm i.d. x 0.25  $\mu$ m film thickness) purchased from SGE (Melbourne, Australia). The GC column was maintained at 80°C for 2 min, ramped at 30°C/min to 185°C (3 min), ramped at 1.5°C/min to 230°C (10 min), and ramped at 5°C/min to 270°C (10 min). Nitrogen was used as carrier gas at a constant flow rate of 1.5 mL/min and as make-up gas (30 mL/min). The detector temperature was set at 300°C.

The identification of target compounds was based on the detection at their relative retention times in relation to those of the injection internal standards TCN and PCB 209. Quantification was achieved by means of a linear seven-point calibration curve for each target ranging from 1 to 500 pg/ $\mu$ L.

### 1.3.4. Instrumental determination of PCBs in eggs from 2010 (DNP) and 2011 (Madrid)

Twenty tri- to octa- (*ortho* and mono-*ortho*) substituted PCBs (PCB-28, -52, -95, -101, -105, -114, -118, -123, -132, -138, -149, -153, -156, -157, -167, -170, -180, -183, -189, -194) were analyzed by gas chromatography low resolution mass spectrometry (GC-LRMS) using a 7890N gas chromatograph coupled with a 5975C quadrupole mass spectrometer (Agilent, Palo Alto, CA, USA), operated in selected ion monitoring (SIM) mode with electron impact (EI) ionization at an electron voltage of 70 eV. The GC injection port was configured for 1 $\mu$ L hot splitless injections at 250°C (1.0 min splitless time). Gas chromatographic separation prior to MS was achieved by using a BPX5 fused silica capillary column (60m x 0.25 mm i.d. x 0.25  $\mu$ m film thickness) purchased from SGE (Melbourne, Australia). The GC column was maintained at 120°C for 2 min, ramped at 35°C/min to 250°C (30 min) and ramped at 15°C/min to 310°C (30 min). Helium was used as the carrier gas at a constant flow rate of 0.8 mL/min. The temperatures of the transfer line, source and quadrupole were set at 280°C, 230°C and 150°C, respectively.

The identification of target compounds was based on detection, at the corresponding retention time of the following  $m/z$  ions: 256/258 (PCB-28), 268/270 ( $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB-28), 290/292 (PCB-52), 302/304 ( $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB-52), 326/328 (PCB-101, -105, -114, -118, -123), 338/340 ( $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB-101),

360/362 (PCB-138, -153, -156, -157, -167), 372/374 ( $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB-138, -153), 394/396 (PCB-170, -189), 406/408 ( $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB-180), 428/430 (PCB-194) and 510/512 ( $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB-209). Quantification was based on a linear eight-point calibration curve for each target analyte ranging from 1 to 600 pg/ $\mu\text{L}$ . The isotope dilution technique was used for the quantification of PCB-28 against  $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB-28; PCB-52 against  $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB-52; PCB-95,-101 against  $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB-101; PCB-105, -114, -118, -123, -132, -149, -153 against  $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB-153; PCB-138, -167, -183 against  $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB-138; PCB-156, -157, -169, -170, -180 against  $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB-180; PCB-189, -194 against  $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB-209.

### 1.3.5. Instrumental determination of DDTs in eggs from 2010 (DNP) and 2011 (Madrid)

*p,p'*-DDT, DDE and DDD were analyzed by GC-LRMS using a 7890N gas chromatograph with on column injection and coupled with a 5975C quadrupole mass spectrometer (Agilent, Palo Alto, CA, USA), operated in SIM mode with EI ionization at an electron voltage of 70 eV. The GC injection port was configured for 1 $\mu\text{L}$  on column injections. Gas chromatographic separation was achieved using a DB-5MS low bleed column (60 m x 0.25 mm i.d. x 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness) purchased from J&W Scientific (Folsom, CA, USA). The column temperature was maintained at 120°C for 2 min, ramped at 35°C/min to 250°C (30min), and ramped at 15°C/min to 310°C (30 min). The on column injector matched the column temperature at all times. Helium was used as the carrier gas at a constant flow rate of 0.8 mL/min. The temperatures of the transfer line, source and quadrupole were set at 280°C, 230°C and 150°C, respectively.

The identification of target compounds was based on detection, at the corresponding retention time of the following *m/z* ions: 248/318 (*p,p'*-DDE), 254/326 ( $\text{D}_8$ -*p,p'*-DDE), 235/237 (*p,p'*-DDD and *p,p'*-DDT), 243/245 ( $\text{D}_8$ -*o,p'*-DDT and  $\text{D}_8$ -*p,p'*-DDT). Quantification was based on a linear eight-point calibration curve for each target analyte ranging from 1 to 1,000 pg/ $\mu\text{L}$ . The isotope dilution technique was used for the quantification of *p,p'*-DDE against  $\text{D}_8$ -*p,p'*-DDE; *p,p'*-DDD against  $\text{D}_8$ -*o,p'*-DDT; and *p,p'*-DDT against  $\text{D}_8$ -*p,p'*-DDT.

### 1.3.6. Instrumental determination of PCDD/Fs and non-ortho PCBs

2,3,7,8-substitued PCDDs and PCDFs, and non-ortho PCBs (PCB-77, -81, -126,-169) were analyzed by gas chromatography coupled with high resolution mass spectrometry (GC-HRMS) on a GC 8000 series gas chromatograph (Carlo Erba Instruments, Milan, Italy) equipped with a CTC A 200S auto sampler (Water Instruments, Manchester, UK) and coupled to an Autospec Ultima mass spectrometer (Water Instruments, Manchester, UK), using a positive EI source and operating in the SIM mode at 10,000 resolving power (10% valley definition). Further operational details can be found at (Ábalos et al. 2008; Merino et al. 2005). Quantification of PCDD/Fs and non-ortho PCBs was carried

out by the isotopic dilution technique following procedures from the US Environmental Protection Agency (USEPA 1994).

### 1.3.7. Instrumental determination of PBDEs and DPs

Twelve tri- to hepta- substituted PBDE congeners (BDE-17, -28, -47, -66, -85, -99, -100, -153, -154, -183, -184 and -191), and four DPs (*syn*-DP, *anti*-DP, *anti*-[DP-1Cl] and *anti*-[DP-2Cl]) were analyzed by GC-LRMS using a 6890N gas chromatograph coupled with a 5975 quadrupole mass spectrometer (Agilent, Palo Alto, CA, USA) operated in SIM mode with electron capture negative ionization (ECNI). The GC injection port was configured for 1 $\mu$ L pulsed hot splitless injections (4.0 min pulse and splitless time) at a temperature of 260°C. Gas chromatographic separation prior to MS was achieved using a DB-5MS low bleed column (15 m x 0.20 mm i.d. x 0.20  $\mu$ m film thickness) purchased from J&W Scientific (Folsom, CA, USA). The GC column was maintained at 120°C for 4.2 min, ramped at 30°C/min to 200°C, ramped at 5°C/min to 275°C, ramped at 40°C/min to 300°C (10 min) and finally ramped at 10°C/min to 310°C (2 min). Helium was used as the carrier gas at a constant flow rate of 1.5 mL/min. Methane was used as reaction gas. The temperatures of the transfer line, source and quadrupole were set at 300°C, 150°C and 150°C, respectively. The identification of PBDEs was based on detection at the corresponding retention time of  $m/z$  79 and 81 (corresponding to bromine atoms) plus the following ions for each congener: 159/161 (BDE-17, -28, -47, -66, -85), 403/405 (BDE-99, -100), 483/485 (BDE-153, -154), 493/497 (<sup>13</sup>C<sub>12</sub>-BDE-138, -139), 562/564 (BDE-183, -191). The identification of DP and related compounds was based on detection at the corresponding retention time of  $m/z$ : 652/654 (*syn*- and *anti*-DP), 662/664 (<sup>13</sup>C<sub>10</sub>-*syn*-DP and <sup>13</sup>C<sub>10</sub>-*anti*-DP), 618/620 (*anti*-[DP-1Cl]), 584/586 (*anti*-[DP-2Cl]), 344/346 (1,5-DPMA). Quantification was based on a linear seven-point calibration curve for each target analyte ranging from 1 to 300 pg/ $\mu$ L (1 to 600 pg/ $\mu$ L for BDE-209). <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-BDE-139 was used as injection internal standard for all PBDE congeners (native and labeled), 1,5-DPMA, <sup>13</sup>C<sub>10</sub>-*syn*-DP and <sup>13</sup>C<sub>10</sub>-*anti*-DP, while the isotope dilution technique was used for the quantification of *anti*-[DP-2Cl] and *syn*-DP against <sup>13</sup>C<sub>10</sub>-*syn*-DP, and *anti*-[DP-1Cl] and *anti*-DP against <sup>13</sup>C<sub>10</sub>-*anti*-DP.

Sixteen higher brominated BDE congeners, from octa- to deca- substituted (BDE-194, -195, -196, -197 + 204, -198 + 199 + 200 + 203, -201, -202, -205, -206, -207, -208 and -209), were analyzed by GC-HRMS using a 6890 GC (Agilent, Palo Alto, CA, USA) equipped with a CTC A200s autosampler (Water Instruments, Manchester, UK) and coupled to an Autospec Ultima mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK). The GC injection port was configured for 1 $\mu$ L hot splitless injections at 280°C (1.0 min splitless time). Gas chromatographic separation prior to MS was achieved using a DB5-HT column (15 m x 0.25 mm i.d. x 0.10  $\mu$ m film thickness) purchased from J&W Scientific (Folsom,

CA, USA). The GC column was maintained at 100°C for 2 min, ramped at 25°C/min to 250°C, ramped at 1.5°C/min to 270°C, and ramped at 25°C/min to 325°C (5 min). Helium was used as the carrier gas in constant pressure mode. Sample ionization was performed by EI at an electron voltage ranging from 30 to 40 eV depending on the optimization parameters of the instrument. Source and transfer line temperatures were both set at 280°C and the resolving power of the analyzer was 10,000 (10% valley definition).

### 1.3.8. QA/QC

In order to avoid or minimize any possible contamination from the lab's atmosphere, a thorough cleaning protocol was followed throughout the whole analytical procedure, in which all glassware was cleaned three consecutive times with three solvents of decreasing polar nature: acetone, dichloromethane and hexane.

Quality assurance criteria were based on the application of quality control and quality assurance measures, which included the analysis of a blank within each batch of three or four samples covering the complete analytical procedure. Care was taken to minimize exposure to UV light throughout the whole analytical procedure.

Quantification of all target analytes was carried out according to the following criteria: (a) ratio between the two monitored ions within  $\pm 15\%$  of the theoretical value, and (b) limits of quantification (LOQs) corresponding to a  $S/N$  of 10. When quantifiable levels of a given analyte were found in a procedural blank, these were subtracted from the corresponding batch of samples associated to that blank.

Calibration curves were checked daily. Debromination of BDE-209 in the chromatographic system into the three nona-BDE congeners (BDE-206, -207 and -208) was observed in ratios always under 10%. Dechlorination of *anti*-DP into *anti*-[DP-1Cl] was always observed in ratios under 0.5%. DDT breakdown in the chromatographic systems was maintained below 15% in compliance with the US Environmental Protection Agency (EPA) Method 8081 (USEPA, 1996). DDT degradation using on column injections was always detected below 5%.

The precision for the analytical procedure was evaluated by extracting and analyzing four times the same white stork egg. Reproducibility values expressed as RSD (%), along with average recoveries for surrogates and average LOD values are summarized in table S5.

**Table S5.** Values of reproducibility in the values quantified from a same egg sample extracted four times, recovery of the labeled surrogates and average LODs.

Compound	Reproducibility (RSD, %) (n=4)	Recovery (%) $\pm$ SD	Average LOD (pg/g w.w.)
<b>PBDEs</b>			
BDE-17	n.a.		0.907
BDE-28	n.a.		1.40
BDE-47	7.75		5.13
BDE-66	n.a.		2.17
BDE-85	n.a.		0.480
BDE-99	n.a.		5.76
BDE-100	n.a.		1.12
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -BDE-138		83.6 $\pm$ 11.8	
BDE-153	4.13		4.40
BDE-154	4.31		4.00
BDE-183	4.25		0.658
BDE-184	n.a.		4.34
BDE-191	4.25		1.33
BDE-194	n.a.		1.81
BDE-195	n.a.		1.83
BDE-196	3.36		1.36
BDE-197	7.91		1.39
BDE-198+199+200+203	2.5		3.34
BDE-201	3.2		1.53
BDE-202	5.1		1.70
BDE-204	2.3		2.16
BDE-205	n.a.		2.09
BDE-206	6.4		2.89
BDE-207	2.1		2.21
BDE-208	3.2		3.30
BDE-209	15.1		2.97
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -BDE-209		65.3 $\pm$ 14.5	
<b>DDTs</b>			(GC- $\mu$ ECD / GC-qMS)
p,p'-DDE	4.07		8.85 / 7.48
D <sub>8-p,p'</sub> -DDE		88.5 $\pm$ 9.1	
p,p'-DDD	15.1		2.27 / 0.692
D <sub>8-o,p'</sub> -DDT		97.4 $\pm$ 6.8	
p,p'-DDT	8.35		5.88 / 23.0
D <sub>8-p,p'</sub> -DDT		99.6 $\pm$ 7.6	
<b>ortho PCBs</b>			(GC- $\mu$ ECD / GC-qMS)
PCB-28	22.9		14.7 / 6.19
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB-28		73.2 $\pm$ 12.6	
PCB-52	24.2		18.9 / 2.73
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB-52		76.1 $\pm$ 12.8	
PCB-95	11.6		1.69 / 2.40
PCB-101	16.5		17.7 / 1.75
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB-101		96.2 $\pm$ 14.8	
PCB-105	4.07		2.69 / 1.95
PCB-114	14.4		13.1 / 1.81
PCB-118	2.33		1.92 / 2.17
PCB-123	18.4		13.3 / 1.57
PCB-132	7.89		0.229 / 0.938
PCB-138	3.07		5.70 / 2.74
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB-138		94.4 $\pm$ 15.9	
PCB-149	15.9		6.22 / 1.15
PCB-153	8.20		7.94 / 2.14
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB-153		97.4 $\pm$ 15.4	
PCB-156	3.51		2.00 / 3.43

PCB-157	9.16		18.0 / 2.37
PCB-167	3.10		1.90 / 1.95
PCB-170	4.82		6.73 / 3.72
PCB-180	1.18		8.37 / 2.15
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB-180		97.2 ± 10.9	
PCB-183	2.04		16.6 / 1.56
PCB-189	14.4		3.97 / 0.661
PCB-194	14.0		1.48 / 2.11
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB-209		85.4 ± 18.8	
<b>non-ortho PCBs</b>			
PCB-77	9.84		0.139
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB-77		108 ± 15	
PCB-81	12.4		0.147
PCB-126	14.2		0.243
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB-126		106 ± 24	
PCB-169	16.8		0.198
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB-169		109 ± 30	
<b>DPs</b>			
<i>anti</i> -[DP-2Cl]	n.a.		GC-qMS / GC- HRMS)
<i>syn</i> -DP	7.73		- / 0.552
<sup>13</sup> C <sub>10</sub> - <i>syn</i> -DP		82.4 ± 15.1	0.986 / 0.180
<i>anti</i> -[DP-1Cl]	13.6		0.805 / 0.241
<i>anti</i> -DP	4.17		1.49 / 0.262
<sup>13</sup> C <sub>10</sub> - <i>anti</i> -DP		84.2 ± 17.1	
<b>PCDDs</b>			
2,3,7,8-TCDD	11.2		0.051
2,3,7,8-TC[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]DD		86.6 ± 12.6	
1,2,3,7,8-PeCDD,	7.23		0.135
1,2,3,7,8-PeC[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]DD		85.3 ± 18.6	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	7.37		0.106
1,2,3,4,7,8-HxC[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]DD		93.1 ± 13.3	
1,2,3,6,7,8-HxCDD	6.70		0.110
1,2,3,6,7,8-HxC[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]DD		91.9 ± 12.8	
1,2,3,7,8,9-HxCDD 1,2,3,4,6,7,8-	7.36		0.112
HpCDD	6.34		0.108
1,2,3,4,6,7,8-HpC[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]DD		88.7 ± 14.3	
OCDD	7.61		0.196
OC[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]DD		79.2 ± 21.1	
<b>PCDFs</b>			
2,3,7,8-TCDF	2.71		0.046
2,3,7,8-TC[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]DF		87.5 ± 12.2	
1,2,3,7,8-PCDF	7.04		0.071
1,2,3,7,8-PeC[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]DD		88.8 ± 12.7	
2,3,4,7,8-PCDF	7.05		0.072
2,3,4,7,8-PC[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]DF		83.1 ± 13.9	
1,2,3,4,7,8-HxCDF	7.85		0.077
1,2,3,4,7,8-HxC[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]DF		88.9 ± 14.3	
1,2,3,6,7,8-HxCDF	5.0		0.075
1,2,3,6,7,8-HxC[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]DF		92.5 ± 14.0	
1,2,3,7,8,9-HxCDF	5.32		0.080
1,2,3,7,8,9-HxC[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]DF		87.2 ± 12.4	
2,3,4,6,7,8-HxCDF	5.67		0.146
2,3,4,6,7,8-HxC[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]DF		75.0 ± 17.8	
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	4.2		0.072
1,2,3,4,6,7,8-HpC[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]DF		83.2 ± 14.9	
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	4.37		0.115
1,2,3,4,7,8,9-HpC[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]DF		74.8 ± 19.0	
OCDF	7.61		0.165

In the case of stable isotope analysis three reference materials provided by the International Atomic Energy Agency (IAEA), were analyzed every 12 samples to compensate any shift over time and calibrate the equipment. IAEA N1, IAEA N2 and IAEA NO3 were the standards for  $\delta^{15}\text{N}$  and USGS 40, IAEA CH7 and IAEA CH6 in the case of  $\delta^{13}\text{C}$ . Standards spanned the range of stable isotope signatures found in the white stork egg samples. Standards replicate analysis showed accuracy within  $\pm 0.2\text{‰}$  and  $\pm 0.1\text{‰}$  for  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  measurements, respectively. Average RSDs for  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  measurements in the reference materials were 0.84% and 1.87%, respectively.

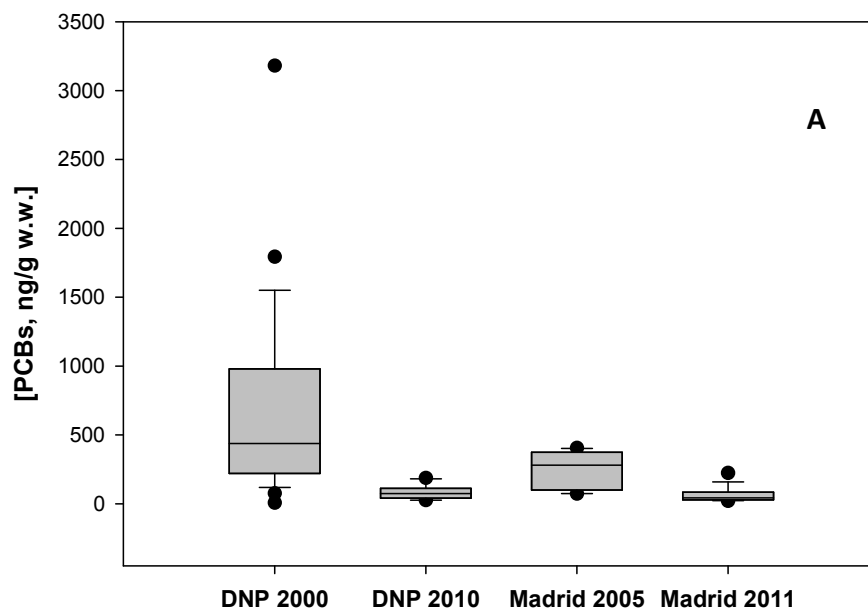
## 2. RESULTS

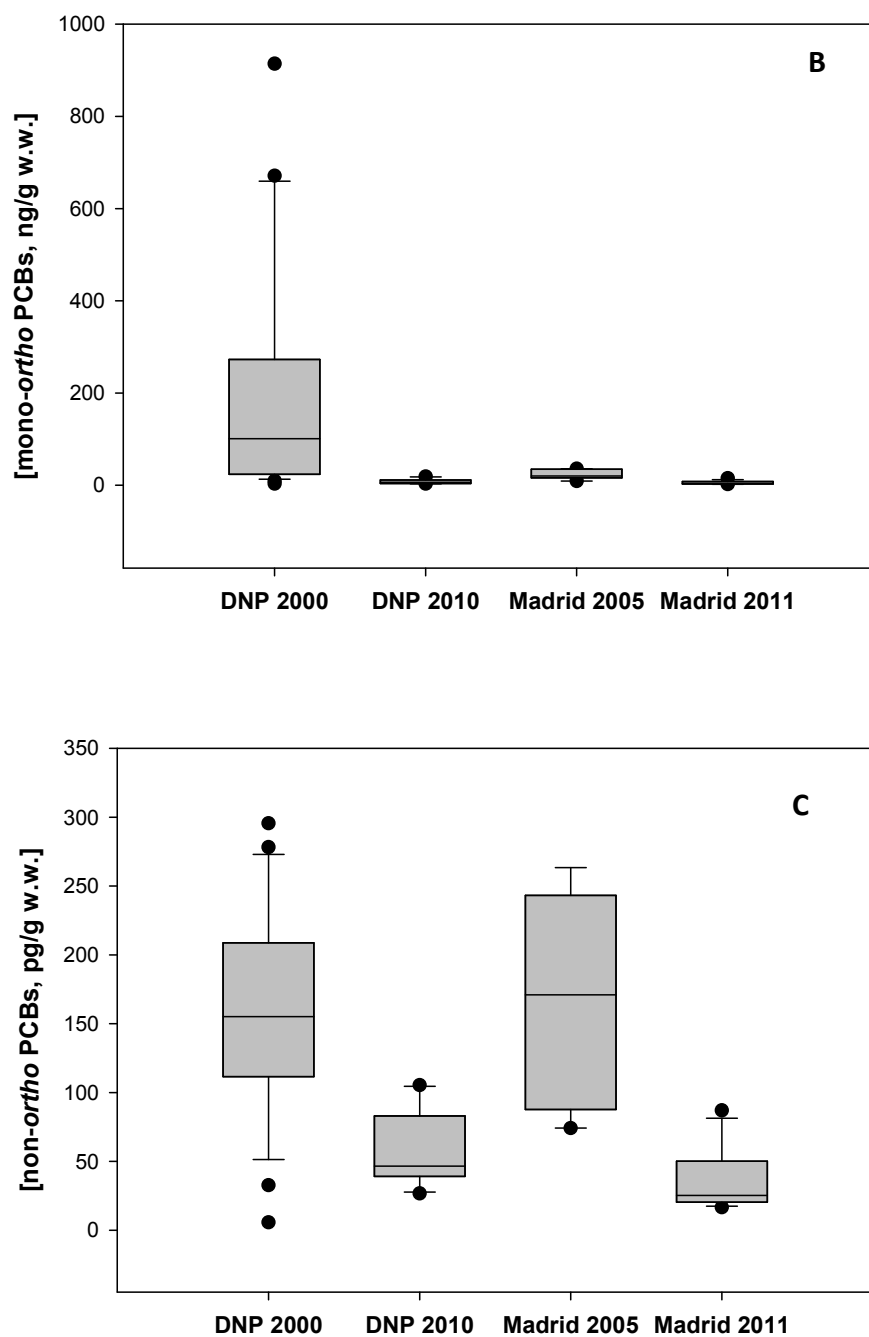
### 2.1. Lipid content

**Table S6.** Arithmetic mean, median, geometric mean and range of the lipid content (% relative to the whole egg content) measured in white stork eggs from DNP and Madrid.

% LIPID CONTENT	MEAN	MEDIAN	GEOMETRIC MEAN	RANGE
DNP 2000	7.32	7.57	7.34	5.97 – 9.03
DNP 2010	6.59	6.22	6.42	4.89 – 9.55
MADRID 2005	7.18	7.05	7.15	6.22 – 8.71
MADRID 2011	6.02	6.12	5.98	4.78 – 7.07

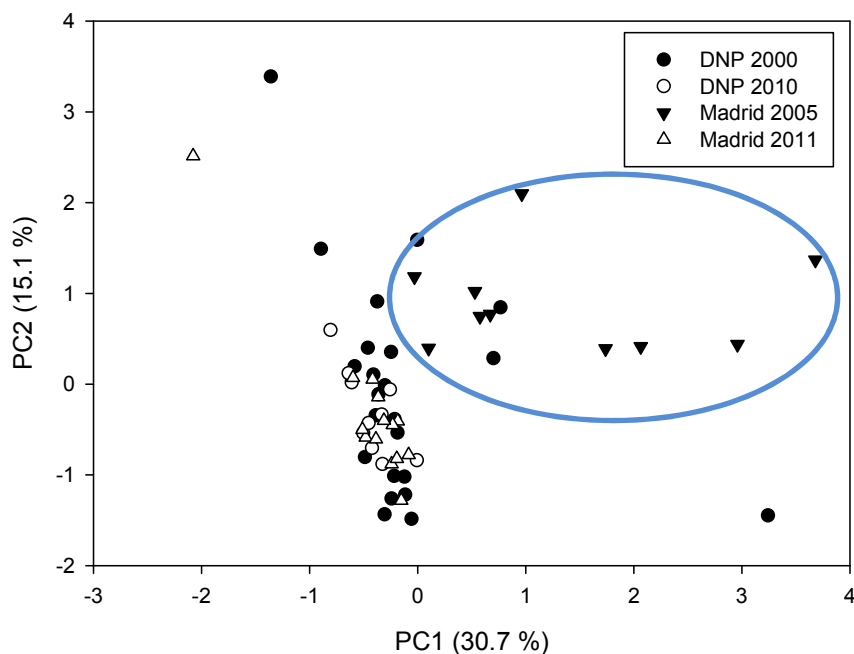
### 2.2. PCBs





**Figure S2.** Box-and-whisker plots (boxes are depicted as first and third quartiles with the median indicated, and whiskers correspond to 10 and 90% percentiles) of (a) total PCBs, (b) mono-ortho PCBs and (c) non-ortho PCBs in white stork eggs from DNP and Madrid.





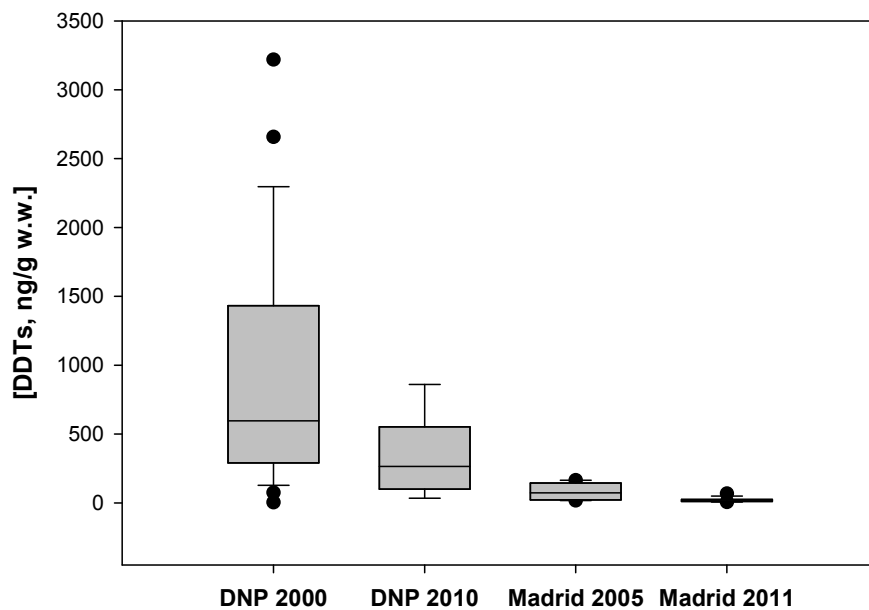
**Figure S3.** Factor loadings and scores from the PCA on the relative abundance of each congener into the total PCB content in white stork eggs from DNP and Madrid.

**Table S7.** Quantification frequency of PCB congeners (*ortho*- in black, *mono-ortho*- in blue and *non-ortho*- in red) in white stork eggs from each location and year.

	DNP 2000	DNP 2010	Madrid 2005	Madrid 2011
Congener	% >LOQ	% >LOQ	% >LOQ	% >LOQ
PCB-28	100	90	100	57.1
PCB-52	100	100	100	100
PCB-77	100	100	100	100
PCB-81	100	100	100	100
PCB-95	91.3	90	100	92.9
PCB-101	100	100	100	100
PCB-105	100	100	100	100
PCB-114	100	100	80	100
PCB-118	100	100	100	100
PCB-123	65.2	80	n.a.	85.7
PCB-126	100	100	100	100
PCB-132	39.1	90	80	85.7
PCB-138	100	100	100	100
PCB-149	100	100	100	100
PCB-153	100	100	100	100

PCB-156	100	100	100	100
PCB-157	91.3	90	50	50
PCB-167	100	90	100	100
PCB-169	100	100	100	100
PCB-170	100	100	100	100
PCB-180	100	100	100	100
PCB-183	100	100	100	100
PCB-189	91.3	80	70	100
PCB-194	100	90	70	100
$\Sigma$ PCBs	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

### 2.3. DDTs

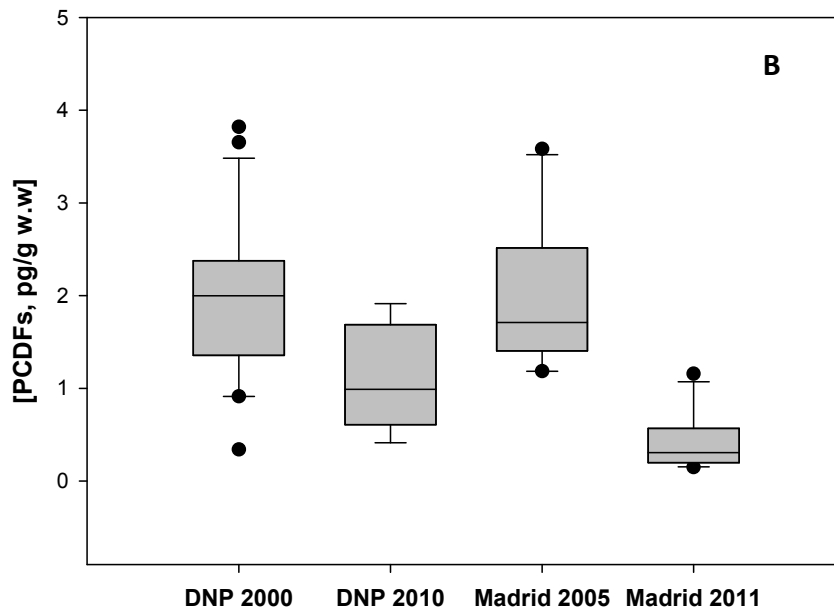
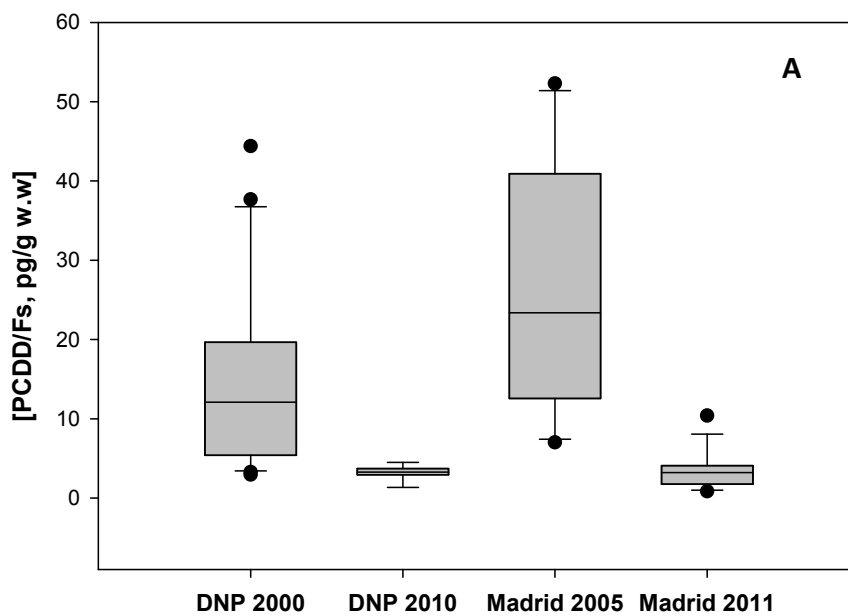


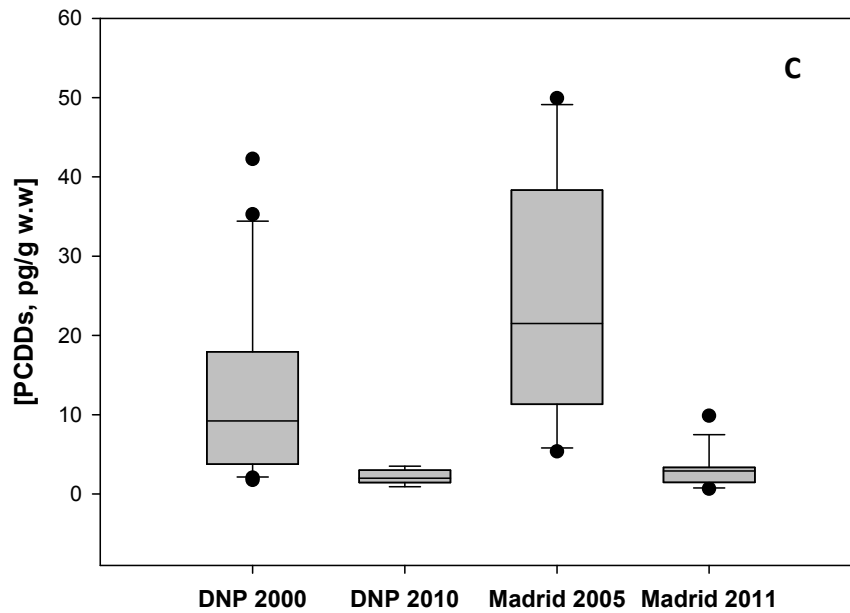
**Figure S4.** Box-and-whisker plots (boxes are depicted as first and third quartiles with the median indicated, and whiskers correspond to 10 and 90% percentiles) of total DDTs in white stork eggs from DNP and Madrid.

**Table S8.** Quantification frequency of DDTs in white stork eggs from each location and year.

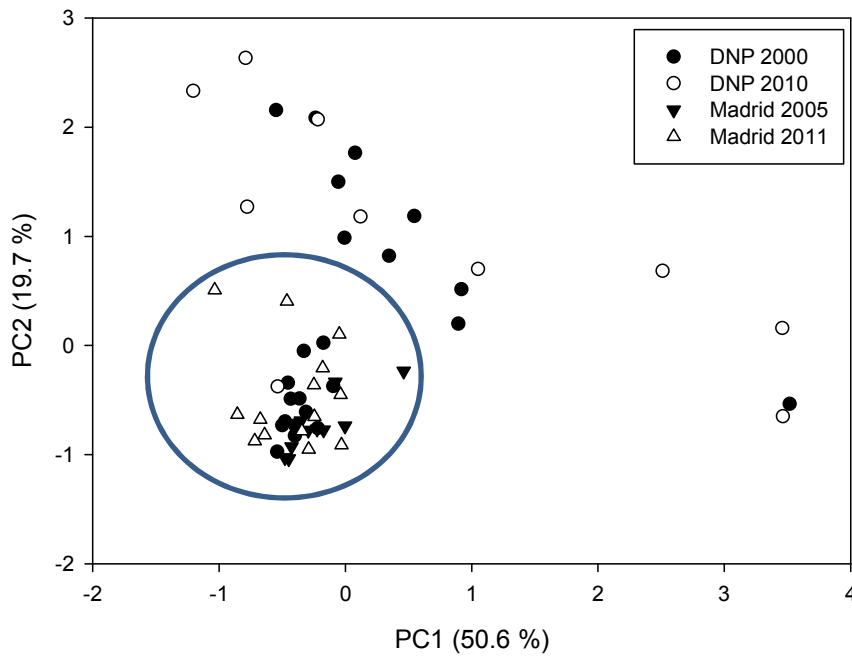
	DNP 2000	DNP 2010	Madrid 2005	Madrid 2011
	% >LOQ	% >LOQ	% >LOQ	% >LOQ
p,p'-DDE	100	100	100	100
p,p'-DDD	73.9	44.4	50	71.4
p,p'-DDT	100	100	100	100
$\Sigma$ DDTs	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

2.4. PCDD/Fs





**Figure S5.** Box-and-whisker plots (boxes are depicted as first and third quartiles with the median indicated, and whiskers correspond to 10 and 90% percentiles) of total a) PCDD/Fs, b) PCDFs and c) PCDDs in white stork eggs from DNP and Madrid.

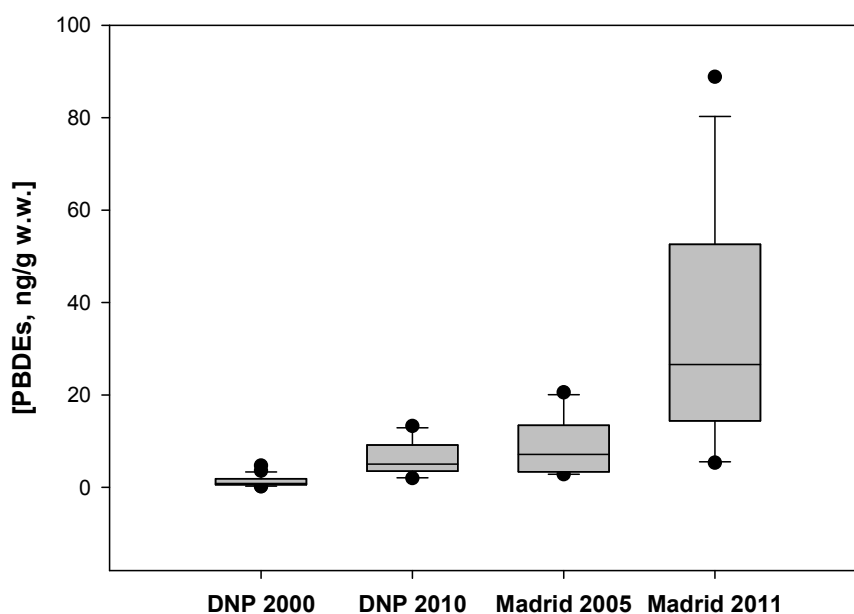


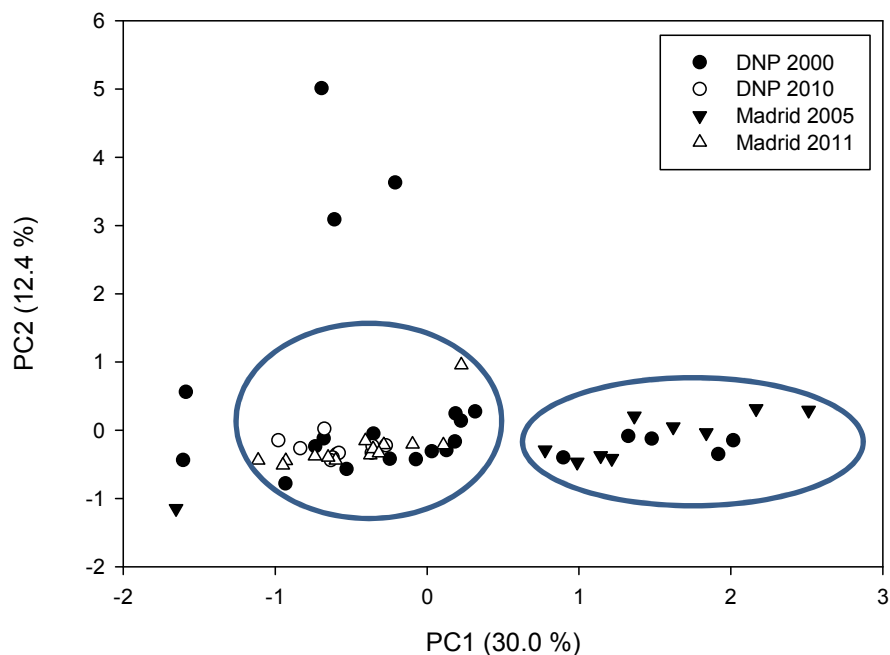
**Figure S6.** Factor loadings and scores from the PCA on the relative abundance of each congener into the total PCDD/F content in white stork eggs from DNP and Madrid.

**Table S9.** Quantification frequency of PCDD/F congeners in white stork eggs from each location and year.

	<b>DNP 2000</b>	<b>DNP 2010</b>	<b>Madrid 2005</b>	<b>Madrid 2011</b>
<b>Congener</b>	<b>% &gt;LOQ</b>	<b>% &gt;LOQ</b>	<b>% &gt;LOQ</b>	<b>% &gt;LOQ</b>
2378-TCDF	100	88.9	100	64.3
12378-PeCDF	100	88.9	100	64.3
23478-PeCDF	100	100	100	100
123478-HxCDF	100	100	100	100
123678-HxCDF	100	88.9	100	85.7
234678-HxCDF	100	88.9	100	78.6
123789-HxCDF	100	77.8	100	78.6
1234678-HpCDF	100	88.9	100	64.3
1234789-HpCDF	100	66.7	100	71.4
OCDF	100	66.7	100	28.6
2378-TCDD	100	100	100	85.7
12378-PeCDD	100	100	100	100
123478-HxCDD	100	88.9	100	64.3
123678-HxCDD	100	100	100	92.9
123789-HxCDD	100	100	100	71.4
1234678-	100	100	100	100
OCDD	100	100	100	100
ΣPCDD/Fs	100	100	100	100

## 2.5. PBDEs

**Figure S7.** Box-and-whisker plots (boxes are depicted as first and third quartiles with the median indicated, and whiskers correspond to 10 and 90% percentiles) of total PBDEs in white stork eggs from DNP and Madrid.



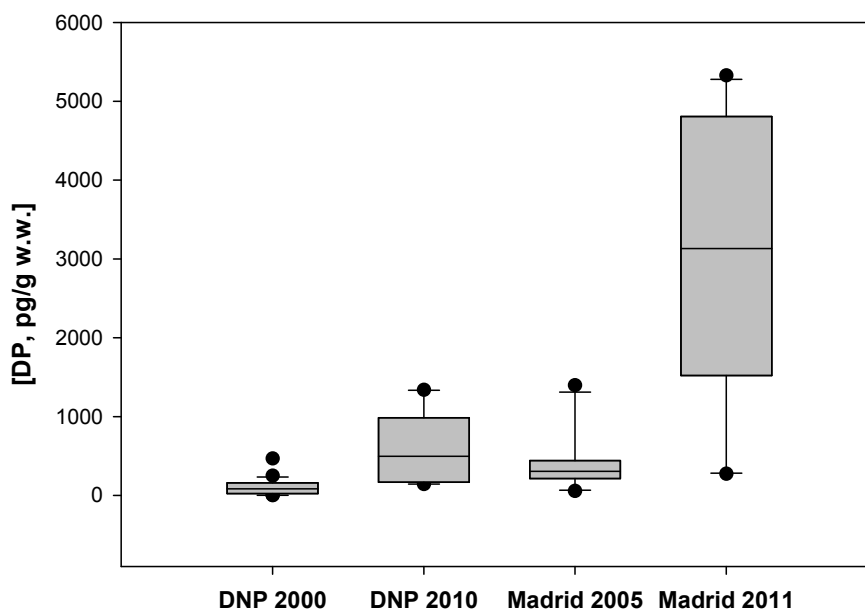
**Figure S8.** Factor loadings and scores from the PCA on the relative abundance of each congener into the total PBDE content in white stork eggs from DNP and Madrid.

**Table S10.** Quantification frequency of PBDE congeners in white stork eggs from each location and year.

	DNP 2000	DNP 2010	Madrid 2005	Madrid 2011
Congener	% >LOQ	% >LOQ	% >LOQ	% >LOQ
BDE-17	13.6	0	10	7.14
BDE-28	59.1	20	0	14.3
BDE-47	36.4	100	90	100
BDE-66	4.55	10	10	0
BDE-85	22.7	20	20	42.9
BDE-99	50	70	30	100
BDE-100	27.3	60	30	100
BDE-153	40.9	90	30	100
BDE-154	95.5	100	100	100
BDE-183	100	100	100	100
BDE-184	18.2	0	0	7.14
BDE-191	31.8	50	30	92.9
BDE-194	17.4	30	88.9	100
BDE-195	4.35	0	0	28.6
BDE-196	95.7	100	100	100
BDE-197+204	95.7	100	88.9	100
BDE-	82.6	100	100	100
BDE-201	95.7	100	88.9	100

<b>BDE-202</b>	82.6	100	100	100
<b>BDE-205</b>	8.70	20	0	0
<b>BDE-206</b>	65.2	100	100	100
<b>BDE-207</b>	91.3	100	100	100
<b>BDE-208</b>	91.3	100	100	100
<b>BDE-209</b>	95.7	100	100	100
<b>∑PBDEs</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

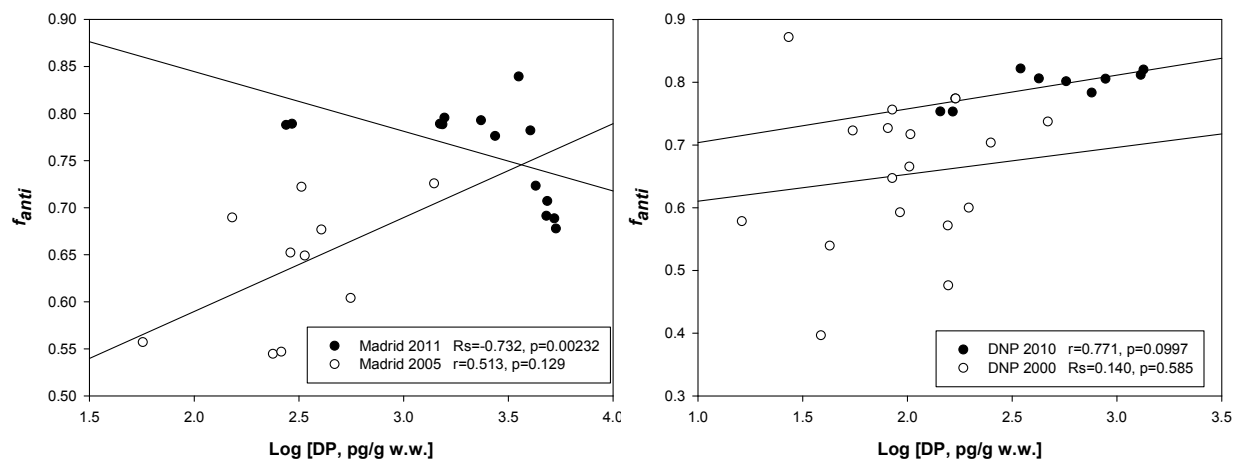
## 2.6. DP



**Figure S9.** Box-and-whisker plots (boxes are depicted as first and third quartiles with the median indicated, and whiskers correspond to 10 and 90% percentiles) of total DP in white stork eggs from DNP and Madrid.

**Table S11.** Concentration range (pg/g, w.w. basis) and quantification frequency of DP isomers and related compounds in white stork eggs from each location and year

	DNP 2000		DNP 2010		Madrid 2005		Madrid 2011	
	range	%> LOQ	range	%> LOQ	range	%> LOQ	range	%> LOQ
<i>syn</i> -DP	2.44 - 135	100	35.2 - 244	100	<LOQ - 383	91.3	58.0 - 1,710	100
<i>anti</i> -DP	0.59 - 345	100	108 - 1,100	100	<LOQ - 1,010	95.6	216 - 3,600	100
<b>Total DP</b>	2.58 - 468	100	143 - 1,340	100	56.8 - 1,400	100	274 - 5,320	100
<i>anti</i> -[DP-1Cl]	<LOQ - 4.65	8.70	<LOQ - 2.74	30	<LOQ - 0.55	10	0.98 - 14.2	100
<i>anti</i> -[DP-2Cl]	<LOD	0	<LOD	0	<LOD	0	<LOD	0



**Figure S10.** Correlations between Log [DP, ng/g w.w.], and  $f_{anti}$ . “r” stands for Pearson product-moment correlation coefficient. “ $R_s$ ” stands for Spearman's rank correlation coefficient. “p” stands for the probability for each case and type of correlation. The depicted lines correspond to least squares regression lines and are intended as visual aid to interpret –in most cases- the sign of each correlation.

## 2.7. Stable isotopes

**Table S12.** Arithmetic mean, median, geometric mean and range of  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) and  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) values determined in white stork eggs from DNP and Madrid.

	MEAN	MEDIAN	GEOMETRIC MEAN	RANGE
$\delta^{15}\text{N}$ (‰)				
DNP 2000	12.2	12.0	12.1	10.3 – 15.2
DNP 2010	11.6	11.1	11.1	9.21 – 14.0
MADRID 2005	9.24	9.37	9.23	8.53 – 9.75
MADRID 2011	8.94	8.74	8.93	8.31 – 9.82
DNP TOTAL	12.0	11.6	11.9	9.21 – 15.2
MADRID TOTAL	9.07	9.08	9.06	8.31 – 9.82
$\delta^{13}\text{C}$ (‰)				
DNP 2000	-24.4	-24.3	-24.4	-21.0 – -27.2
DNP 2010	-25.5	-26.0	-25.5	-23.1 – -27.1
MADRID 2005	-22.0	-21.9	-22.0	-20.9 – -23.2
MADRID 2011	-22.6	-22.5	-22.6	-22.1 – -23.6
DNP TOTAL	-24.8	-24.9	-24.7	-21.0 – -27.2
MADRID TOTAL	-22.4	-22.3	-22.4	-20.9 – -23.6



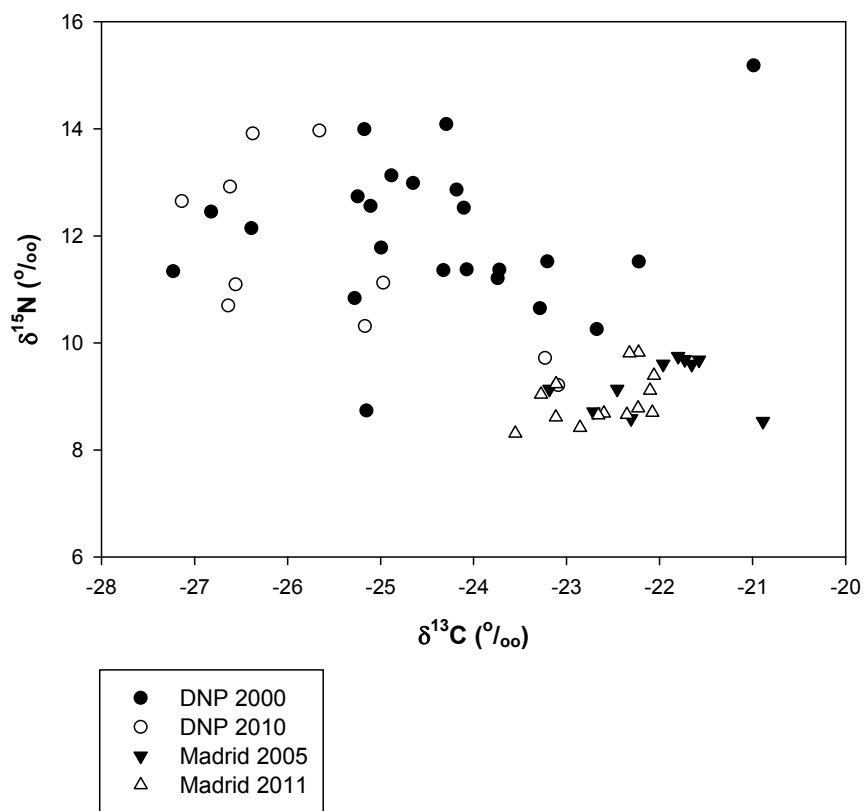
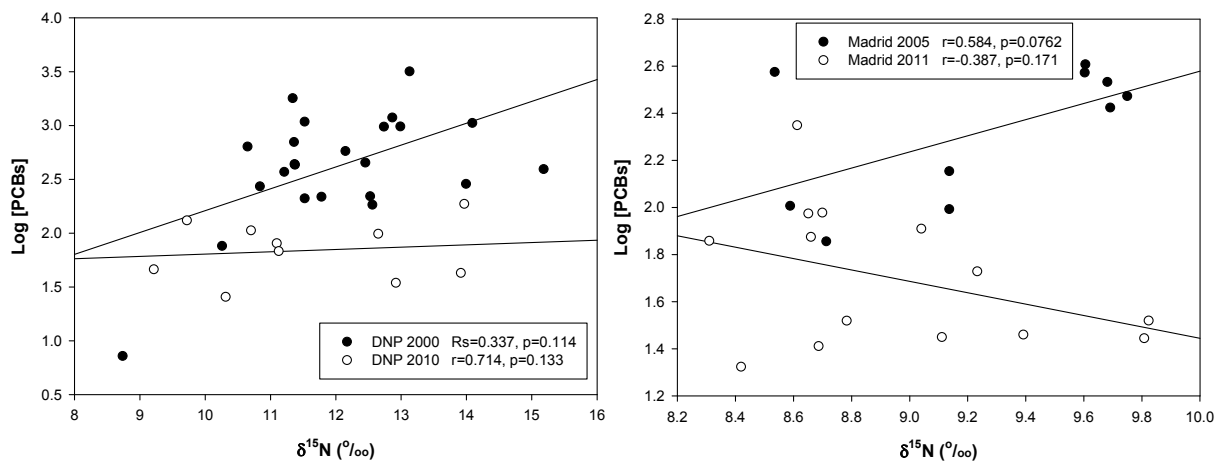
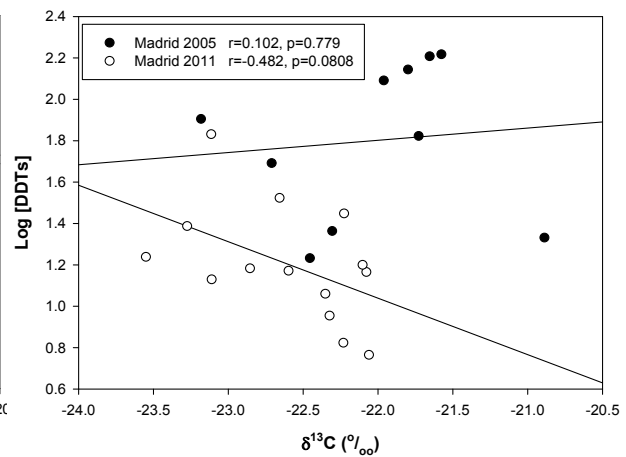
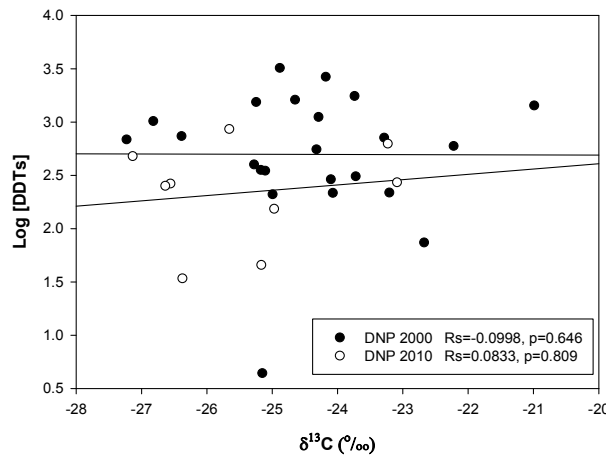
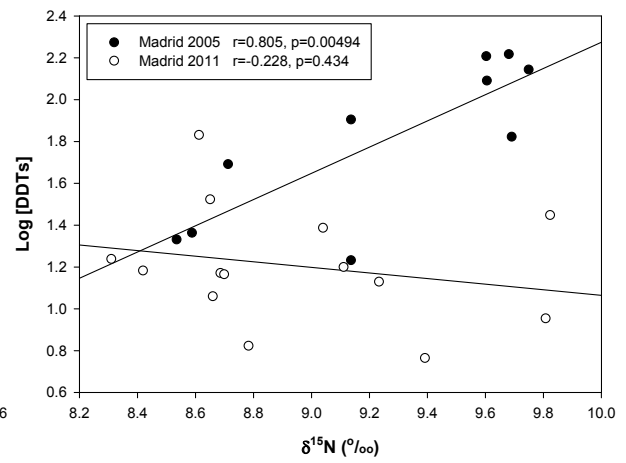
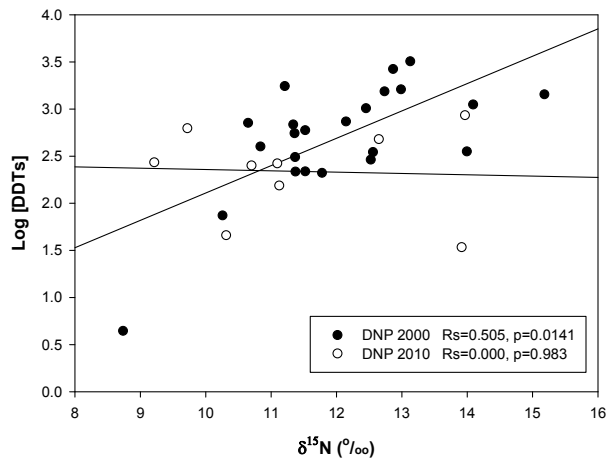
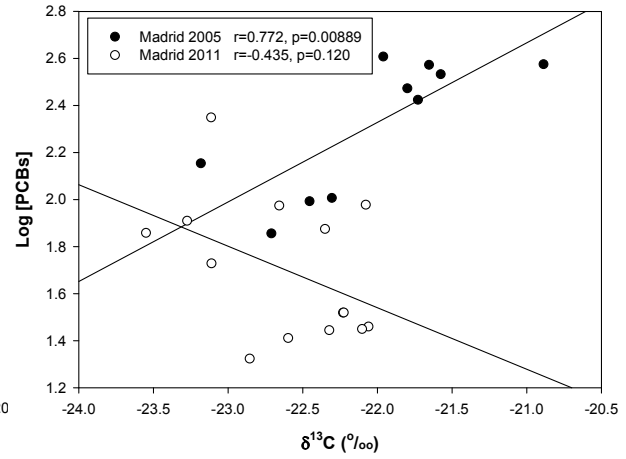
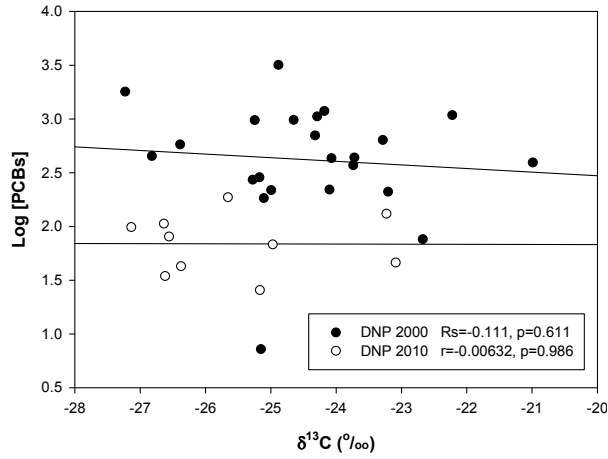
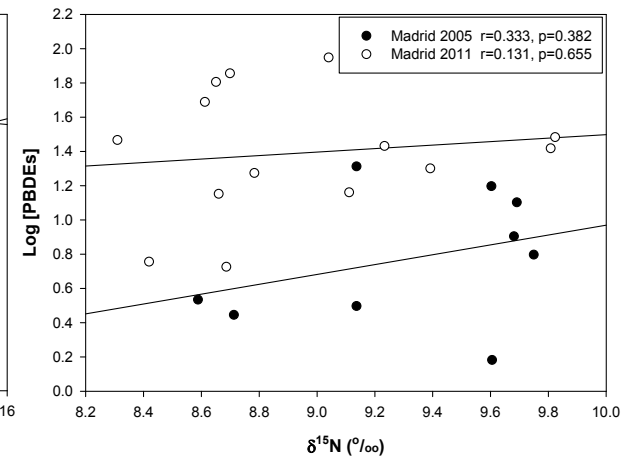
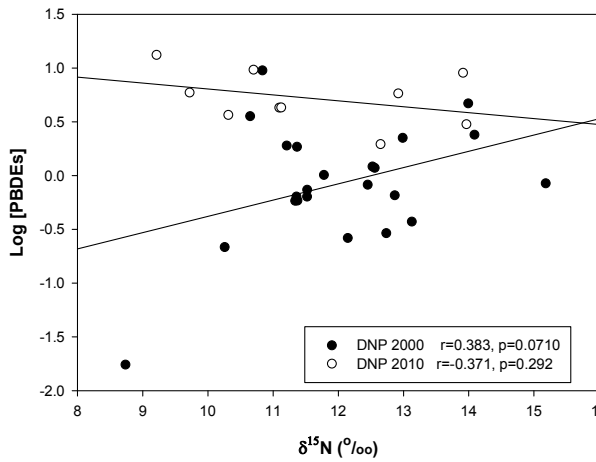
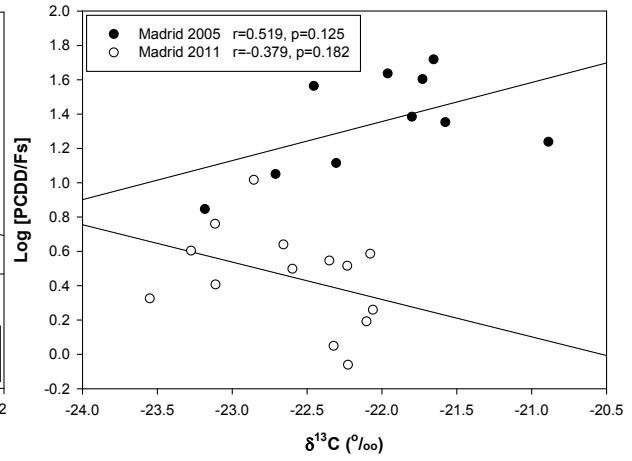
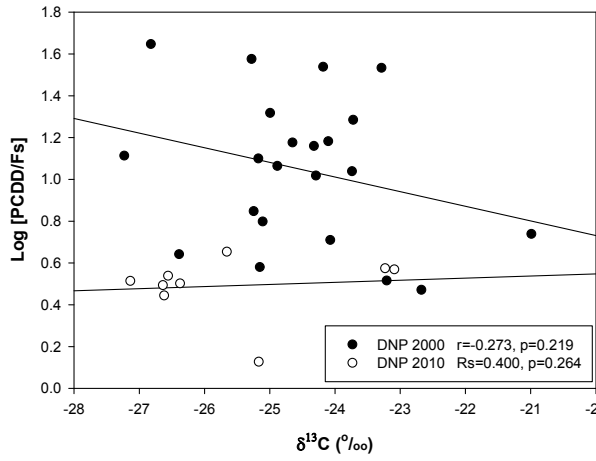
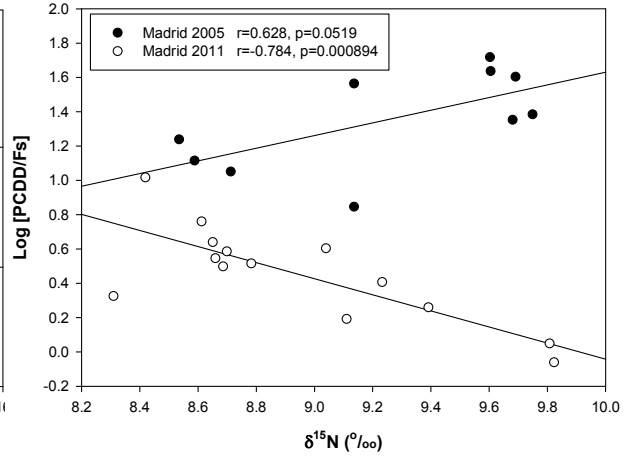
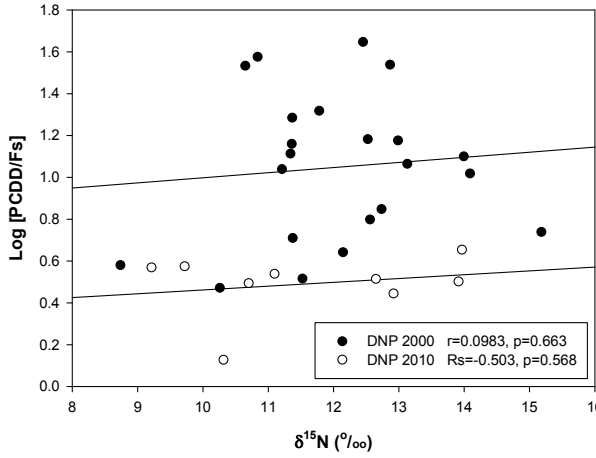
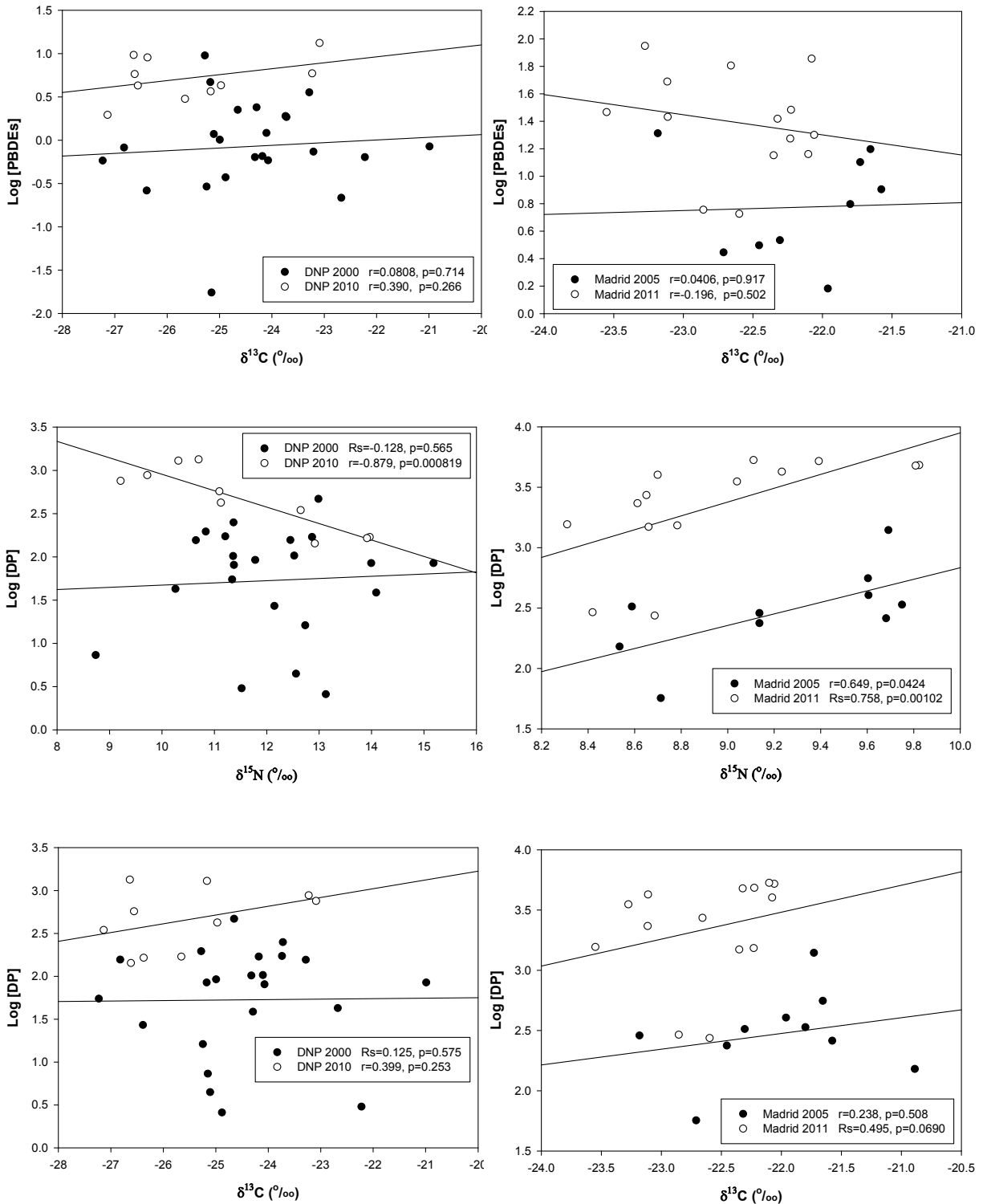


Figure S11.  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  values for white stork eggs from DNP 2000 and 2010 and Madrid 2005 and 2011.









**Figure S12.** Correlations between log [PCBs, ng/g w.w.], log [DDTs, ng/g w.w.], log [PCDD/Fs pg/g w.w.], log [PBDEs, ng/g w.w.] and log [DP, pg/g w.w.] with  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$ . “r” stands for Pearson product-moment correlation coefficient. “Rs” stands for Spearman's rank correlation coefficient. “p” stands for the probability for each case and type of correlation. The depicted lines correspond to least squares regression lines and are intended as visual aid to interpret –in most cases– the sign of each correlation.

**REFERENCES**

- Ábalos, M., J. Parera, et al. (2008). "PCDD/Fs and DL-PCBs in feeding fats obtained as co-products or by-products derived from the food chain." Chemosphere **71**(6): 1115-1126.
- Logan, J. M., T. D. Jardine, et al. (2008). "Lipid corrections in carbon and nitrogen stable isotope analyses: Comparison of chemical extraction and modelling methods." Journal of Animal Ecology **77**(4): 838-846.
- Merino, R., L. R. Bordajandi, et al. (2005). "Evaluation of organochlorine compounds in peregrine falcon (*Falco peregrinus*) and their main prey (*Columba livia*) inhabiting central Spain." Environmental Toxicology and Chemistry **24**(8): 2088-2093.
- Roscales, J. L., J. Muñoz-Arnanz, et al. (2010). "Geographical PCB and DDT Patterns in shearwaters (*Calonectris sp.*) breeding across the NE atlantic and the mediterranean archipelagos." Environmental Science and Technology **44**(7): 2328-2334.
- USEPA (1994). "EPA Method 1613: Tetra- through Octa-Chlorinated Dioxins and Furans by Dilution HRGC/HRMS." U.S. Environmental Protection Agency (USEPA).
- USEPA (1996). "Method 8081 Organochlorine pesticides by gas chromatography." U.S. Environmental Protection Agency (USEPA).

*Capítulo 6*  
*Discusión Integradora*



## 6. DISCUSIÓN INTEGRADORA

---

Frente a las numerosas investigaciones enfocadas en la polución por metales pesados y metaloides propiciadas por el *Desastre de Aznalcollar* a partir del año 1998 y mantenidas hasta nuestros días, existía una manifiesta carencia de información científica actualizada en relación a la presencia de COP, y otros contaminantes organohalogenados emergentes con características específicas de los COP, en un área de especial relevancia como el Espacio Natural de Doñana y su entorno. Este área no sólo posee un importantísimo valor ecológico por la gran biodiversidad de especies que alberga, muchas de ellas en peligro de extinción, sino también un inmenso valor social y económico con tradiciones muy arraigadas. Estos hechos, sumados a la particular circunstancia de haber detectado inesperados niveles de presencia del DDT en esta zona y que requerían una investigación urgente, fueron la principal motivación para abordar la amplia investigación llevada a cabo en la presente tesis doctoral. En base a estas consideraciones, el objetivo principal de la investigación aquí recogida, persiguió actualizar y profundizar en el conocimiento de la contaminación por COP y contaminantes medioambientales similares, tanto clásicos (DDTs, PCBs, PCDD/Fs) como emergentes (PBDEs y DP) en el END. Además, como valor añadido a la investigación establecida para el Espacio Natural de Doñana y su entorno, se planteó un estudio espacial y temporal comparativo contrastando la presencia y evolución de los contaminantes citados en un área sometida, a priori, a mayores impactos antropogénicos, como es el caso de la región de Madrid por su más marcado carácter urbano e industrial, y en donde, para las especies estudiadas, no existe la categoría de protección ambiental con la que cuenta el Espacio Natural de Doñana.

Tras los capítulos correspondientes a objetivos e introducción de la línea de investigación seguida en esta tesis doctoral, en el **tercer capítulo** se ha presentado el primer paso de la investigación abordada con el objetivo específico de estudiar la presencia de un COP clásico como el DDT, prohibido en España desde finales de los años 70, en el END y concretamente en suelos, como matriz representativa del medio físico o compartimento abiótico. Esta investigación, centrada en el análisis de este insecticida y sus principales productos de degradación medioambientales, DDE y DDD,



en todas sus formas isómeras, ha dado lugar a la publicación de dos trabajos en revistas científicas de reconocido prestigio internacional.

En el primer artículo presentado en este capítulo se ha descrito el desarrollo y optimización de un método cromatográfico para el análisis del *o,p'*-DDT y la determinación de las EF asociadas al contenido del mismo en muestras reales. Al ser el *o,p'*-DDT una especie quiral, la separación de sus enantiómeros ha de efectuarse con una columna adecuada, portadora de una fase estacionaria quiral que permita su resolución. Sin embargo, este tipo de columnas presentan limitaciones importantes en cuanto al intervalo de temperaturas en el que pueden operar, lo que puede dificultar e incluso imposibilitar el análisis de matrices complejas como son las muestras reales donde se pueden encontrar este tipo de contaminantes medioambientales. En esta memoria, para llevar a cabo la separación deseada se optó por la cromatografía de gases multidimensional (MDGC) en su modalidad *heart-cutting* con detección por captura de electrones (ECD), puesto que esta técnica permite la combinación de dos columnas de carácter ortogonal en cuanto a sus mecanismos de separación. Así, mientras la columna de la primera dimensión, capaz de operar a temperaturas más elevadas, puede efectuar la separación del *o,p'*-DDT de la mayor parte de los componentes de la matriz, el corte y transferencia desde la primera dimensión, a un tiempo preciso, permite la separación a temperaturas suaves en la segunda dimensión del *o,p'*-DDT en sus dos enantiómeros, a la par que de cualquier otro componente coeluido con el mismo (en este caso el *p,p'*-DDD). Tras ensayar dos columnas con fases quirales distintas, finalmente el método se optimizó con la combinación DB-5 y BGB-172, para la primera y segunda dimensión respectivamente. Dadas las bajas concentraciones esperables en muchas muestras para el *o,p'*-DDT –por ser éste un componente minoritario del DDT técnico–, y que a su vez serán menores para cualquiera de sus dos enantiómeros, se inyectaron volúmenes de 4  $\mu\text{L}$  con objeto de maximizar la sensibilidad. Adicionalmente, y dado el carácter termolábil del DDT, las inyecciones se efectuaron con un inyector PTV, convenientemente programado con un pulso de presión y una rampa de temperatura que favoreciesen la entrada de la muestra en la columna con la mayor celeridad y menor degradación térmica posible. Como resultado de la optimización de todas las condiciones utilizadas en el sistema cromatográfico se consiguió la separación de los dos enantiómeros del *o,p'*-DDT en la columna BGB-172 con una resolución ( $R_s$ ) de 2,4. Se

alcanzaron límites de detección y cuantificación tan bajos como 2,1 y 7,1 pg/ $\mu$ L, respectivamente, comprobando un intervalo de linealidad entre los 7,1 y 1.000 pg/ $\mu$ L. Además, se obtuvieron ratios de degradación del *o,p'*-DDT inferiores siempre al 15%, que es el valor de consenso recomendado por el método 8081 de la EPA de E.E.U.U. para el análisis cromatográfico del DDT. Asimismo y de manera muy importante se consiguieron valores de reproducibilidad muy satisfactorios de las EF obtenidas en días distintos con RSD de 3,2% y 0,62% para dos niveles de concentración diferentes de 50 y 250 pg/ $\mu$ L, respectivamente, de una mezcla racémica de *o,p'*-DDT. Finalmente, se evaluó la aplicabilidad del método mediante la determinación de las EF correspondientes al contenido en *o,p'*-DDT en cuatro muestras reales de suelos de diferente naturaleza procedentes del entorno del río Ebro, para las que previamente las concentraciones de todas las formas isoméricas de DDTs habían sido cuantificadas. Las EF no difirieron significativamente del valor racémico en dos de los suelos de carácter agrícola analizados, apuntando así a un posible reciente uso del DDT en los mismos.

En base a los buenos resultados obtenidos en la determinación de las EF mediante *heart-cutting* MDGC-ECD, se decidió utilizar esta técnica como herramienta complementaria en una posterior investigación para la determinación del DDT y sus productos de degradación en muestras de suelos agrícolas del entorno del END. De este modo, en el segundo artículo de este capítulo se describe la investigación realizada para cuantificar el contenido en DDT de suelos de cultivos muestreados en la primavera de los años 2007 y 2008 en un área con una gran actividad agrícola como es la Comarca de Doñana, en el entorno del END. Con objeto de poder evaluar el origen (técnico *vs.* dicofol) y datar los posibles niveles de DDT presentes en dichas muestras se llevó a cabo la determinación de todas las formas isoméricas del DDT y sus productos de degradación, DDE y DDD, por GC- $\mu$ ECD. Inyecciones de 2  $\mu$ L efectuadas con un inyector on-column permitieron mantener los ratios de degradación del DDT controlados por debajo del 5%. Adicionalmente se determinaron las EF del contenido en *o,p'*-DDT de dichos suelos mediante la aplicación del método basado en *heart-cutting* MDGC desarrollado y optimizado previamente. Se encontraron niveles de DDTs, principalmente *p,p'*-DDT y *p,p'*-DDE, en el 100% de las muestras analizadas, poniendo de manifiesto la gran persistencia de estos compuestos en este tipo de matrices. No obstante y aunque en ocasiones fueran comparables en orden de magnitud, en general se

obtuvieron valores bajos de este pesticida en relación a suelos agrícolas de otras partes del mundo muestreados relativamente próximos en el tiempo, incluyendo suelos agrícolas españoles procedentes de la cuenca del Ebro. Al mismo tiempo, el intervalo de concentraciones medidas fue de hasta dos órdenes de magnitud inferior al detectado en suelos del entorno del END en 1990, poniendo de manifiesto un cese en el uso del DDT en este área desde entonces. Contradictoriamente, el análisis del ratio  $R_{p,p'/p,p'} = ([p,p'-DDE] + [p,p'-DDD]) / [p,p'-DDT]$ , arrojó valores inferiores a 2 para más del 43% de las muestras e inferiores a 1 para aproximadamente un 17% de las mismas. Cerca de 30 años después de su prohibición, estos datos parecen indicar un posible uso ilegal del insecticida en cultivos agrícolas, concretamente de fresas, olivos y vides, aunque de forma moderada en cuanto a sus cantidades. Por otro lado, los valores obtenidos para el ratio  $R_{o,p'/p,p'} = [o,p'-DDT] / [p,p'-DDT]$  fueron superiores a 0,2 y por tanto indicativos de un posible empleo de dicofol en aproximadamente un 27% de suelos correspondientes a cultivos de cítricos, algodón, y fresas, todos ellos cultivos en los que el uso del dicofol estaba indicado y permitido. Las EF del *o,p'*-DDT pudieron determinarse en 22 de los suelos recogidos, observándose un enriquecimiento enantioselectivo en 17 de los mismos. Desviaciones con respecto al valor racémico de las EF en uno u otro sentido se observaron con una frecuencia aproximada del 50%, lo cual era esperable en función de lo descrito en la literatura. Por ello y con objeto de intentar relacionar la magnitud del enriquecimiento enantiomérico con la datación llevada a cabo con el ratio  $R_{p,p'/p,p'}$ , se calculó el parámetro  $DEV_{rac}$  correspondiente al valor absoluto de la diferencia entre la EF de una muestra dada y el valor racémico de 0,5. Seguidamente se buscó un comportamiento común en la magnitud y variación de  $DEV_{rac}$  y  $R_{p,p'/p,p'}$ , pero no se encontró ninguna correlación significativa. Esto puso de manifiesto que, al menos para el DDT en el tipo de matriz estudiada, las EF no proporcionan una medida cuantificable de la degradación global de este pesticida.

En el **cuarto capítulo** se ha detallado la investigación de dos trabajos científicos concretos relacionados con contaminantes emergentes como los PBDEs y el DP, para los que hasta el momento no existía ningún tipo de información sobre su presencia en especies bioindicadoras del END y su entorno. Estos trabajos se abordaron en los estadios iniciales del gran interés de la comunidad científica a nivel internacional sobre el comportamiento de estos compuestos en el medio y fauna silvestre en particular, a la

par que se continuaba con el estudio de otros COP clásicos (PCBs, DDTs y PCDD/Fs) que, por facilitar la discusión integradora de toda la investigación abordada en la presente tesis doctoral, se presenta posteriormente en el capítulo 5. Para abordar toda la investigación previamente planteada se emplearon huevos infértiles de cigüeña blanca como especie bioindicadora y en concreto como ejemplo de estrategia de biomonitorización no destructiva y mínimamente invasiva.

El primer trabajo se enfocó en la evaluación de la contaminación por PBDEs, analizando el contenido de un total de 28 congéneres, considerando, además de los congéneres tri- a hepta-, todos los octa-, nona- y deca- bromosustituidos en muestras de huevos infértiles de cigüeña blanca del END de los años 1999 y 2001. También se incluyó el análisis del mismo tipo de muestras de la misma especie de la región de Madrid del año 2005, con objeto de poder comparar este tipo de contaminación en dos áreas, a priori, con importantes diferencias en cuanto al tipo y grado de impacto antropogénico al que se encuentran sometidas. La determinación de los 12 congéneres tri- a hepta- bromosustituidos se llevó a cabo por GC-NCI-MS, mientras que la GC-HRMS de mayor sensibilidad y selectividad, fue elegida para el análisis de PBDEs de alto grado de bromación cuya presencia o no en las muestras era incierta. La ubicuidad de estos retardantes de llama, asociados mayoritariamente a bienes de consumo de carácter textil, eléctrico y electrónico, quedó demostrada tras su detección en todas las muestras analizadas. Los resultados en términos absolutos de concentración pusieron de relieve unos niveles en el END significativamente menores que los detectados en la región de Madrid (aproximadamente 5 ó 8 veces menores dependiendo de si se comparan los valores totales de las medias o medianas, respectivamente). Estos resultados fueron coherentes con lo esperado, sugiriendo un uso mucho más intenso y por tanto una liberación en el medio mucho más acusada de estos compuestos en un área de marcado carácter urbano e industrial como es la región de Madrid. Sin embargo, la diferencia de hasta seis años entre los tiempos de muestreo para los huevos de Doñana y Madrid aconsejaba valorar con cautela esta diferencia de concentraciones tan marcada. Por otro lado, lo sorprendente e inesperado de los resultados fue el detectar una contribución tan elevada de los congéneres octa- y nona-, y mayoritaria en el caso del BDE-209, en todas las muestras. Este es un escenario que hasta la fecha había sido descrito en muy pocos casos en aves o en biota en general, y normalmente concerniendo a especies depredadoras

terminales como aves rapaces. Consecuentemente, estos datos permitieron aportar nuevos indicios positivos en torno a las tan discutidas biodisponibilidad y tendencia a la bioacumulación del BDE-209, describiendo la ocurrencia de ambos fenómenos en una especie eminentemente terrestre como es la cigüeña blanca. Asimismo, y pese a las diferencias observadas y atribuidas a la dieta entre las dos colonias estudiadas en relación a la contribución relativa de cada congénere, tanto en huevos procedentes de Doñana como en aquellos de Madrid se observó el siguiente perfil común de abundancia: BDE-207>BDE-208>BDE-206. Este perfil nunca había sido descrito en una mezcla comercial de PBDEs, y por tanto su hallazgo, junto con la detección del congénere BDE-202 –tampoco presente en ninguna mezcla técnica– en aproximadamente un 83% de las muestras del END en el 2000 y el 100% de las de Madrid 2005, podrían explicarse en base a la degradación biótica y/o abiótica del BDE-209 en el medio ambiente y/o en los organismos que lo bioacumulan, en acuerdo con lo sugerido por varios autores.

El segundo trabajo recogido en este capítulo se enfocó en la evaluación de la posible contaminación por DP en las mismas muestras, tanto del END como de la región de Madrid analizadas con anterioridad. El análisis se llevó a cabo por GC-HRMS y ante la ausencia de datos en relación a la presencia de dicho retardante de llama en cualquier matriz biótica o abiótica de nuestro país, fue sorprendente su detección, aunque fuera en un orden de magnitud inferior al de los PBDEs, en el 100% de las muestras de ambas regiones. De manera similar a los niveles registrados para los PBDEs, se encontraron concentraciones más elevadas de DP en las muestras de Madrid; hecho de nuevo coherente con el uso mayoritario de este compuesto en matrices poliméricas empleadas en conectores eléctricos y electrónicos, mobiliario, etc. Dado que el DP se ha sugerido como posible reemplazo de la mezcla deca-BDE y por tanto parece lógico asumir fuentes comunes o similares de emisión para ambos retardantes de llama, se buscó una correlación entre la presencia del DP y el BDE-209, que sin embargo se mostró significativa sólo en el caso del END. Esta situación de difícil explicación pudiera estar relacionada con las condiciones de no equilibrio entre compartimentos ambientales que pueden darse en una región como Madrid, en donde es factible asumir la presencia de un mayor número de fuentes de este y otro tipo de contaminantes. Además de los dos isómeros del DP, se detectó la presencia del DP-1Cl, por primera vez en una muestra de

biota, en aproximadamente un 10% de las muestras. El interés asociado a la detección del DP-1Cl radicaba en el hecho de que éste había sido postulado hasta el momento junto con el DP-2Cl y el 1,5-DPMA como posibles productos de degradación biótica y/o abiótica del DP. Finalmente se estudió el posible enriquecimiento de cada estereoisómero del DP en los huevos analizados mediante el cálculo de la fracción del isómero *anti*, definida como  $f_{anti} = [anti-DP]/([anti-DP] + [syn-DP])$ . Valores similares de  $0,66 \pm 0,12$  y  $0,64 \pm 0,07$  para las  $f_{anti}$  fueron encontrados en muestras de Doñana y Madrid respectivamente. Estos valores no difirieron significativamente del intervalo de valores del DP técnico descrito en la literatura, no proporcionando por tanto ninguna indicación clara sobre la degradación diferencial de uno de los dos diastereoisómeros en las muestras analizadas.

Una vez completados los trabajos presentados hasta el capítulo 4 se había conseguido adquirir una visión parcial, por un lado, del origen y presencia de un COP clásico como el DDT en suelos del END del 2007 y 2008, y por otro, de la presencia de contaminantes emergentes como los PBDEs y el DP, pero en este caso en muestras más antiguas representadas por huevos de cigüeña blanca obtenidos en 1999 y 2001 en el END y en el 2005 en la región de Madrid. Con el objetivo de abordar una investigación más integral, tanto en el tiempo como en el número y tipo de contaminantes investigados, en el **quinto capítulo** se ha presentado un estudio global que aborda la evolución, o más específicamente, el cambio entre los extremos de un intervalo de tiempo, de contaminantes organohalogenados clásicos (PCBs, DDTs, y PCDD/Fs) y emergentes (PBDEs y DP) en dos áreas de marcadas diferencias en cuanto a sus influencias antropogénicas: el END, un área de especial protección e influenciada por actividades agrícolas, y la región de Madrid, de carácter urbano e industrial. Para ello, el estudio se centró en el análisis de todos los contaminantes mencionados en huevos infértiles de cigüeña blanca indicados en el capítulo anterior y en nuevas colecciones de huevos obtenidas del END en el 2010 y de la región de Madrid en el 2011. Las muestras de huevos recogidas en Doñana en los años 1999 y 2001 fueron consideradas como un único conjunto de huevos, denominado DNP 2000, tras comprobarse que estadísticamente no existía ninguna diferencia significativa para ninguno de los grupos de contaminantes considerados. Consiguientemente, se pudieron ofrecer resultados para

un intervalo aproximado de unos 10 años en el caso del END (DNP 2000/2010) y de 6 años en el caso de la región de Madrid (Madrid 2005/2011).

Los PCBs fueron detectados en el 100% de las muestras en consonancia con la elevada persistencia de estos contaminantes en matrices medioambientales, registrándose además perfiles de abundancia relativa para los distintos PCBs muy similares en todas las muestras estudiadas. Así por ejemplo, la predominancia de los congéneres más recalcitrantes como el PCB-153 y -180, que por la distribución de sus clorosustituciones muestran una elevada resistencia a la biodegradación y/o biotransformación, fue una constante hallada en todos los huevos analizados. No obstante, en términos de concentraciones absolutas se encontró un declive estadísticamente significativo de estos COP en ambas zonas, cuantificándose en un descenso de 5,98 veces en el caso del END y de 6,49 veces en el caso de la región de Madrid. Es interesante recalcar cómo la disminución de las concentraciones en el caso del END fue ligeramente inferior incluso cuando el intervalo de tiempo estudiado fuera mayor. Esto, sumado al hecho de que no se encontraran diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de DNP 2000/Madrid 2005 y DNP 2010/Madrid 2011 parece poner de relieve una situación singular de contaminación por PCBs en el END que concuerda con datos de los pocos estudios existentes en el misma zona, y para la que no se han encontrado explicaciones consistentes más allá de la influencia contaminante del Guadalquivir en su paso por el END.

Los DDTs también fueron encontrados en el 100% de las muestras de huevos infértiles de cigüeña blanca, particularmente el  $p,p'$ -DDT y  $p,p'$ -DDE, al igual que ocurrió con todos los suelos de cultivos obtenidos de la Comarca de Doñana en 2007 y 2008. Sin embargo, excepto para el año 2005 en Madrid, donde la contribución media del  $p,p'$ -DDT alcanzó casi un 30%, en el resto de los casos el contenido medio del  $p,p'$ -DDE fue como mínimo del 96% del contenido total de DDTs, no permitiendo por tanto inferir un empleo reciente del pesticida. Esto contrastaba con la situación descrita en los suelos de cultivo de la Comarca de Doñana, pero pudo explicarse en base a la conocida y favorecida degradación que el  $p,p'$ -DDT experimenta transformándose en sus principales metabolitos, y particularmente en el  $p,p'$ -DDE, a medida que se progresa en una red trófica dada. Este hecho junto con los muy altos niveles de  $p,p'$ -DDE registrados en los huevos de cigüeña del END, y las relativas bajas concentraciones encontradas en

los citados suelos, enmascararon la detección de un posible uso reciente del DDT en los huevos analizados del END en el 2010. También se registró en ambas áreas un descenso en los niveles de DDTs, aunque de menor magnitud que el medido para los PCBs, y sin ser estadísticamente significativo, pudiéndose cuantificar en 2,25 veces para el END y en 4,48 veces para la región de Madrid. Las mayores concentraciones de DDTs en general y de *p,p'*-DDE en particular presentes en Doñana, en comparación con Madrid, justificarían en gran medida el menor descenso observado en el área protegida/agrícola aun considerando un intervalo de tiempo mayor.

Al igual que con los demás COP clásicos, las PCDD/Fs también se detectaron en todas las muestras de ambas localidades en todos los años estudiados, con una contribución siempre predominante de las dioxinas sobre los furanos. Los perfiles de abundancia de los diferentes congéneres presentaron una notable variabilidad, no permitiendo identificar un tipo de fuente concreta y/o común, siendo la dioxina octaclorada el congénere siempre mayoritario excepto en el año 2010 en el END. Siguiendo una tendencia similar a la de los PCBs y DDTs, se observó y cuantificó una disminución de las concentraciones totales de dioxinas y furanos de 3,70 veces en el END y 7,27 veces en la región de Madrid. La disminución tan acusada en muestras de Madrid en el periodo de tiempo estudiado tuvo como consecuencia directa el que las concentraciones medidas en el 2010 en el END y en el 2011 en Madrid fueran muy similares, no pudiéndose detectar diferencias estadísticamente significativas entre ambas. Este hecho contrasta llamativamente con la comparación entre Madrid 2005 y de Doñana en el 2000, en donde los niveles de PCDD/Fs en la zona urbana básicamente doblaban a los medidos en el END. Consecuentemente, los resultados obtenidos indicaron un aumento en la eficacia de medidas encaminadas a la reducción de emisiones de este tipo de contaminantes, tales como las aplicadas en sistemas de combustión del tráfico rodado, en las incineradoras de residuos, etc.

Los PBDEs fueron encontrados siempre como el tercer grupo de contaminantes más abundante, excepto en Madrid en el año 2011, donde se detectaron a niveles similares a los DDTs aunque considerablemente inferiores a los de PCBs. Aunque los perfiles de abundancia relativa de los distintos PBDEs mostraron una cierta variabilidad entre localidades y años, la predominancia de los congéneres de alto grado de bromación (octa-, nona-, y el deca) fue clara. Concretamente, el BDE-209 fue cuantificado siempre



como el congénere mayoritario, incrementándose asimismo su contribución relativa en ambas localidades en función del tiempo: de un 44,1% en el 2000 en el END a un 61,0% en el 2010, y de un 38,6% en el 2005 en Madrid a un 68,1% en el 2011. Esta circunstancia podría explicarse en base al uso continuado y creciente de la mezcla deca-BDE, especialmente tras la prohibición de las mezclas penta- y octa-BDE en el 2004. En consonancia con estos datos y dado el carácter emergente de estos contaminantes, se encuentra el crecimiento de sus concentraciones totales medido en ambas localidades y cuantificado en 6,04 veces para el END y 3,72 veces para la región de Madrid. Es interesante observar cómo el incremento en Doñana fue considerablemente mayor que el observado para el área urbana, conduciendo a una equiparación de las concentraciones de estos retardantes de llama en el 2010 en el END con aquellas registradas en Madrid 2005. Esta divergencia en la magnitud de los incrementos registrados para cada localidad, además de poder verse influenciada, una vez más, por la diferencia de años considerada entre ambas, podría justificarse en función de una menor existencia de fuentes de emisión concretas en la región de Madrid, dadas las regulaciones parciales imperantes sobre la deca-BDE desde el 2008. Al igual que se describió para las colecciones de huevos de DNP 2000 y Madrid 2005, también en DNP 2010 y Madrid 2011 se detectó el BDE-202, esta vez en el 100% de las muestras, y el perfil de abundancia  $BDE-207 > BDE-208 > BDE-206$ ; considerados ambos indicadores de degradación y/o biotransformación del BDE-209. Este hecho se suma a las evidencias empíricas obtenidas por diversos autores en relación a la degradación medioambiental y a la biotransformación que el BDE-209 puede experimentar en congéneres progresivamente menos bromados y más tóxicos. La sugerida degradación del BDE-209 refuerza la necesidad de ampliar la regulación existente sobre la deca-BDE, de amplia utilización y aplicación a nivel mundial y cuyo empleo en Europa sólo está prohibido desde el 2008 y sólo en componentes eléctricos y electrónicos.

El DP también fue encontrado en todas las muestras analizadas, incluyendo al DP-1Cl el cual pasó a hallarse con una frecuencia creciente: desde un aproximado 10% de las muestras de DNP 2000 y Madrid 2005, a un 30% de las de Doñana en 2010 y al 100% de las muestras de Madrid 2011. Las concentraciones del DP fueron en todas las localidades y años un orden de magnitud inferior a las halladas para PBDEs en concordancia con el menor uso y distribución de este retardante de llama en

comparación con los polibromodifenil éteres. Sin embargo, se observaron incrementos importantes de este contaminante emergente en las dos áreas de estudio, cuantificándose en 5,89 veces para el END y en 10,2 veces para la región de Madrid.

Es importante recalcar que esta ha sido la primera vez en la que se ha estudiado, si bien de manera limitada, una evolución temporal del contenido de DP en biota terrestre. Los incrementos de PBDEs y DP al comparar los extremos en 10 años en Doñana fueron muy similares, poniendo probablemente de manifiesto una situación de equilibrio derivada de la existencia de fuentes difusas y comunes para ambos tipos de contaminantes. Por el contrario, en la región de Madrid en un intervalo de seis años el aumento de los niveles del DP prácticamente triplicó al de los PBDEs. Este hecho parecería indicar un notable aumento del uso del DP a la par, o no, de una posible moderación de fuentes de PBDEs en esta área tal y como se ha sugerido anteriormente. Asimismo, la posibilidad de existencia de fuentes de contaminación por DP en una región como Madrid merecería ser considerada y estudiada en profundidad a una escala más global. En relación a un posible enriquecimiento de uno de los dos isómeros del DP, las  $f_{anti}$  medidas en las muestras de Doñana 2010 ( $0,79 \pm 0,03$ ) y Madrid 2011 ( $0,76 \pm 0,05$ ) fueron muy similares entre si al igual que lo fueron las de DNP 2000 ( $0,66 \pm 0,12$ ) y Madrid 2005 ( $0,64 \pm 0,07$ ). Todos los valores hallados de  $f_{anti}$  estuvieron comprendidos en el intervalo asociado al DP técnico, por lo que no pudo inferirse ningún tipo de enriquecimiento estereoselectivo claro. No obstante, es llamativa la transición conjunta a lo largo de diferentes intervalos de tiempo desde un valor común en torno a  $\approx 0,65$  para ambas localidades estudiadas hasta otro valor común en torno a  $\approx 0,77$ , lo que, quizás, puede relacionarse con variaciones registradas en las propias mezclas comerciales de DP tal y como han sugerido determinados autores.

Con el objetivo específico de poder interpretar los niveles de los contaminantes investigados en los huevos de cigüeña blanca con datos empíricos que pudieran relacionarse con el tipo de dieta de los especímenes de cada área, se han determinado las concentraciones de los isótopos estables de N y C y sus relaciones isotópicas. De los resultados obtenidos se deducen una serie de conclusiones interesantes en las áreas estudiadas. Así, los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  y  $\delta^{13}\text{C}$  obtenidos fueron significativamente distintos desde un punto de vista estadístico en función del área muestreada, pero no en función del año, lo que parece sugerir que la dieta de ambas colonias de *Ciconia ciconia* se ha

mantenido de manera relativamente similar a lo largo de los periodos de tiempo investigados. Este hecho cobra especial relevancia, dado que permite asociar cambios significativos en la concentración de los contaminantes estudiados con cambios en las concentraciones medioambientales de los mismos, y no con modificaciones drásticas en la dieta de esta especie empleada como bioindicadora a lo largo del tiempo. Esto, a su vez, permite reforzar el argumento de la validez de la cigüeña blanca como organismo bioindicador adecuado para las áreas de estudio elegidas.

En general, los ejemplares de Doñana mostraron una mayor variabilidad tanto en sus valores de  $\delta^{15}\text{N}$  como de  $\delta^{13}\text{C}$ ; variabilidad presumiblemente asociada a la contribución de múltiples recursos naturales en su alimentación y en contraposición a la dieta de las cigüeñas de Madrid, más basada en la explotación de vertederos. Un número muy reducido de correlaciones se pudieron observar entre  $\delta^{15}\text{N}$  y  $\delta^{13}\text{C}$  con los niveles de los contaminantes estudiados en cada grupo de muestras y año. Así, pese a la conocida tendencia de biomagnificación, incluso a nivel intra-especie, de la mayor parte de los contaminantes estudiados, únicamente cinco correlaciones significativas y positivas fueron determinadas entre  $\delta^{15}\text{N}$  y concretamente los niveles de DDTs, PCDD/Fs y DP de ambas áreas. El DP, cuyo potencial de biomagnificación es a día de hoy incierto, se correlacionó positivamente y de forma significativa con  $\delta^{15}\text{N}$  pero únicamente en las muestras de cigüeñas de Madrid. Inesperadamente se hallaron dos correlaciones significativas pero negativas entre  $\delta^{15}\text{N}$  y PCDD/Fs para Madrid en el año 2011, y  $\delta^{15}\text{N}$  y DP para DNP en el año 2010, las cuales son de difícil explicación y se postula que puedan deberse a fuentes concretas y locales de contaminación. Por otro lado,  $\delta^{13}\text{C}$  sólo se correlacionó significativa y positivamente con los niveles de PCBs en Madrid 2005.

En resumen, los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  y especialmente de  $\delta^{13}\text{C}$  no se correlacionaron de manera clara con el grado y tipo de contaminación observado en las muestras analizadas. No obstante los valores obtenidos de dichas relaciones isotópicas proporcionaron información de utilidad para apoyar la hipótesis inicial de dietas diferenciadas y mantenidas a lo largo de los años de estudio para la cigüeña blanca en función del área investigada.

Finalmente, dentro de las limitaciones de datos existentes a efectos comparativos, se evaluaron las potenciales implicaciones toxicológicas derivadas de la carga de los

contaminantes encontrados en los huevos analizados en base a valores conocidos para especies similares, debido a la inexistencia de valores umbral específicos para la cigüeña blanca. De esta forma se calcularon los TEQ totales correspondientes a la suma de aquellos COP con un valor de TEF asociado, a saber, PCDD/Fs y PCBs no-*orto* y mono-*orto*, encontrándose que un 29% de los huevos del END en el 2000 superaron el valor NOEL de 37 pg TEQ/g peso fresco (p.f.) asociado a la inducción de la isoforma CYP1A del citocromo P450 en águila pescadora, mientras que un 10% de los huevos superaron el NOEL de 100 pg TEQ/g p.f. determinado para el águila de cabeza calva. Por el contrario, todos los huevos de END 2010 o de Madrid 2005 y 2011 presentaron valores de TEQ por debajo del límite inferior de 37 pg TEQ<sub>WHO</sub>/g p.f., en concordancia con la disminución en el tiempo de las concentraciones medidas para todos estos contaminantes organohalogenados clásicos.

Pese a los altos niveles de PCBs detectados en algunas muestras y especialmente del año 2000 en el END, ninguna presentó un valor igual o superior al umbral de 4.000 ng/g p.f., ligado a una reducida tasa de eclosión de huevos, casos de mortalidad embrionaria y a deformidades en pollos de distintas especies. De similar manera, el intervalo crítico de concentraciones de *p,p'*-DDE, de 5.100 – 10.000 ng/g p.f., asociado con una reducción del número de huevos eclosionados en ejemplares de garza verdosa tampoco fue alcanzado en ninguna muestra de cigüeña blanca estudiada. En relación a los PBDEs, los niveles totales detectados en todas las muestras de ambas áreas fueron siempre uno o dos órdenes de magnitud inferiores a los valores de referencia establecidos para el águila pescadora (1.000 ng/g p.f.) o el cernícalo americano (1.800 ng/g p.f.) como causantes de una disminución de su éxito reproductor. Actualmente es muy poco lo que se conoce sobre la toxicidad del DP, pero los escasos estudios existentes sobre los efectos tóxicos de estos compuestos en aves parecen sugerir una falta de toxicidad aguda o crónica a niveles considerablemente superiores a los encontrados en las muestras investigadas.

En conclusión, en base a los datos aquí presentados y discutidos, no parece que ninguno de los grupos de contaminantes considerados presenten, de manera individual, un peligro claro para las poblaciones de las cigüeñas blancas de Doñana o Madrid. No obstante, no es oportuno realizar afirmaciones categóricas en ese sentido debido al hecho de que diferentes xenobióticos puedan actuar de forma aditiva e incluso sinérgica,

sumado a la falta de datos sobre la toxicidad específica que estos compuestos ejercen sobre la especie bioindicadora seleccionada para este estudio en particular y al notable desconocimiento sobre la toxicidad del DP en general.

*Capítulo 7*  
*Conclusiones*



## 7. CONCLUSIONES

---

De los resultados obtenidos tras la investigación desarrollada y descrita a lo largo de los diferentes capítulos que integran la presente memoria, se derivan las siguientes conclusiones específicas:

1. Se ha desarrollado y optimizado un método cromatográfico basado en la técnica *heart-cutting* MDGC que permite la separación satisfactoria de los dos enantiómeros del *o,p'*-DDT.
  - 1.1. La inyección de volúmenes de 4  $\mu\text{L}$  mediante la utilización de una rampa de temperatura y un pulso de presión empleando un inyector PTV, además del control adecuado del resto de las condiciones del sistema cromatográfico, han permitido mantener la degradación del DDT controlada por debajo del 15%.
  - 1.2. Como resultado de lo anterior también se ha alcanzado un alto nivel de sensibilidad traducido en un LOD y un LOQ de 2,1  $\text{pg}/\mu\text{L}$  y 7,1  $\text{pg}/\mu\text{L}$ , respectivamente, con un intervalo de linealidad de 7,1 a 1.000  $\text{pg}/\mu\text{L}$ .
  - 1.3. Las EF del *o,p'*-DDT pudieron ser medidas con repetibilidad y reproducibilidad satisfactorias, caracterizadas por RSD menores del 2,0% y del 3,2%, respectivamente.
  
2. Se ha evaluado el estado de contaminación por DDTs de suelos de cultivo de un área con una gran actividad agrícola como es la Comarca de Doñana en muestras recogidas en las primaveras de los años 2007 y 2008.
  - 2.1. El *p,p'*-DDT y *p,p'*-DDE fueron detectados en todas los suelos analizados, aunque en concentraciones menores, de hasta dos órdenes de magnitud inferiores, a las documentadas en suelos muestreados en el entorno de Doñana en los años 90.
  - 2.2. Treinta años después de la prohibición del DDT en España, un posible uso relativamente reciente y por tanto ilegal de este pesticida, aunque siempre en concentraciones bajas o moderadas, pudo ser detectado en base a la relación



$R_{p,p'/p,p'} = ([p,p'-DDE] + [p,p'-DDD]) / [p,p'-DDT]$ . Esta ratio mostró valores menores a 1 en un porcentaje aproximado del 17% de los suelos analizados.

- 2.3. En base a la relación  $R_{o,p'/p,p'} = [o,p'-DDT] / [p,p'-DDT]$ , los residuos de DDTs encontrados en hasta un 27% de los suelos analizados parecieron provenir del uso del pesticida dicofol, lo cual además se confirmó con el hallazgo de su presencia en suelos de cítricos, algodón y fresas, siendo todos ellos cultivos en donde el empleo de dicofol estaba autorizado en el momento de su estudio.
  - 2.4. Las EF del *o,p'*-DDT determinadas no proporcionaron una medida cuantificable de la degradación global del DDT en los suelos de cultivo estudiados.
3. Empleando la cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) como especie bioindicadora, se ha determinado, por vez primera, la presencia de PBDEs en el END en muestras de huevos infértiles de dicha especie recogidos en los años 1999 y 2001.
    - 3.1. Los resultados obtenidos fueron novedosos no sólo por ser la primera vez que se documentaban en el END, sino también por encontrar una predominancia del BDE-209 y demás congéneres de alto grado de bromación (octa- y nona-) en una especie mayoritariamente terrestre que ocupa una alta posición en sus cadenas tróficas. Una situación similar se encontró para muestras de huevos de la misma especie recogidos en la región de Madrid en el 2005, en la que los PBDEs fueron detectados en niveles varias veces más altos, acorde con el mayor carácter urbano e industrial de esta zona de estudio. De manera importante, estos resultados contribuyen a afianzar la hipótesis sobre la biodisponibilidad y capacidad de bioacumulación del BDE-209 en biota, ambas cuestionadas hasta tiempos relativamente recientes.
    - 3.2. La detección del BDE-202 junto con el perfil de abundancia BDE-207 > BDE-208 > BDE-206 observado, tanto en huevos de cigüeña de Doñana como de Madrid, pueden ser indicadores de la degradación abiótica y/o biótica del BDE-209 en congéneres menos bromados y a su vez más biodisponibles y tóxicos. Los indicios combinados en relación a la bioacumulación y posible degradación del BDE-209 obtenidos en esta investigación parecen sugerir la necesidad de una mayor regulación en el empleo, a nivel mundial y específicamente europeo, de la mezcla deca-BDE.

4. Se ha determinado, por primera vez, en las mismas muestras evaluadas para PBDEs, la presencia de DP en el END y su entorno al igual que en la región de Madrid, encontrándose concentraciones generalmente un orden de magnitud inferior a las de los PBDEs en todas las muestras analizadas.
  - 4.1. La mayor presencia del DP en huevos de Madrid con respecto a aquellos de Doñana parece acorde con el uso de este retardante de llama en bienes de consumo, muchos de ellos de carácter eléctrico/electrónico, mobiliario, etc, más asociados a entornos urbanos como la región de Madrid, en contraste con un área de menor influencia urbana como el END.
  - 4.2. La presencia del DP-1Cl, postulado como producto de degradación del DP, fue hallada en aproximadamente un 10% de las muestras de ambas zonas de estudio, y documentada por primera vez en muestras de biota.
  - 4.3. Las *fanti* obtenidas presentaron valores pertenecientes al intervalo referido para el DP técnico, no pudiendo, en consecuencia, determinarse un enriquecimiento estereoselectivo claro en los huevos de cigüeña.
  
5. La presencia y cambio en intervalos concretos de tiempo, para los COP clásicos (PCBs, DDTs y PCDD/Fs), y los contaminantes organohalogenados emergentes (PBDEs y DP) evaluados mediante el empleo de nuevas colecciones de huevos infértiles de cigüeña blanca de Doñana en 2010 y de Madrid en 2011, reflejó que, en términos de concentraciones absolutas, la abundancia de los contaminantes estudiados en el END fue DDTs>PCBs>PBDEs>DP>PCDD/Fs mientras que en la región de Madrid el orden de los mismos fue PCBs>PBDEs≈DDTs>DP>PCDD/Fs.
  - 5.1. Se ha observado una disminución de los niveles de todos los COP clásicos en ambas áreas, acorde con las prohibiciones imperantes en cuanto a su fabricación y uso. El descenso en el END entre el año 2000 y el 2010 fue más acusado para los PCBs, seguidos de PCDD/Fs y finalmente de los DDTs. En cambio, en Madrid el periodo desde el año 2005 al 2011 estuvo protagonizado por un mayor descenso en las concentraciones de PCDD/Fs, seguido por los PCBs y en último lugar y de manera común a Doñana, por los DDTs.

- 5.1.1. La ausencia de diferencias significativas en las concentraciones de PCBs cuando se comparan el END y la región de Madrid a principios del año 2000 o pasada una década, puso de manifiesto una situación de contaminación singular por este tipo de compuestos en un área de gran valor ecológico y socioeconómico como es el END y su entorno. No existen explicaciones concluyentes en cuanto a los altos niveles de PCBs encontrados, parejos a los de la región de Madrid, un área sometida a una mayor influencia urbana e industrial. Este hecho justifica la necesidad de continuar con una investigación más exhaustiva dirigida a encontrar las fuentes concretas de dicha contaminación.
  - 5.1.2. La disminución acusada de PCDD/Fs, especialmente en la región de Madrid, pone de relieve un aumento de la eficacia de aquellas medidas encaminadas a la reducción de las emisiones de estos contaminantes.
  - 5.1.3. El menor descenso de contaminación observado para los DDTs, especialmente en el END y su Comarca, puede justificarse por su gran persistencia combinada con su intensa utilización en las décadas pasadas. No obstante, usos recientes e ilegales del mismo, aunque en cantidades pequeñas o moderadas, no pueden descartarse en función de la situación detectada en suelos de cultivo de la Comarca de Doñana.
- 5.2. Se ha observado, también, un incremento de los niveles de los contaminantes emergentes en ambas áreas de estudio. El aumento de concentraciones en el END desde principios del 2000 hasta una década después, fue análogo tanto para PBDEs como para el DP. Por el contrario, el aumento del DP fue del orden de tres veces mayor que el de PBDEs en la región de Madrid comparando los niveles del año 2011 frente a los del año 2005.
    - 5.2.1. El BDE-209 fue siempre el congénere predominante, intensificándose dicha predominancia a lo largo de los intervalos de tiempo estudiados tanto en el END como en la región de Madrid, en concordancia con el mayor uso, en general, de la deca-BDE tras la prohibición en el 2004 de las mezclas penta- y octa-BDE.

- 5.2.2. El DP fue hallado en el 100% de las muestras analizadas, aportándose por primera vez datos sobre su evolución en un intervalo de tiempo en biota terrestre de zonas conocidas. Dicha evolución se concretó en un incremento notable de los niveles de DP en el END y particularmente en la región de Madrid, lo que además de poner de manifiesto su naturaleza ubicua también parece indicar una importante proliferación del uso de este compuesto. Es destacable que este retardante de llama, cuya presencia en el medio ambiente había pasado inadvertida hasta el 2006, actualmente está considerado como un posible reemplazo de la mezcla deca-BDE en Europa.
- 5.2.3. El DP-1Cl fue hallado en un porcentaje creciente de muestras a lo largo de los intervalos de tiempo estudiados en consonancia con el aumento de concentraciones del DP.
- 5.2.4. No pudo ser determinado ningún enriquecimiento estereoselectivo para el DP en función de los valores obtenidos para las  $f_{anti}$ . Sin embargo, una variación conjunta de los valores de las mismas se detectó en las muestras del END y de la región de Madrid a lo largo del tiempo, lo cual podría explicarse en función de variaciones en la composición de las mezclas técnicas de DP.
- 5.3. Los valores de  $\delta^{15}N$  y  $\delta^{13}C$  mostraron un mantenimiento del mismo tipo de dieta en las cigüeñas de las dos áreas investigadas a lo largo de los intervalos de tiempo considerados. Este hecho refuerza y consolida los argumentos del empleo de la cigüeña blanca como organismo bioindicador en las áreas y tiempos estudiados, sabiendo que cambios medibles en los niveles de contaminantes en sus huevos no estarían ligados a cambios concretos en su alimentación.
- 5.4. En general los valores de  $\delta^{15}N$ , y muy especialmente los de  $\delta^{13}C$ , obtenidos no han contribuido a mejorar la interpretación del grado de contaminación encontrada, lo que podría justificarse, al menos parcialmente, en base a la probable heterogeneidad en el tipo, grado y distribución espacial de las fuentes de los contaminantes considerados en ambas áreas investigadas.

5.5. La carga tóxica asociada a la presencia de contaminantes organohalogenados clásicos disminuyó en concordancia con el descenso de sus concentraciones durante los intervalos de tiempo investigados. Pese al aumento de las concentraciones de los contaminantes emergentes, con la escasa información científica disponible a día de hoy en relación a su potencial tóxico, no parece que los niveles de PBDEs o de DP puedan representar por si solos un peligro para las poblaciones de cigüeña blanca estudiadas en Doñana o Madrid. No obstante, es importante recalcar que la exposición en el medio ambiente se produce a un cóctel de todos los contaminantes al mismo tiempo, cuyos efectos tóxicos pueden ser aditivos e incluso sinérgicos; por consiguiente, la presencia de los contaminantes estudiados debe ser considerada como un posible elemento de estrés añadido en las estrategias de conservación, no sólo de estas especies, sino de todas aquellas que constituyen el ecosistema al que pertenecen.

De forma global, las conclusiones generales que se derivan de toda la investigación realizadas en esta memoria podrían sintetizarse en los siguientes puntos:

- Esta tesis pone a disposición de la Comunidad Científica una aproximación analítica valiosa, basada en la *heart-cutting* MDGC, para poder llevar a cabo estudios más detallados y precisos sobre ciertos contaminantes de particular importancia por sus conocidos efectos tóxicos, cómo es el caso del DDT. Asimismo, su aplicación práctica se ha demostrado en el estudio sistemático llevado a cabo en una gran variedad de suelos de cultivo de la Comarca de Doñana.
- El trabajo en su totalidad aporta una importante colección de datos nuevos que actualizan el estado del conocimiento sobre la contaminación por algunos COP que, siendo ya considerados como clásicos (PCBs, DDTs, PCDD/Fs), a día de hoy, no pueden perderse definitivamente de vista. Además, es particularmente relevante y novedosa la información aportada sobre los contaminantes emergentes en relación a un entorno de elevada protección por su importancia ecológica como es el END;

contaminantes que actualmente despiertan un gran interés y frecuentemente una gran preocupación por el notable desconocimiento aún existente acerca de los mismos.

- La metodología, basada en el empleo de una especie bioindicadora como la cigüeña blanca, demuestra ser válida, de gran utilidad y recomendable para continuar con futuros programas de investigación sobre la problemática ambiental que puede representar la presencia en el medio de todos los contaminantes estudiados.
  
- En conjunto, las investigaciones llevadas a cabo representan una valiosa herramienta de información para los gestores de espacios protegidos o naturales. La contaminación por compuestos organohalogenados es una realidad que puede llegar a tener influencias negativas en el medio natural por su capacidad de transferirse a lo largo de todos los eslabones de las redes tróficas, cuyo máximo exponente, desde un punto de vista egocéntrico, es inevitablemente el ser humano. Es por ello fundamental contar con estos datos, y con el conocimiento del modo de conseguirlos, para llevar a cabo un seguimiento de los mismos con estrategias de estudio adecuadas.