



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIEROS
INDUSTRIALES VALENCIA

Curso Académico:

AGRADECIMIENTOS

“A Laura”

RESUMEN

En los últimos años se está poniendo el foco en la detección y eliminación de los llamados contaminantes emergentes de las aguas residuales. Estos, aunque suelen estar presentes en bajas concentraciones, se caracterizan por su baja biodegradabilidad. Este hecho hace que puedan suponer un problema en el medio receptor a largo plazo. Entre estos contaminantes se encuentran, por ejemplo, muchos medicamentos de amplio uso, como es el caso del norfloxacin, un antibiótico usado en infecciones urinarias.

La UE tiene catalogadas diferentes técnicas para la determinación de la toxicidad de estos contaminantes, pero aboga por la búsqueda y el desarrollo de nuevas técnicas, haciendo hincapié en el hecho de que no supongan el uso de animales. Por otro lado, continúan desarrollándose nuevas tecnologías, y optimizándose las existentes, para la eliminación de los contaminantes emergentes en las aguas residuales. Una de ellas es la oxidación electroquímica. La aplicación de esta técnica requiere la presencia de un electrolito soporte que aporte conductividad y puede implicar modificaciones del pH de la disolución.

En concordancia con lo expuesto, en este trabajo se van a poner en práctica dos métodos para medir la toxicidad del norfloxacin: uno mediante la siembra de semillas de lechuga ("lactuca sativa"), y otro mediante el uso del equipo Microtox con bacterias luminiscentes. En concreto, se procederá al estudio de diferentes variables como son la concentración del norfloxacin (el contaminante objeto de estudio), el pH o la concentración de electrolito soporte, y se analizará su efecto sobre la toxicidad de la muestra. Con los resultados obtenidos experimentalmente, y con la ayuda de herramientas estadísticas, se determinarán los umbrales de toxicidad de la muestra objeto de estudio. Por último, en este trabajo, se analizará la toxicidad final de muestras reales de norfloxacin sometidas a un proceso de oxidación electroquímica.

Palabras Clave: Toxicidad, norfloxacin, oxidación electroquímica, contaminantes emergentes, "lactuca sativa", Microtox

RESUM

Als últims anys s'està posant el focus en la detecció i eliminació dels anomenats contaminants emergents de les aigües residuals. Aquests, encara que solen estar presents en baixes concentracions, es caracteritzen per la seua baixa biodegradabilitat. Aquest fet fa que puguin suposar un problema en el medi receptor a llarg termini. Entre aquests contaminants es troben, per exemple, molts medicaments d'ús ampli, com és el cas del norfloxacin, un antibiòtic usat en infeccions urinàries.

La UE té catalogades diferents tècniques per a la determinació de la toxicitat d'aquests contaminants, però advoca per la búsqueda i el desenvolupament de noves tècniques, fent èmfasi al fet que no suposen l'ús d'animals. D'altra banda, continuen desenvolupant-se noves tecnologies, i optimitzant-se les existents, per a l'eliminació dels contaminants emergents a les aigües residuals. Una d'elles és l'oxidació electroquímica. L'aplicació d'aquesta tècnica requereix la presència d'un electròlit suport que aporte conductivitat i pot implicar modificacions del pH de la dissolució.

En concordància amb allò exposat, en aquest treball es van a posar en pràctica dos mètodes per a mesurar la toxicitat del norfloxacin: un mitjançant la sembra de llavors de lletuga ("lactuca sativa"), i altre mitjançant l'ús de l'equip Microtox amb bacteris luminescents. En concret, es procedirà a l'estudi de diferents variables com són la concentració del norfloxacin (el contaminant objecte d'estudi), el pH o la concentració de electròlit suport, i s'analitzarà el seu efecte sobre la toxicitat de la mostra. Amb els resultats obtinguts experimentalment, i amb l'ajuda de ferramentes estadístiques, es determinaran els llindars de toxicitat de la mostra objecte d'estudi. Per últim, en aquest treball, s'analitzarà la toxicitat final de mostres reals de norfloxacin sotmeses a un procés d'oxidació electroquímica

Paraules Clau: Toxicitat, norfloxacin, oxidació electroquímica, contaminants emergents, "lactuca sativa", Microtox

ABSTRACT

In recent years, the focus has been on detecting and eliminating of the emerging pollutants of the wastewater. Although they are usually present in low concentrations, they are characterized by their low biodegradability. This fact means that they can be a problem in the long-term if they are received by the environment. For example, among these contaminants are many medicines, such as norfloxacin, an antibiotic used in urinary tract infections.

The EU has cataloged different techniques for the determination of the toxicity of these pollutants, but advocates the search and development of new techniques, emphasizing the fact that they do not involve the use of animals. On the other hand, new technologies continue to be developed, and existing ones are being optimized for the elimination of emerging pollutants in wastewater. One of them is electrochemical oxidation. The application of this technique requires the presence of a supporting electrolyte that provides conductivity and may involve changes in the pH of the solution.

In agreement with the above, this work will put into practice two methods to measure the toxicity of norfloxacin: one by sowing lettuce seeds ("lactuca sativa"), and another by using the Microtox equipment with luminescent bacteria. In particular, we will proceed to the study of different variables such as the concentration of norfloxacin (the pollutant under study), the pH or the concentration of electrolyte support, and its effect on the toxicity of the sample will be analyzed. With the results obtained experimentally, and the toxicity thresholds of the sample under study will be determined with the help of statistical tools. Finally, in this work, the final toxicity of real samples of norfloxacin subjected to an electrochemical oxidation process will be analyzed.

Key Words: Toxicity, norfloxacin, electrochemical oxidation, emerging contaminants, "lactuca sativa", Microtox

DOCUMENTOS CONTENIDOS EN EL TFG

- I. Memoria
- II. Presupuesto

ÍNDICE DE LA MEMORIA

1. JUSTIFICACIÓN
2. OBJETIVOS
3. INTRODUCCIÓN TEÓRICA
 - 3.1. Contaminantes emergentes
 - 3.1.1. Tipos de contaminantes emergentes
 - 3.1.2. Tratamientos para los contaminantes emergentes
 - 3.2. Norfloxacin
 - 3.3. Oxidación electroquímica
 - 3.4. Toxicidad
 - 3.4.1. Métodos para medir la toxicidad
 - 3.5. Análisis estadístico
 - 3.5.1. Valor-p (*p-value*)
4. DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA EXPERIMENTAL
 - 4.1. Medición y ajuste del pH
 - 4.1.1. Introducción
 - 4.1.2. Medición y ajuste del pH con papel indicador
 - 4.1.3. Medición y ajuste del pH con un pH-metro
 - 4.2. Preparación de la disolución madre de norfloxacin
 - 4.2.1. Introducción
 - 4.2.2. Materiales y equipos
 - 4.2.3. Descripción
 - 4.3. Obtención de la concentración real de norfloxacin
 - 4.3.1. Introducción
 - 4.3.2. Materiales y equipos
 - 4.3.3. Descripción
 - 4.3.4. Resultados obtenidos para recta de calibrado del norfloxacin
 - 4.4. Ensayo estático de toxicidad aguda en semillas de lechuga "lactuca sativa"
 - 4.4.1. Introducción
 - 4.4.2. Antecedentes y primeros ensayos
 - 4.4.3. Materiales y equipos
 - 4.4.4. Condiciones de la experimentación
 - 4.4.5. Descripción
 - 4.4.6. Procesamiento de datos
 - 4.4.7. Ensayos realizados
 - 4.5. Ensayo de toxicidad a través del fenómeno de bioluminiscencia con el equipo Microtox
 - 4.5.1. Introducción
 - 4.5.2. Materiales y equipos

- 4.5.3. Condiciones de la experimentación
 - 4.5.4. Descripción
 - 4.5.5. Ensayos realizados
- 5. EXPOSICIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS
 - 5.1. Efecto del pH
 - 5.2. Efecto de la concentración del electrolito soporte: Na_2SO_4
 - 5.3. Efecto de la concentración de norfloxacin
 - 5.4. Efecto conjunto de la concentración de norfloxacin y Na_2SO_4
 - 5.5. Análisis estadístico con STATGRAPHICS
 - 5.6. Toxicidad de las muestras tratadas electroquímicamente
 - 6. CONCLUSIONES
 - 7. BIBLIOGRAFÍA

ÍNDICE DEL PRESUPUESTO

- 1. INTRODUCCIÓN
- 2. MATERIAL DE LABORATORIO Y REACTIVOS
- 3. EQUIPOS
- 4. LICENCIAS DE SOFTWARE
- 5. MANO DE OBRA
- 6. PRESUPUESTO FINAL

I. MEMORIA

ÍNDICE

1. JUSTIFICACIÓN.....	5
2. OBJETIVOS.....	7
3. INTRODUCCIÓN TEÓRICA.....	8
3.1. Contaminantes emergentes.....	8
3.1.1. Tipos de contaminantes emergentes.....	8
3.1.2. Tratamientos para los contaminantes emergentes.....	11
3.2. Norfloxacin.....	12
3.3. Oxidación electroquímica.....	13
3.4. Toxicidad.....	14
3.4.1. Métodos para medir la toxicidad.....	15
3.5. Análisis estadístico.....	16
3.5.1. Valor-p (<i>p-value</i>).....	16
4. DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	18
4.1. Medición y ajuste del pH.....	18
4.1.1. Introducción.....	18
4.1.2. Medición y ajuste del pH con papel indicador.....	18
4.1.3. Medición y ajuste del pH con un pH-metro.....	19
4.2. Preparación de la disolución madre de norfloxacin.....	22
4.2.1. Introducción.....	22
4.2.2. Materiales y equipos.....	22
4.2.3. Descripción.....	23
4.3. Obtención de la concentración real de norfloxacin.....	24
4.3.1. Introducción.....	24
4.3.2. Materiales y equipos.....	24
4.3.3. Descripción.....	25
4.3.4. Resultados obtenidos para recta de calibrado del norfloxacin.....	25
4.4. Ensayo estático de toxicidad aguda en semillas de lechuga “ <i>lactuca sativa</i> ”.....	29
4.4.1. Introducción.....	29
4.4.2. Antecedentes y primeros ensayos.....	29
4.4.3. Materiales y equipos.....	30
4.4.4. Condiciones de la experimentación.....	31
4.4.5. Descripción.....	31
4.4.6. Procesamiento de datos.....	35
4.4.7. Ensayos realizados.....	38
4.5. Ensayo de toxicidad a través del fenómeno de bioluminiscencia con el equipo Microtox.....	40
4.5.1. Introducción.....	40
4.5.2. Materiales y equipos.....	41
4.5.3. Condiciones de la experimentación.....	41
4.5.4. Descripción.....	41
4.5.5. Ensayos realizados.....	43

5. EXPOSICIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	45
5.1. Efecto del pH.....	45
5.2. Efecto de la concentración del electrolito soporte: Na ₂ SO ₄	48
5.3. Efecto de la concentración de norfloxacin.....	51
5.4. Efecto conjunto de la concentración de norfloxacin y Na ₂ SO ₄	55
5.5. Análisis estadístico con STATGRAPHICS.....	68
5.6. Toxicidad de las muestras tratadas electroquímicamente.....	72
6. CONCLUSIONES.....	77
7. BIBLIOGRAFÍA.....	80

1. JUSTIFICACIÓN

El constante crecimiento de la población humana a lo largo de miles de años ha venido ligado a una evolución y desarrollo de las tecnologías dedicadas a producir los bienes necesarios para la supervivencia de la especie. Este hecho ha conllevado que con el paso del tiempo se fueran generando cada vez mayores cantidades de residuos. Puede que en los primeros pasos, estos residuos generados no fueran un problema, pero la realidad actual es que suponen un gran peligro para el medio ambiente y la vida.

En cuanto al crecimiento de la población humana (que genera los residuos) y a la cantidad de residuos generados, la revolución industrial supuso un punto de inflexión. A partir de ese momento empiezan a mejorar las condiciones de vida de las personas, la población aumenta y así los residuos urbanos que se generan. Por otro lado, las industrias se muestran como una gran fuente de producción de residuos y contaminantes, y en un primer momento sin ninguna preocupación por sus posibles efectos adversos.

En las últimas décadas se han constatado los efectos adversos de esta actividad industrial sobre el medio ambiente. Esto se ha visto reflejado en una amplia legislación local, estatal y europea sobre los compuestos contaminantes para el medio ambiente, y la gestión que se debe hacer sobre ellos. Como ejemplo se tiene la Directiva Europea "Directiva Marco del Agua" 2000/60/CE que regula el marco comunitario de la política de aguas, la Directiva Europea "EQSD" 2008/105/CE que regula las normas de calidad de la política de aguas, o la Directiva Europea 2008/98/CE sobre los residuos.

Todo lo expuesto hasta el momento hace que actualmente se estén concentrando muchos esfuerzos en buscar sistemas para evitar o minimizar la producción de residuos peligrosos, mejorar los sistemas para detectar su presencia, desarrollar métodos para eliminarlos totalmente y en caso de que no se pueda, que se haga de forma parcial, y optimizar los sistemas de gestionar de residuos, especialmente de los residuos peligrosos.

Dicho todo esto, es necesario remarcar que existe un grupo de sustancias contaminantes que no han sido casi estudiadas (origen, efectos, métodos de eliminación...) y que tampoco están contempladas en la legislación. Son los denominados contaminantes emergentes, grupo en el que se engloban nuevos contaminantes ligados a nuevas actividades industriales, y otros tipos de contaminantes ya existentes sobre los que no se ha centrado la atención por diferentes motivos (desconocimiento de efectos adversos, creencia de que existen en muy baja proporción...).

En los últimos años están apareciendo estudios sobre este tipo de sustancias, donde se está poniendo de relieve los graves efectos adversos que pueden provocar y que los sistemas de tratamiento de aguas tradicionales no son capaces de eliminarlos por completo. Este hecho es el que provoca que, aunque se produzcan en cantidades bajas, al no poder ser retenidos en las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), aparezcan concentraciones considerables en el medio ambiente, ya que están contenidos en los efluentes que vierten estas plantas de tratamiento al agua de cauces o al mar.

Los contaminantes emergentes son un grupo formado por una amalgama heterogénea de sustancias con orígenes y propiedades muy diferentes. Un tipo de estas sustancias a destacar son los productos farmacéuticos, ya que las aguas provenientes de los centros hospitalarios tienen una gran concentración de estas sustancias, y porque el consumo de medicamentos en el hogar es muy grande y va en aumento (ya sean recetados o por autoconsumo) y porque gran parte de estas sustancias y sus metabolitos no son retenidas o lo son parcialmente en las plantas de tratamiento de aguas residuales. Además, su presencia en las aguas está relacionada con diferentes efectos adversos sobre las personas y el medio ambiente. Como muestra de la preocupación que empiezan a causar estas sustancias, podemos citar que la Directiva Europea 2013/39/CE (que modifica las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE) tiene un apartado específico para los productos farmacéuticos.

Otra de las vías de estudio dentro de los contaminantes emergentes son los métodos que se pueden utilizar para eliminarlos. Las investigaciones recientes abarcan un gran abanico de métodos, que se diferencian entre ellos por los costes económicos de aplicación o por si son válidos para muchas o pocas sustancias.

En el presente trabajo se va a estudiar un contaminante emergente, concretamente el norfloxacin, un medicamento de amplio uso, de número CAS 70458-96-7 que la ECHA (European Chemical Agency) tiene catalogado como "corrosivo" y "peligroso para la salud". Y como método de tratamiento para dicho contaminante se ha escogido la oxidación electroquímica, un método que destaca por sus bajos costes de aplicación, y porque no necesita de la adición de productos químicos.

2. OBJETIVOS

La realización del presente Trabajo Final de Grado (a partir de ahora TFG) comprende los siguientes objetivos:

- Comprobar la idoneidad del ensayo estático de toxicidad aguda, a partir del cultivo de semillas de lechuga con efluentes contaminados, para el norfloxacin.
- Estudiar el efecto de diferentes variables (pH, concentración de norfloxacin y concentración de electrolito soporte) sobre la toxicidad de los efluentes contaminados con norfloxacin.
- Determinar, con la ayuda de herramientas estadísticas, los umbrales de toxicidad de efluentes contaminados con norfloxacin.
- Valorar la eficacia de la oxidación electroquímica como método que elimine la toxicidad de los efluentes contaminados con norfloxacin.
- Estudiar el efecto de diferentes variables (tipos de ánodos, presencia o ausencia de membrana de intercambio catiónico y la intensidad eléctrica aplicada) en la eficiencia de la oxidación electroquímica como método para eliminar toxicidad de los efluentes contaminados con norfloxacin.

3. INTRODUCCIÓN TEÓRICA

3.1. Contaminantes emergentes

Se puede definir como contaminantes emergentes (CE) a todas aquellas sustancias contaminantes de las que todavía se sabe poco sobre su presencia en el medio ambiente, sobre su impacto en el medio ambiente y en los seres vivos, y sobre los posibles tratamientos para eliminarlos. Los CE pueden tener origen sintético o deberse a procesos naturales recientemente descubiertos. Para ejemplificar esto, dentro de la definición de CE se encuentran productos de belleza, o los restos no-absorbidos y los metabolitos presentes en la orina de una persona que esté tomando algún medicamento. De esta forma, se debe destacar que la presencia de estos contaminantes no es nueva en el medio ambiente, sino que con el avance de las técnicas de detección, es ahora cuando se está empezando a poner el foco sobre este tipo de sustancias.

El hecho de que todavía no haya una gran cantidad de estudios sobre sus efectos para la salud o para el medio ambiente puede deberse a la falta de financiación que reciben los estudios de este tipo de materias. Además, este hecho también provoca que todavía no estén sujetos a ninguna legislación, aunque es de prever que sí lo estén en un futuro cercano.

Estos contaminantes se producen de forma continua, ya sea en procesos industriales como por el uso de diversos productos por parte de la población. Por otro lado, se ha constatado que los tratamientos tradicionales que se aplican en las EDAR no son suficientes para eliminar o neutralizar los CE. Esto, unido al hecho ya comentado de que no se tiene una gran información sobre los efectos de los CE, hace que exista una preocupación creciente sobre estas sustancias [1-6].

3.1.1. Tipos de contaminantes emergentes

Los CE tienen una naturaleza y unas propiedades muy diversas, y según la bibliografía se pueden clasificar en [2, 4-7]:

3.1.1.1. Pesticidas

Son todas las sustancias o mezclas de sustancias cuyo fin es la lucha contra las plagas. Desde hace tiempo están en el punto de mira de las autoridades, por lo cual se tiene relativamente bastante información sobre los efectos que provocan en el medioambiente y en el ser humano, ya que han sido objeto de muchas investigaciones. Estos productos pueden llegar a los seres humanos, principalmente a través de la cadena trófica, pero también a través del agua o del aire.

En los últimos tiempos se están analizando también los metabolitos de estos pesticidas, que llegan a aparecer en concentraciones más altas que los pesticidas de los cuales provienen originalmente, incluso pueden ser más tóxicos. Como ejemplo tenemos el glifosato y su metabolito resultado de la degradación microbiana, el aminometilfosónico (AMPA), que provoca daños en la salud de los seres vivos.

Algunos pesticidas y sus metabolitos pueden considerarse “permanentes” ya que tardan meses en desaparecer, tienen una alta solubilidad en el agua, y pueden ser tóxicos para el medio ambiente y para el ser humano. Esto hace que se tengan en cuenta como contaminantes emergentes.

3.1.1.2. Productos farmacéuticos

Existe una gran variedad de productos farmacéuticos, y se ha constatado que éstos han entrado en el ciclo del agua en diferentes concentraciones. Han llegado a contaminar el agua a través de la excreción de los humanos (producto no-absorbido + metabolitos), el uso en la agricultura y el desecho de productos farmacéuticos no utilizados. Pueden afectar a los humanos a través de la cadena trófica, e incluso se han llegado a detectar trazas de algunas de estas sustancias en aguas potables.

De este tipo de productos, los que más preocupan por su gran uso son los analgésicos (como el ibuprofeno), los antihipertensivos (usados para la hipertensión arterial), y los antibióticos. En cuanto a productos que preocupen por sus efectos están los disruptores endocrinos, ya que no se eliminan en los tratamientos de las EDAR, y llegan a las aguas de consumo humano.

Cabe destacar que las aguas provenientes de usos hospitalarios tienen una mayor concentración en estos productos, y que no existe legislación sobre este tipo de contaminantes.

3.1.1.3. Drogas

Las drogas ilegales llegan al medio ambiente de la misma forma que ocurre con los productos farmacéuticos. En este caso, sus concentraciones se miden en nanogramos por litro, pero aun así pueden suponer un peligro para la salud.

La mayoría de estos compuestos y sus metabolitos son resistentes a la eliminación a través de los tratamientos primarios y secundarios que se aplican en las EDAR. Esto supone que si se quieren eliminar, se deben aplicar otros procesos (ozonización, oxidación avanzada...), que muchas veces no se aplican debido a sus altos costes.

Dentro del grupo de las drogas legales podemos destacar la cafeína y la nicotina. Estudios recientes muestran cómo se puede encontrar estas sustancias en los acuíferos, provenientes de los vertidos de aguas residuales tratadas.

3.1.1.4. Hormonas esteroides

Su origen es mayoritariamente natural, ya que son sustancias producidas por los humanos y otros seres vivos. Otro origen menor es su presencia en fármacos. Como no son totalmente eliminados en los tratamientos que reciben las aguas residuales, llegan a introducirse en el medio ambiente.

3.1.1.5. Productos para el cuidado personal

Dentro de este grupo se encuentran productos cosméticos, repelentes o protectores solares. A diferencia de los productos farmacéuticos, éstos pueden introducirse directamente al medio ambiente en grandes cantidades, ya sea por su pulverización en el aire o por contacto directo en el agua. Pueden causar daños al medio ambiente y a la salud de los humanos a partir de ciertas concentraciones.

3.1.1.6. Surfactantes

Son productos tensoactivos y los residuos que forman. Existen dos grandes grupos: los tensoactivos aniónicos del tipo sulfonato alquilbenceno lineal (LAS), y los no aniónicos del tipo alquilfenilpolietoxilado (APEO).

Los APEO pasan al medio ambiente directamente desde los efluentes de las EDAR, donde son parcialmente eliminados. Estos son más tóxicos que las sustancias de las cuales provienen, y se les atribuyen efectos cancerígenos y de disminución del esperma masculino.

3.1.1.7. Productos para tratamientos de aguas

Dentro de los tratamientos que se le da al agua en las EDAR se encuentran los procesos de desinfección. Estos pretenden eliminar o minimizar los patógenos potencialmente peligrosos para los humanos. Sin embargo, muchos de los agentes desinfectantes que se usaban antiguamente (cloro...), además de realizar su función principal, oxidan a los diferentes componentes presentes en el agua (materia orgánica, yodo, bromo...) para formar subproductos potencialmente peligrosos (DSP).

De los múltiples DSP que se pueden formar ya se han estudiado algunos, como son los derivados del uso del cloro. Se ha constatado que su presencia es más elevada después de los tratamientos de desinfección y están relacionados con diferentes efectos adversos en los humanos como son el aborto espontáneo o ciertos defectos congénitos al nacer. Por esta razón el cloro dejó de usarse como desinfectante en las EDAR.

3.1.1.8. Retardantes de llama bromados

La creciente preocupación sobre la prevención de riesgos laborales (y la legislación relacionada) ha provocado que se apliquen retardantes de llama químicos en muchos productos industriales. Estos no son retenidos totalmente en los procesos tradicionales de tratamiento del agua, y recientemente se han encontrado en muestras de gran diversidad, como son humanos, animales o el medio ambiente.

Todavía no se ha podido demostrar los efectos que pueden llegar a ocasionar, pero se le asocian efectos de disrupción endocrina, neurotoxicidad, e incluso cancerígeno.

3.1.1.9. Otros contaminantes emergentes

Existen muchos otros productos que se consideran contaminantes emergentes, y la lógica hace pensar que en el futuro se catalogarán más. Entre estos, se pueden nombrar los aditivos alimentarios (sacarina...), aditivos industriales y sus subproductos (especialmente aquellos compuestos que contienen cloro o flúor) y algunos nanomateriales.

3.1.2. Tratamientos para los contaminantes emergentes

Ya se ha destacado que una de las características de los CE es que la mayoría no son totalmente eliminados por los tratamientos tradicionales (primarios y secundarios) aplicados en las plantas de tratamiento de aguas. Por esta razón, se está estudiando un gran abanico de posibilidades para eliminar estos compuestos.

Una de las principales dificultades es la gran variedad de compuestos que conforman los CE. Esto hace que, por sus diferentes propiedades, los diferentes procesos propuestos suelen ser efectivos con una serie de compuestos, pero totalmente ineficientes para otros. Entre los tratamientos de CE propuestos se pueden destacar los siguientes [3-4, 6-7]:

3.1.2.1. Tratamientos físicos y fisicoquímicos

Los procesos tradicionales de coagulación y floculación se usan para la eliminación de determinados CE. Sin embargo, no son eficaces para productos farmacéuticos, cosméticos y disruptores endocrinos.

La adsorción con carbón activo es muy útil para cualquier CE orgánico, debido a la hidrofobia de estos elementos. Por otro lado, puede perder eficiencia debido a la competencia u ocupación de la superficie del carbón activo por parte de otras sustancias (no CE).

La ultrafiltración, nanofiltración y la ósmosis inversa también son opciones aplicables para la eliminación de CE. La ultrafiltración, debido a la baja eficacia de las membranas, suele necesitar un pretratamiento para alcanzar rendimientos altos. La ósmosis inversa es verdaderamente efectiva, pudiendo incluso remover completamente los CE, pero debido a su coste considerablemente más elevado que la nanofiltración, hace que se apueste más por la esta última que por la ósmosis inversa.

3.1.2.2. Tratamientos biológicos y combinados

Los tratamientos biológicos tradicionales, como el de lodos activos, sólo son capaces de eliminar una parte de los CE, especialmente los que son más polares. Por esta razón, en los últimos tiempos se han planteado diversas opciones que contemplan combinar los tratamientos biológicos con otros, cosa que aumenta la biodegradabilidad de los compuestos que *a priori* no lo son. Algunos ejemplos de estas combinaciones son:

- El uso de reactores biológicos combinados con ultrafiltración. Tienen como ventajas la pequeña generación de lodos, cosa que obliga a los microorganismos a mineralizar los compuestos más resistentes a la degradación biológica, y la larga vida de los lodos, cosa que ayuda a la adaptación de los microorganismos a las sustancias más resistentes.
- Combinar el tratamiento biológico con procesos de oxidación, lo cual se ha mostrado eficaz para la eliminación de productos farmacéuticos, cosméticos, así como de algunos de sus metabolitos.

3.1.2.3. Incineración

Consiste en procesar los efluentes contaminados en estado gaseoso, a alta temperatura (más de 800°C) y con exceso de aire atmosférico, para conseguir mineralizar los contaminantes. Esta técnica supone un gran gasto energético y sólo está recomendada para efluentes con una gran carga de DQO.

3.1.2.4. Tratamientos avanzados

Para la completa mineralización de todas aquellas sustancias resistentes a los procesos tradicionales, se han desarrollado procesos de oxidación avanzada. Estos se basan en la generación de una gran cantidad de iones hidroxilo, que son lo suficientemente reactivos para oxidar estas sustancias resistentes.

Algunos de estos procesos se basan en el uso de oxidantes fuertes, como pueden ser el ozono o los peróxidos, combinados con radiación ultravioleta, cavitación, o reacciones químicas (reacción Fenton...). Por ejemplo, se ha constatado que el uso de ozono con radiación UV mejora en gran medida la degradación de los productos farmacéuticos polares y los metabolitos NPEO.

En este grupo de tratamientos avanzados se puede incluir la oxidación electroquímica, de la cual después se hablará más detenidamente.

3.2. Norfloxacin

El norfloxacin es un antibiótico usado para tratar infecciones bacterianas de gérmenes gram-positivo y gram-negativo. Está especialmente indicado para infecciones del tracto urinario inferior y superior, y se emplea tanto en humanos como en animales. Entre sus efectos adversos (información importante a la hora de tratarlo como un contaminante emergente) se encuentran principalmente náuseas, pérdida de apetito, diarrea, dolor de cabeza, mareos y reacciones alérgicas [8].

Si se habla de la estructura del norfloxacin, se puede decir que es una fluoroquinolona, cuya nomenclatura es: ácido 1-etil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolincarboxílico. La primera de estas moléculas se sintetizó para uso clínico. Las fluoroquinolonas son sustancias sintéticas que se emplean como fármacos quimioterapéuticos y en dosis bajas actúan como antibacterianos. Se caracterizan por tener un amplio espectro de actuación, una rápida absorción por vía oral, gran difusión por todo el organismo y gran tiempo de permanencia dentro del organismo [9].

El norfloxacin debe considerarse un contaminante emergente por dos razones. La primera, es que se trata de un fármaco de amplio uso humano y animal. De esta forma, puede llegar a las aguas residuales a través de las excreciones humanas (no sufre casi variación en el cuerpo), directamente al medio ambiente a través de las excreciones de los animales, o incluso directamente al medio acuático al ser usado como aditivos en los piensos usados en las piscifactorías [10]. La segunda de las razones es, que al igual que muchos otros productos farmacológicos, no se puede eliminar a través de los tratamientos tradicionales de aguas. Por esta razón, es capaz de llegar al medio ambiente a través de los efluentes de las aguas residuales.

En la figura 1, que se presenta a continuación, se muestra la representación de la molécula de norfloxacin.

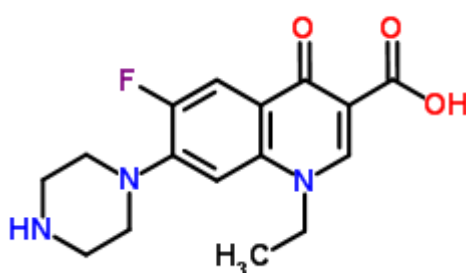


Figura 1 Representación de la molécula de norfloxacin.
Fuente: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4380.html> [20]

Durante el presente TFG se usará el norfloxacin como el contaminante emergente que estará presente en las muestras a tratar y analizar.

3.3. Oxidación electroquímica

La oxidación electroquímica es un método de oxidación avanzada que se caracteriza por el uso de electricidad y la no-adición de reactivos químicos para llevar a cabo el proceso de oxidación.

Es un método barato, versátil, de gran compatibilidad ambiental, energéticamente eficiente y de fácil automatización. Estas características hacen que sea un método atractivo para el tratamiento de contaminantes orgánicos, con el objeto de oxidarlos completamente a CO₂ o convertirlos en sustancias biodegradables [11].

Las variables que determinan la eficacia de este método son el electrolito soporte empleado, el pH del medio, la temperatura, la concentración del compuesto orgánico, la intensidad de corriente y el material anódico donde se producirán las reacciones de oxidación. El material anódico tiene una gran influencia en los productos intermedios y finales que se producen en la reacción de oxidación. Históricamente se han usado óxidos metálicos como son el PbO₂ o el SnO₂, pero más recientemente se han desarrollado los llamados ánodos de BDD (diamante dopado con boro) e incluso ánodos de materiales cerámicos dopados con metales.

Cabe destacar que los ánodos de BDD tienen una gran eficacia, pero los compuestos intermedios de la reacción que provocan continúan siendo tóxicos [11].

Dependiendo del tipo de ánodo empleado se puede diferenciar entre la oxidación anódica directa y la indirecta. En la oxidación directa los electrones son intercambiados directamente entre la superficie del ánodo y la sustancia que se oxida, mientras que la oxidación indirecta puede resumirse en los siguientes pasos:

1. Gracias a la electricidad se descompone el agua, y así se forman radicales hidroxilo que se adsorben en la superficie del electrodo.
2. El radical hidroxilo es el encargado del proceso de mineralización de los compuestos orgánicos.
3. Por otro lado, tiene lugar la oxidación del agua (los radicales hidroxilo son el paso intermedio) a oxígeno, reacción que entra en competencia con la descrita en el paso 2. Cabe añadir que se puede clasificar los electrodos usados en activos y no-activos. Los activos son aquellos que adsorben en su superficie los radicales hidroxilo, mientras que los no-activos no lo hacen, y son más eficientes.

Las disoluciones objeto de estudio en este TFG resultan de realizar la oxidación electroquímica, en presencia de 2 tipos diferentes de ánodos no-activos, en disoluciones contaminadas con norfloxacin. Los ánodos usados son los BDD y los de óxidos de estaño dopados con antimonio sobre una matriz cerámica.

3.4. Toxicidad

Ellen K. Silbergeld define la toxicidad como la capacidad intrínseca que posee un agente químico de producir efectos adversos sobre un órgano. Si se extrapola esta definición al daño que se puede realizar al medioambiente, se estaría hablando de la ecotoxicidad. Otros factores determinantes de los daños que puede ocasionar un agente tóxico, además de la capacidad tóxica en sí misma, es la dosis necesaria para obtener una respuesta o el periodo de latencia [12].

La dosis mínima hace referencia a la cantidad que se debe presentar dentro de un organismo, a partir de la cual se evidencian las consecuencias nocivas relacionadas con el tóxico. Este es un dato esencial a la hora de determinar los límites permisibles de los agentes tóxicos en el medio ambiente [12].

Por otro lado, ciertos efectos tóxicos se hacen evidentes con el paso del tiempo. Este intervalo de tiempo es el periodo de latencia y es especialmente importante en ciertos efectos, como por ejemplo los cancerígenos [12].

La Unión Europea en su Reglamento 1357/2014 sobre residuos, define diferentes características de los residuos que los hacen peligrosos. Entre otras, aparecen algunas relacionadas con la toxicidad, como son la "toxicidad aguda" o la "ecotoxicidad". En estas definiciones marca los límites de concentración que puede haber de la sustancia para considerar el residuo tóxico o no. Además, indica que si en un residuo aparecen varias sustancias con el mismo tipo de toxicidad, debe tenerse en cuenta la concentración total de todas estas sustancias [14].

3.4.1. Métodos para medir la toxicidad

Una forma de medir la toxicidad es a partir de concentraciones de sustancias tóxicas; sin embargo, realmente se está midiendo la toxicidad de forma indirecta. Para medir la toxicidad de forma directa se deben utilizar ensayos biológicos [13].

Los ensayos biológicos son los más adecuados a la hora de medir los efectos reales, sobre el organismo que se estudie, de cualquier agente físico o químico y con las condiciones del ensayo. Además, estos ensayos son muy diversos y sus efectos pueden aparecer a distintos niveles, desde efectos en estructuras subcelulares a efectos en poblaciones completas de un tipo de organismo [13].

Los indicadores que se usan en estos ensayos pueden ser de inhibición o de magnificación, y se miden por diferentes reacciones que muestran los organismos, como pueden ser la muerte de los mismos, su crecimiento, o cambios que sufran en su estructura. Dos de los indicadores más utilizados son [13]:

- Concentración letal media (CL₅₀): mide la concentración necesaria del tóxico para que mueran un 50% de los organismos del ensayo.
- Concentración de inhibición media (CI₅₀): mide la concentración necesaria del tóxico para que la propiedad que presenten los organismos (luminiscencia, etc.) llegue a un 50% de su valor inicial.

Otra de las formas en las que se mide la toxicidad es a través de UT (Unidades Tóxicas). La definición de UT dice que su valor es equivalente al número de veces que es necesario diluir una muestra para que un 50% de los organismos mueran o se inhiban sus propiedades. Por esta razón, para un valor igual o mayor que 1 UT se considera que la muestra presenta toxicidad (a mayor valor, mayor toxicidad), mientras que se considera no-tóxica siempre que tenga valores de UT menores que 1 (sería necesario concentrar la muestra para que fuera tóxica).

Cabe añadir que todas las condiciones en las que se realiza un ensayo biológico afectan a los organismos estudiados. De esta forma, la toxicidad que se mida es resultado de:

- Las concentraciones de todas las sustancias nocivas que se presenten en el medio, sean tóxicas en si mismas o no, ya que una sustancia no-tóxica puede alterar las propiedades físicas y/o químicas del medio, y así afectar al organismo estudiado.
- La duración de la exposición de los compuestos tóxicos y la frecuencia de la misma.
- Las estrategias del sistema biológico del organismo para luchar contra la toxicidad (expulsión de tóxicos, reacciones metabólicas para eliminar tóxicos...).
- Las condiciones físicas y químicas del medio donde está el organismo. En ocasiones es muy importante la presencia de luz o mantener ciertos niveles de temperatura.
- El efecto que tenga el organismo sobre el agente tóxico, como puede ser la degradación microbiana.

Según la duración de los ensayos, éstos pueden ser a corto, medio y largo plazo; y según se introduzca la muestra en el sistema, pueden ser estáticos, con renovación o de flujo continuo [13].

Con todo lo expuesto hasta el momento, se puede concluir que los resultados de los ensayos biológicos sólo son válidos para el organismo estudiado y con las condiciones mantenidas durante el ensayo. Así, no existe un organismo sobre el que se pueda ensayar y extrapolar datos obtenidos de toxicidad válidos para todo un ecosistema. Sí existen ciertas especies de organismos, con funciones ecológicas relevantes, cuyos datos obtenidos en sus ensayos son asimilables para indicar niveles genéricos de peligrosidad [13].

La Unión Europea define una serie de ensayos para determinar la toxicidad en el Reglamento (CE) 440/2008. En este reglamento, entre otras cosas, se describen detalladamente una gran diversidad de ensayos para diferentes sustancias. Sin embargo, destaca la posibilidad de desarrollar ensayos alternativos, que no se contengan en dicho documento, sobre todo si sirven para sustituir a ensayos que se realicen sobre animales o son ensayos que, aunque continúen siendo con animales, les afecten menos. En el presente trabajo se van a realizar ensayos de toxicidad no descritos por el reglamento de la UE, pero que al realizarse sobre semillas de lechuga o bacterias luminiscentes, podrían servir para sustituir algunos de los actuales ensayos con animales. La UE también indica que si estos nuevos ensayos tienen éxito deberían incorporarse al listado de los ensayos actuales [15].

3.5. Análisis Estadístico

Los ensayos que se van a realizar en este TFG suponen la recogida masiva de datos, cuyo análisis comporta el uso de herramientas estadísticas. Estas son el valor promedio, la desviación típica (DP en las tablas de resultados), las rectas de tendencia, residuos, gráficos de barras y el *p-value*. Todas, excepto el *p-value*, son de uso común y aplicación fácil en cualquier *software* de hojas de cálculo, por lo que no requieren de una mayor explicación.

3.5.1. Valor-P (*p-value*)

En el presente trabajo, al realizarse ensayos con multitud de mediciones y muestras, se van a aplicar herramientas estadísticas para confirmar las hipótesis. En este caso la herramienta escogida es el valor-p o *p-value*.

En un artículo de 2016, la ASA (Asociación Americana de Estadística en sus siglas en inglés) define de “forma informal” el *p-value* como la probabilidad de que un resumen de datos, bajo un determinado modelo estadístico, sea igual o mayor que el valor efectivamente observado. Por definirlo de otra forma, se puede decir que el *p-value* es el nivel de significancia más pequeño que indicaría que se tiene que rechazar la hipótesis de partida, es decir, es una medida de la verosimilitud de la hipótesis de partida según los datos obtenidos en los ensayos [16].

Este valor límite que se elige es en sí mismo arbitrario, y sólo indica el nivel de riesgo que se asume para probar la hipótesis de partida. Históricamente se escoge un *p-value* igual 0,05.

En el ya mencionado artículo de la ASA, se indica que históricamente se ha hecho un mal uso del *p-value*, incluso llegándose a “manipular” datos para conseguir los *p-value* deseados. También destacan, que el *p-value* en si mismo no sirve para probar una hipótesis, sino que siempre debe ir acompañado del contexto del estudio. Para evitar este mal uso de la herramienta, la ASA propone los siguientes puntos [16]:

- El *p-value* no mide la probabilidad de que una hipótesis sea cierta, sino el grado de incompatibilidad de una serie de datos con la hipótesis propuesta. A menor *p-value*, mayor incompatibilidad.
- Se requiere total honestidad y transparencia en el tratamiento de los datos para que el *p-value* sea válido. No es correcto usar los datos según interese para obtener los resultados que se esperaban.
- No se debe basar la conclusión de un estudio únicamente en el *p-value*; siempre se debe tener en cuenta y exponer el contexto del estudio.
- El *p-value* no mide la importancia o la dimensión de un efecto.

4. DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El siguiente apartado de este documento va a servir para describir la metodología empleada para la investigación realizada durante este TFG.

4.1. Medición y ajuste del pH

4.1.1. Introducción

El pH, por definición, mide la concentración de iones de hidronio presentes en el medio, siendo éste ácido con un pH bajo y básico con un pH alto. Además, se debe añadir que esta propiedad es crítica en diferentes procesos y reacciones. En el caso del presente TFG es un factor a considerar en tres etapas de la metodología:

- Disolución del norfloxacin: este proceso se debe realizar en un pH alrededor de 4.
- Ensayo de toxicidad sobre semillas de lechuga: el proceso biológico de crecimiento de las semillas debe llevarse a cabo dentro de un rango cercano a pH neutro, para asegurarse que el factor pH no interfiere en las mediciones de toxicidad.
- Ensayo de toxicidad con el equipo Microtox: las bacterias luminiscentes se ven afectadas por el pH de la disolución, por lo que la medición también debe llevarse a cabo en un rango cercano a pH neutro para asegurarse que este factor no interfiere en las mediciones de toxicidad.

Existen diferentes métodos para medir el pH, y según el que se utilice se obtiene mayor o menor precisión en la medición del mismo. En el caso de la preparación de la disolución de norfloxacin se ha utilizado un papel indicador, que al contacto con el medio cambia de color indicando el valor del pH con una precisión de unidades (no permite medir décimas). Se ha escogido este método porque es suficientemente preciso para lo que requiere esta etapa.

Por otro lado, en cuanto a la realización de los ensayos de toxicidad se ha escogido el uso de un pH-metro electrónico, que permite la medición de pH con precisión en la centésima. En este caso, se ha considerado necesario un método más preciso, debido a la criticidad del valor de pH en esta etapa de la investigación.

4.1.2. Medición y ajuste del pH con papel indicador

4.1.2.1. Materiales y equipos

- Tiras de papel indicador
- Agitador magnético
- Imán
- Ácido sulfúrico concentrado
- Vaso de precipitados
- Cuentagotas

4.1.2.2. Descripción

Como ya se ha comentado anteriormente se ha utilizado este método en la preparación de la disolución de norfloxacin. En una de las fases de esta preparación se precisa de un pH alrededor de 4, tendiendo la disolución a presentar un pH más básico. De esta forma es necesario medir y corregir el pH.

Se tiene la suspensión de norfloxacin en agua en un vaso de precipitados y en agitación continua gracias a un agitador magnético y a un imán. Sin dejar de agitar, se introduce una tira indicadora de pH en la muestra y se mantiene alrededor de 1 minuto, hasta que no se observe que cambie el color de sus 4 zonas diferenciadas. Una vez pasado el minuto dentro de la muestra, se extrae la tira indicadora y se compara con los patrones que están adjuntos en la propia caja de las tiras indicadoras de pH.

A medida que el norfloxacin se disuelve hace que el pH sea más básico, con lo que el pH estará por encima de 4. Si la medición así lo indica, es necesario usar el cuentagotas para añadir un par de gotas de ácido sulfúrico concentrado con el fin de acidificar el medio. Una vez disueltas las gotas del ácido sulfúrico se vuelve a medir el pH. Se repite esta operación las veces que se precise hasta que el pH de la disolución sea 4 de forma estable.

En la figura 2 se puede observar el uso de las tiras indicadoras de pH.



Figura 2 Midiendo el pH con las tiras indicadoras. Fuente: elaboración propia.

4.1.2.3. Ventajas e inconvenientes

La principal ventaja de este método de medición de pH es la rapidez y comodidad de medición. Esto es así porque no requiere preparación previa ni una calibración de ningún tipo de equipo. Sin embargo, el método presenta la limitación de su precisión, que no es la adecuada para algunas mediciones.

4.1.3. Medición y ajuste del pH con un pH-metro

4.1.3.1. Materiales y equipos

- pH-metro electrónico
- Electrodo de pH
- Agitador magnético
- Patrones de calibración

- Imán
- Ácido sulfúrico 0,1N
- Hidróxido sódico 0,1N
- Vasos de precipitados
- Cuentagotas
- Agua destilada
- Papel de secado

En la figura 3 se presenta el montaje necesario para la medida del pH mediante un pH-metro.



Figura 3 Montaje para la medida del pH con un pH-metro. Fuente: Elaboración propia.

4.1.3.2. Descripción

Este método se ha utilizado para el ajuste de pH de las diferentes muestras del ensayo de toxicidad tanto sobre semillas de lechuga como sobre bacterias luminiscentes.

El primer paso que se debe llevar a cabo es la calibración del pH-metro electrónico. Para ello, se sigue el proceso de calibración guiado por la pantalla del propio pH-metro. Los pasos son los siguientes:

1. Encender el pH-metro.
2. Asegurarse que el sensor de pH está limpio. Para ello se lava con agua destilada y se seca con papel.
3. Pulsar el botón de calibración "CAL".
4. Comenzar la calibración del pH con el botón "pH".
5. Según las órdenes vistas en la pantalla del pH-metro, se introduce el sensor de pH en la disolución patrón de pH 4. El propio bote de la disolución patrón contiene un imán para su agitación.

6. Esperar a que el pH-metro termine la medición y pida introducir la siguiente disolución patrón.
7. Lavar y secar el sensor de pH.
8. Introducir el sensor de pH en la segunda disolución patrón, de pH 7, y esperar a que concluya la medición.
9. En el caso de que se hayan seguido de forma exitosa los pasos anteriores, ya se tendría el pH-metro calibrado. Si ha existido algún error, el pH-metro nos pedirá volver a realizar el proceso de calibración desde el principio.
10. Volver a limpiar el sensor de pH y ya se pueden realizar las mediciones de las muestras.

En este punto ya se pueden realizar las medidas que se precisen con el pH-metro. Existen dos posibilidades para medir el pH:

- Medición en continuo
- Medición puntual

En el caso del presente trabajo se ha optado por la medición puntual, ya que se precisan valores discretos de pH. Para medir el pH se han de seguir los siguientes pasos:

1. Tener el pH-metro calibrado.
2. Introducir la muestra en un vaso de precipitados limpio. La cantidad de muestra ha de ser suficiente para cubrir los puntos de medición del sensor de pH.
3. Introducir un imán en el vaso de precipitados con la muestra.
4. Introducir el sensor de pH dentro de la muestra. Para evitar que se rompa el sensor de pH, se debe procurar que la posición de éste no se encuentre en la trayectoria del movimiento que tendrá el imán durante la medición.
5. Pulsar el botón "pH" para comenzar la medición.
6. Esperar a que el pH-metro obtenga una medida estable de pH.
7. Si el pH no es el deseado, se debería corregir con el uso del ácido sulfúrico o el hidróxido sódico. Acto seguido, se vuelve al punto 4 para volver a medir el pH de la muestra.
8. Extraer el sensor pH de la muestra, lavarlo y secarlo. En caso que no se vayan a realizar más mediciones, el sensor de pH debe introducirse dentro del electrolito de conservación, para evitar que el sensor se deteriore.
9. Devolver la muestra a su recipiente original y lavar el vaso de precipitados y el imán.

4.1.3.3. Ventajas e inconvenientes

Este método de medición de pH se caracteriza por su precisión a la centésima del pH. Además, proporciona la posibilidad de medir el pH en continuo, y así verificar inmediatamente el efecto de cualquier sustancia que se añada a la muestra. Por el contrario, se precisa de calibración inicial, de cuidado con el mantenimiento de su electrodo de medición, y de cierta formación para su implementación.

4.2. Preparación de la disolución madre de norfloxacin

4.2.1. Introducción

Uno de los pasos previos a la realización del ensayo de toxicidad aguda con las semillas de lechuga es la preparación de una disolución madre de norfloxacin. En este ensayo de toxicidad se van a utilizar una gran cantidad de muestras con diferentes concentraciones de norfloxacin (más de 30 por ensayo).

Existía la opción de preparar cada muestra de norfloxacin por separado, pero se optó por preparar una disolución madre y hacer diluciones a partir de ésta con el fin de disminuir el error introducido por el método de experimentación.

Por otro lado, y con la finalidad de abaratar el coste del TFG, en lugar de partir de un reactivo que sea norfloxacin 100%, se ha partido de pastillas comerciales de norfloxacin, en cuya composición se encuentran diferentes excipientes. Esto llevará a la necesidad de medir los valores reales de concentración de norfloxacin en las muestras con ayuda de un espectrofotómetro.

4.2.2. Materiales y equipos

- Pastillas de “Norfloxacin CINFA 400mg”
- Mortero y pilón
- Matraz aforado de 250 ml
- Vaso de precipitados de 250 ml
- Agua destilada
- Cuentagotas
- Agitador magnético
- Imán
- Tiras medidoras de pH
- Ácido sulfúrico concentrado
- Bomba de vacío
- Papel de filtro de 2,7 μm
- Equipo de filtración

En la figura 4 se muestra la caja del norfloxacin comercial del cual se parte para preparar esta disolución.



Figura 4 Norfloxacin comercial. Fuente: Elaboración propia.

4.2.3. Descripción

El objetivo de esta fase es obtener una disolución de aproximadamente 1600ppm de norfloxacin. Para ello, se seguirán los siguientes pasos:

1. Machacar una pastilla de 400 mg de norfloxacin CINFA en un mortero limpio.
2. Introducir el norfloxacin machacado en el vaso de precipitados de 250 ml.
3. Llenar el vaso de precipitados que contiene el norfloxacin con unos 200ml de agua destilada. Parte de este agua proviene de lavar el mortero 3 veces con agua destilada para asegurar que la pérdida de norfloxacin es mínima.
4. Poner un imán en el vaso de precipitados, y este sobre el agitador magnético para favorecer la disolución.
5. El pH óptimo para disolver el norfloxacin es 4; sin embargo, conforme se va disolviendo el norfloxacin, el pH de la disolución se hace básico. Por esta razón, hay que medir el pH cada pocos minutos. Esta medición de pH está descrita en el punto "1.2. Medición y ajuste del pH con papel indicador". Para bajar el pH hasta 4 se usa el ácido sulfúrico concentrado.
6. Dejar el agitador en funcionamiento alrededor de una hora para conseguir una disolución completa.
7. Montar el equipo para filtrar la disolución (bomba de vacío, papel de filtro...) y filtrar la disolución. Esta operación se realiza ya que en la disolución se encuentran algunas sustancias en suspensión (principalmente los excipientes del medicamento).
8. Introducir la disolución filtrada en un matraz aforado de 250 ml y enrasar con agua destilada. Así, se obtiene una disolución de aproximadamente 1600ppm de norfloxacin.

En la figura 5 se puede observar el montaje del equipo de filtración.



Figura 5 Equipo de filtración. Fuente: Elaboración propia.

4.3. Obtención de la concentración real de norfloxacin

4.3.1. Introducción

Tal como se ha indicado anteriormente, la concentración de norfloxacin de la disolución madre es aproximadamente de 1600 ppm, es decir, no se conoce con exactitud. Por ello, es necesario determinar la concentración de las disoluciones que se van a preparar.

El método por el que se ha optado para determinar la concentración de norfloxacin es la espectrofotometría UV-visible. Esta tecnología se basa en medir la absorción de la luz del compuesto a analizar a lo largo de una banda de longitudes de onda (en este caso la del espectro UV-visible). Cada sustancia presenta diferentes picos de absorbancia a determinadas longitudes de onda que permiten identificarla. Además, el valor de absorbancia del espectro depende de la concentración de la sustancia, por lo que es posible obtener curvas de calibración que permitan determinar la concentración de la sustancia a partir de su valor de absorbancia; para una mayor definición, precisión y fiabilidad de las curvas de calibración, éstas se obtienen con los valores de absorbancia de los picos observados en el espectro.

4.3.2. Materiales y equipos

- Norfloxacin para uso en laboratorio
- Espectrofotómetro UV-visible
- Balanza analítica
- Matraz aforado de 500 ml
- Propipeta
- Pipetas
- Vaso de precipitados de 250 ml
- Agitador magnético
- Imán
- 8 matraces aforados de 100 ml
- Vaso de precipitados de 100 ml
- Agua destilada
- Cuentagotas

En la figura 6 se puede ver el equipo de espectrofotometría utilizado en el presente TFG.

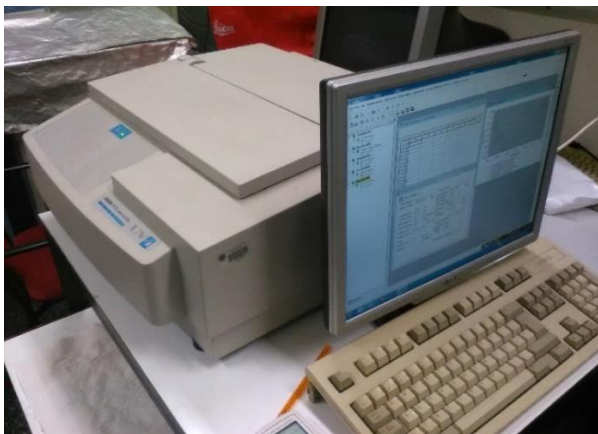


Figura 6 Espectrofotómetro UV-visible. Fuente: Elaboración propia.

4.3.3. Descripción

Para obtener la recta de calibrado para el norfloxacin se deben seguir los siguientes pasos:

1. Con la ayuda de una balanza analítica se pesa la cantidad necesaria de norfloxacin para preparar una disolución de 50 ppm, concretamente 500 ml.
2. Se disuelve el norfloxacin en agua destilada en un vaso de precipitados con la ayuda de un agitador magnético.
3. Se obtiene la disolución de 50 ppm en un matraz aforado de 500 ml, enrasando con agua destilada.
4. A partir de esta disolución, se preparan las diluciones del resto de concentraciones necesarias para elaborar la recta de calibrado (1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 y 40 ppm).
5. Se mide la absorbancia de cada una de las disoluciones en el rango de longitudes de onda escogido, que irá de 190 a 500nm, usando agua destilada en la cubeta de referencia.
6. Se obtienen las curvas de absorbancia frente a longitud de onda.
7. Se determinan los puntos característicos de estas curvas, donde se presenta mayor definición para realizar la curva de calibrado.
8. Se valora la linealidad de la absorbancia en las longitudes de onda específicas de los puntos característicos.
9. Se escoge uno de los puntos característicos, y conocida su zona de linealidad, se obtiene la recta de calibrado.
10. Medir la absorbancia de las disoluciones que se preparen a partir de la disolución madre de norfloxacin y, con ayuda de la recta de calibrado obtenida, determinar su concentración real.

4.3.4 Resultados obtenidos para la recta de calibrado del norfloxacin

En la figura 7 se muestran los espectros de absorbancia obtenidos a distintas concentraciones de norfloxacin. Como puede verse en dicha figura, el norfloxacin presenta 3 picos de absorbancia situados en las longitudes de onda 208 nm, 277 nm y 315 nm.

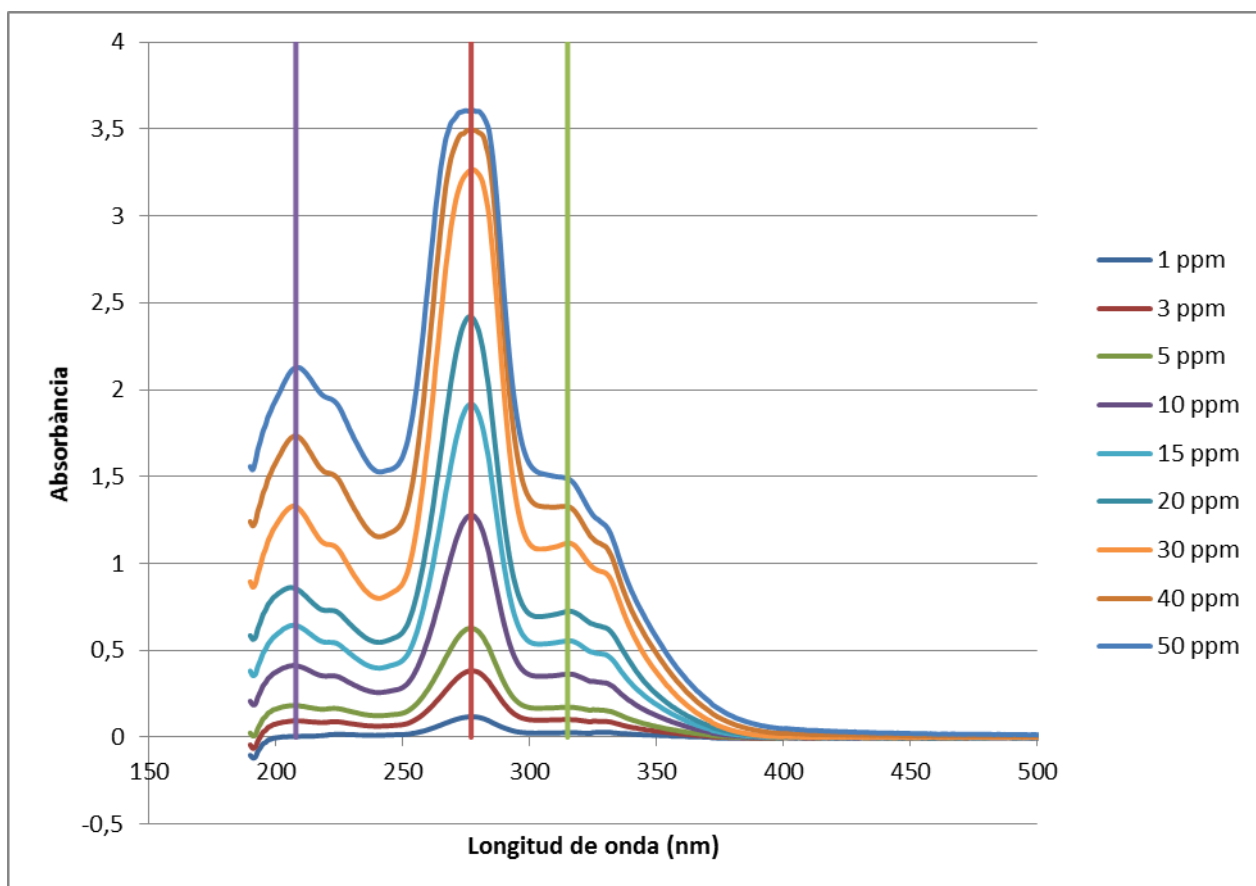


Figura 7 Curvas de absorción frente a longitud de onda para diversas concentraciones de norfloxacin. Fuente: Elaboración propia.

Los resultados de absorción para cada una de las longitudes de onda destacadas se pueden ver en la tabla 1.

Tabla 1 Resultados de absorción del norfloxacin para diferentes longitudes de onda. Fuente: Elaboración propia.

$\lambda = 208 \text{ nm}$		$\lambda = 277 \text{ nm}$		$\lambda = 315 \text{ nm}$	
[NOR]	Absorbancia	[NOR]	Absorbancia	[NOR]	Absorbancia
0	0	0	0	0	0
1	0,005	1	0,118	1	0,026
3	0,095	3	0,383	3	0,102
5	0,182	5	0,628	5	0,174
10	0,412	10	1,278	10	0,363
15	0,643	15	1,917	15	0,555
20	0,855	20	2,418	20	0,725
30	1,327	30	3,263	30	1,117
40	1,733	40	3,492	40	1,328
50	2,125	50	3,606	50	1,490

En las figuras 8, 9 y 10 se han representado los datos de la tabla 1 para obtener las curvas de calibrado correspondientes a las longitudes de onda de 208, 277 y 315 nm, respectivamente.

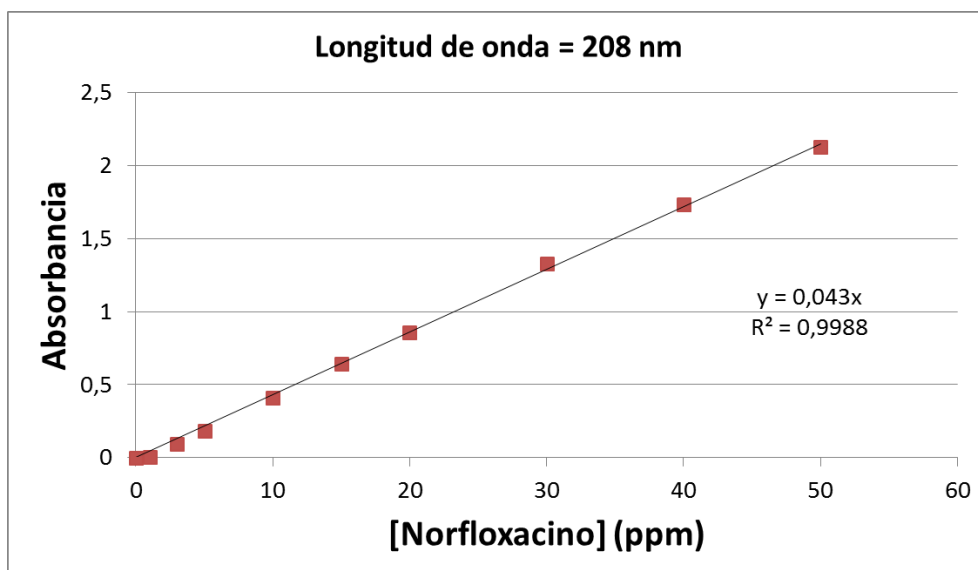


Figura 8 Absorbancia frente a concentración de norfloxacin para la longitud de onda de 208 nm. Fuente: Elaboración propia.

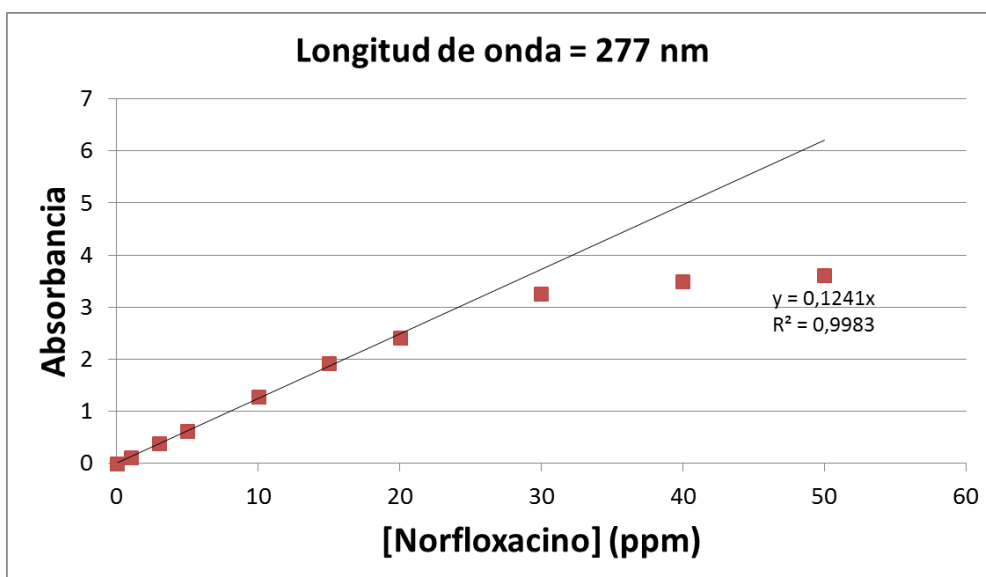


Figura 9 Absorbancia frente a concentración de norfloxacin para la longitud de onda de 277 nm. Fuente: Elaboración propia.

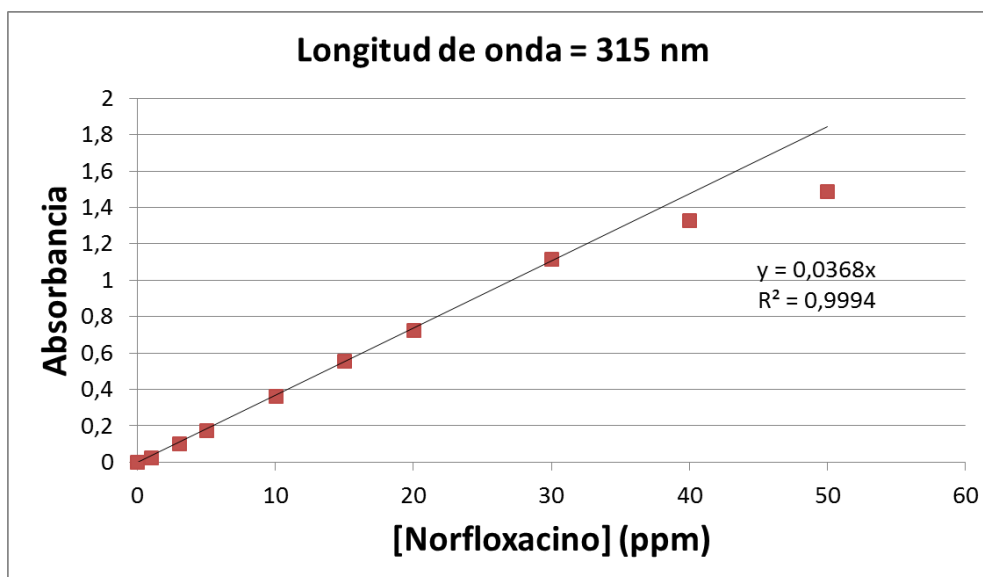


Figura 10 Absorbancia frente a concentración de norfloxacin para la longitud de onda de 315 nm.
Fuente: Elaboración propia.

Tal como puede verse en las figuras 8, 9 y 10, si se pasa a hablar ahora de la linealidad que muestra la absorbanza en cada una de las longitudes de onda, se concluye que:

- Para la longitud de onda de 208 nm la absorbanza es lineal de 0 a 50 ppm de norfloxacin.
- Para la longitud de onda de 277 nm la absorbanza es lineal de 0 a 20 ppm de norfloxacin.
- Para la longitud de onda de 315 nm la absorbanza es lineal de 0 a 30 ppm de norfloxacin.

Una vez analizados todos los datos se decide utilizar el pico de 277 nm para la medición de la concentración de norfloxacin. Aunque es el pico donde el rango de linealidad es más estrecho, se elige esta longitud de onda, porque es la que mayor resolución presenta en el espectrofotómetro UV-visible. Por tanto, la recta de calibrado que se empleará para determinar la concentración de norfloxacin de las muestras que se preparen a partir de la disolución madre es la siguiente:

$$\text{Absorbancia} = 0,1241 \cdot [\text{NOR}] \quad (1)$$

siendo válida entre 0 y 20 ppm de norfloxacin.

Como las muestras que se van a utilizar son de concentraciones superiores a 20 ppm de norfloxacin, será necesario hacer diluciones de las mismas para conseguir mediciones correctas, es decir, habrá que diluirlas antes de pasarlas por el espectrofotómetro para que su concentración se encuentre dentro del rango de validez de la recta de calibrado escogida.

4.4. Ensayo estático de toxicidad aguda en semillas de lechuga "lactuca sativa"

4.4.1. Introducción

Aunque, como se ha comentado anteriormente, el bioensayo estático de toxicidad aguda en semillas de lechuga no se encuentra recogido dentro del catálogo europeo de ensayos para determinar la toxicidad, sí cumple perfectamente con el espíritu que promulga la norma europea de buscar nuevos métodos de ensayos menos traumáticos para los seres vivos.

Este ensayo permite obtener datos de la toxicidad que aporta un compuesto puro o una serie de compuestos, que se encuentren en una muestra, durante los primeros días de las fases de germinación y crecimiento de las semillas y sus hipocotilos y radículas [17-18].

Tradicionalmente solo se ha tenido en cuenta como parámetro para medir la toxicidad el porcentaje de germinación de las semillas. Sin embargo, este parámetro no es lo suficientemente sensible cuando se trata de bajas concentraciones de los contaminantes [17-18].

Se debe tener en cuenta que los primeros días del crecimiento de las semillas ocurren una gran cantidad de procesos fisiológicos que afectan al crecimiento de las mismas. Además, existen muchas sustancias que pueden interferir en estos procesos inhibiéndolos. Esta etapa del desarrollo de las plantas se considera muy sensible a la presencia de factores externos adversos [17-18].

Por estas dos razones, en los últimos tiempos también se mide el crecimiento de los hipocotilos y de las radículas. Se puede observar en algunos ensayos que aunque el porcentaje de germinación muestre que no hay toxicidad, por el contrario, los parámetros de crecimiento de la radícula y del hipocotilo sí evidencian una clara inhibición en el crecimiento de las semillas [17-18].

En cuanto a la posible extrapolación que se haga de los datos obtenidos en estos ensayos, se puede indicar que realmente son representativos de los efectos tóxicos de las sustancias analizadas en el crecimiento de las semillas. Esta afirmación puede realizarse ya que los procesos que intervienen en esta fase son generales para una gran parte de las semillas. Además, se debe añadir que al trabajar sobre semillas de "lactuca sativa", también pueden tomarse las conclusiones como válidas para las especies de plantas terrestres cercanas a depósitos de agua contaminados [17-18].

4.4.2. Antecedentes y primeros ensayos

La bibliografía muestra cómo este tipo de ensayo de biotoxicidad está siendo empleado por múltiples investigaciones en todo el mundo. Incluso en la Universidad Politécnica de Valencia (UPV) se ha realizado trabajos en el que interviene este ensayo.

De hecho, antes de realizar los ensayos de este TFG, se han tenido en cuenta las conclusiones y recomendaciones de investigaciones previas. Una de ellas, que surge de un TFG anterior de la UPV, es la necesidad de lavar meticulosamente todo el material de laboratorio, ya que aparecían hongos en las semillas y no se podían tomar como válidos los resultados.

Aunque para realizar los ensayos se ha usado la variedad “Reina de mayo”, en las primeras pruebas se usó la variedad “Baby”, que finalmente fue descartada. La realidad es que la variedad “Baby” se ha mostrado más resistente a la aparición de hongos, pero también demostró un crecimiento pírrico de su radícula al quinto día de incubación. Esto provoca que no se puedan hacer mediciones significativas del crecimiento radicular. Por esta razón, se decidió volver al uso de la variedad “Reina de mayo”, aunque eso significó extremar las precauciones a la hora de lavar todo el material de laboratorio.

Otro de los aspectos que se debatió debido a la discrepancia en la bibliografía y por el cual se hicieron unas pruebas iniciales, fue el volumen de muestra que debía añadirse en cada cultivo. Con el mismo tipo de placa Petri y filtro, en la bibliografía se observa cómo se usa desde 3 ml de muestra hasta 5 ml. En este TFG se optó por 3 ml, ya que era suficiente para humidificar el filtro, y en las otras opciones las semillas se encontraban anegadas y no se podían asentar sobre el filtro.

Por último, y debido a la limitación temporal que tiene un TFG, se decidió solo tomar medidas de las radículas y no de los hipocotilos.

4.4.3. Materiales y equipos

- Placas Petri
- Papel de filtro Whatman “Qualitative 3”
- Vasos de precipitados
- Matraces aforados
- Pipetas
- Pinzas
- Regla milimetrada
- Cuentagotas
- Agua destilada
- Alcohol etílico 96°
- Ácido sulfúrico 0,1N
- Hidróxido sódico 0,1N
- Electrolito soporte, sulfato sódico
- Semillas de “lactuca sativa”
- pH-metro electrónico
- Báscula analítica
- Espátula
- Nevera a 20°C
- Guantes de nitrilo
- Jabón

4.4.4. Condiciones de la experimentación

- Limpieza de todo el material de laboratorio mediante el uso de alcohol 96°.
- Ausencia de luz directa o intensa durante de fase de puesta de las semillas en las placas Petri
- pH comprendido entre 5 y 7 para las muestras de efluentes contaminados (excepto en la experiencia en la que se prueba el efecto del pH).
- 120 horas de incubación de las semillas con la muestra.
- Temperatura de 20°C durante la incubación de las semillas
- Ausencia de luz durante la incubación de las semillas

4.4.5. Descripción

4.4.5.1. Lavado del material de laboratorio

Entre otras cosas, este tipo de ensayo de toxicidad se caracteriza por:

- Carga de trabajo de laboratorio alta.
- 5 días de incubación de las semillas con las muestras de efluentes contaminados.

Por esta razón, y debido a que los antecedentes muestran problemas con la aparición de hongos, esta fase del ensayo se muestra crítica. Un error en este aspecto invalida los resultados del ensayo, y hace que se hayan malogrado un número considerable de horas de trabajo de laboratorio y los 5 días de incubación, retrasándose toda la investigación.

En este momento del ensayo lo que se pretende es limpiar con agua y jabón, y luego con alcohol etílico 96° el material de laboratorio susceptible de entrar en contacto con las semillas. El procedimiento es el siguiente:

1. Limpiar el material con jabón y agua del grifo.
2. Enjuagar el material perfectamente con agua del grifo.
3. Lavar el material 3 veces con agua destilada.
4. Limpiar el material con alcohol etílico 96°.
5. Dejar secar el material al aire.

Los materiales sobre los que se van a realizar estas operaciones son las placas Petri, las pipetas con las que se añadirán las muestras de efluentes contaminados y las pinzas con las que se cogerán las semillas. Además, cabe añadir que toda esta fase se realizará con el uso de guantes de nitrilo para evitar contaminaciones una vez lavado el material.

4.4.5.2. Preparación de las muestras a ensayar

Mientras se seca todo el material de laboratorio se procede a preparar las muestras que se van a ensayar. Se han realizado ensayos en que las muestras presentaban diferentes condiciones, pero en todas está presente el norfloxacin y en bajas concentraciones. Por esta razón, para alcanzar estas bajas concentraciones, evitando errores experimentales altos, se ha partido de la disolución madre de norfloxacin de aproximadamente 1600 ppm (punto 4.2.3. del presente TFG) y se han realizado diluciones en matraces de 100ml.

Por otro lado, en caso que las muestras debieran contener sulfato sódico (electrolito soporte usado en el tratamiento electroquímico), se prepara una disolución de 10g/l de Na_2SO_4 . De esta disolución se toma el volumen necesario para preparar las distintas concentraciones del electrolito que deba contener cada muestra.

En todos los ensayos se deberá tener una muestra de control, que será agua destilada. Además, si en el ensayo una de las variables es la presencia de Na_2SO_4 se pondrá un segundo blanco que será una disolución del propio Na_2SO_4 en agua destilada, pero sin la presencia de norfloxacin.

Otro de los aspectos a controlar en la preparación de las muestras es su pH. Es necesario que las muestras que se vayan a ensayar sobre las semillas tengan un pH determinado. En este caso el rango de pH en el cual las semillas pueden realizar sus actividades metabólicas se encuentra entre los valores 5,5 y 7 de pH. Solo hay un ensayo que no cumple con esta directriz, ya que se ensayaron diferentes valores de pH, con el fin de analizar el efecto de la toxicidad del pH en las semillas.

Es lógico que partiendo de una disolución madre de norfloxacin con un pH cercano a 4, las muestras preparadas tengan un pH ácido por debajo de 5. Para ajustar el pH se siguen los pasos explicados en el punto 4.1. de este TFG. Además, se debe intentar añadir la cantidad mínima del ácido o la base fuerte ya que si hay un exceso se puede diluir la concentración de norfloxacin original en la muestra. Una vez preparadas las muestras, se determina su concentración real de norfloxacin mediante espectrofotometría UV-visible con ayuda de la recta de calibrado obtenida en el punto 4.3.4 de este TFG (ecuación (1)).

4.4.5.3. Preparación de las placas Petri

Se debe destacar que en esta fase se preparan todas las placas Petri que se van a usar durante un ensayo con el fin de optimizar los tiempos de trabajo de laboratorio. Se realizan las siguientes tareas:

- Coger todas las placas Petri (debidamente lavadas) que se van a usar durante el ensayo (4 por muestra)
- Marcar las placas Petri según un código que permita identificarlas en la fase de medición. En este caso se ha optado por asignar una letra mayúscula a cada muestra, y un número según el nº de placa Petri dentro de cada muestra. Por ejemplo, las placas Petri podían tener la denominación A3 o D1.
- Introducir un papel de filtro Whatman "Qualitative 3" dentro de cada placa Petri preparada. Esta operación se hace con la pinza limpia para evitar contaminaciones.

Se muestra un ejemplo de placa preparada con el papel de filtro en la figura 11.

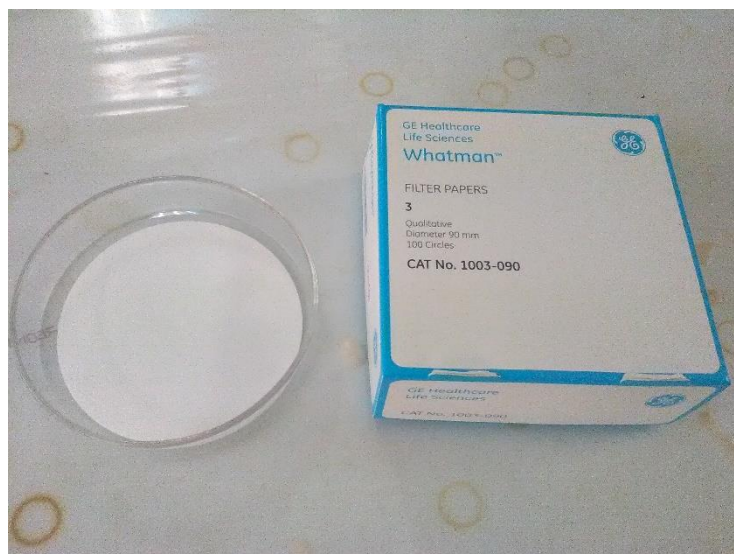


Figura 11 Placa Petri con papel de filtro. Fuente: Elaboración propia.

4.4.5.4. Aplicación de la muestra sobre la placa Petri

Una vez preparadas las placas Petri y las muestras se pasa a impregnar el filtro de la placa Petri con la muestra a ensayar. Para esto, mediante una pipeta limpia, se toman 3 ml de la muestra y se depositan sobre el filtro. Se puede observar una imagen de esta fase en la figura 12. En este momento del ensayo son muy importantes los siguientes puntos:

- Que la pipeta no entre en contacto con el filtro. En caso de que lo haga, la pipeta debe volverse a lavar.
- Esparcir lo más homogéneamente posible la muestra sobre el filtro. La muestra, gracias a la capilaridad, es capaz de empapar todo el filtro, pero debe evitarse que exista ninguna zona encharcada en la placa Petri.

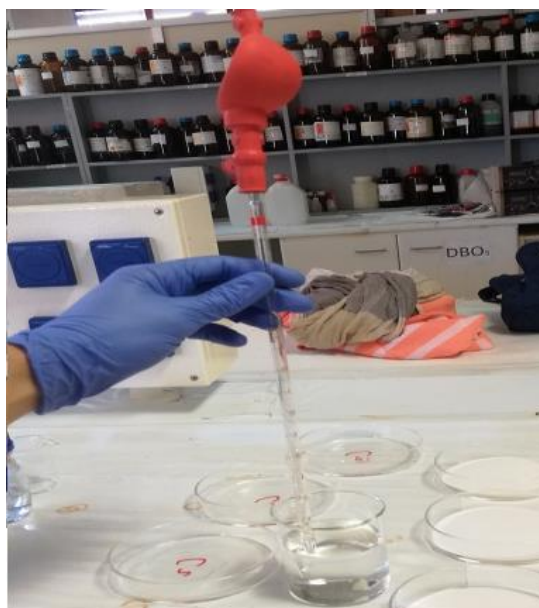


Figura 12 Usando la pipeta para tomar los 3 ml de muestra necesarios en cada placa Petri. Fuente: Elaboración propia.

4.4.5.5. Colocación de las semillas

Una vez introducida la muestra en la placa Petri se procede a repartir las semillas en la misma. Antes de realizar esta operación, se deberá esparcir en una placa Petri limpia la cantidad suficiente de semillas para la realización de todo el ensayo.

En cada placa Petri se depositarán 20 semillas repartidas uniformemente, tal como se observa en la figura 13, para evitar conflicto entre ellas durante el crecimiento de la radícula. Las semillas se colocarán con la ayuda de la pinza limpia, debiéndose tener en cuenta que ésta nunca puede entrar en contacto con el filtro impregnado de muestra. Si esto ocurre debe volverse a lavar la pinza.

Una vez colocadas las 20 semillas, se tapa la placa Petri y se introduce dentro del recipiente opaco en el que se almacenarán todas las placas durante la incubación. Se deben repetir los puntos 4.4.5.4. y 4.4.5.5. con cada una de las placas Petri preparadas hasta tener todas las muestras del ensayo.

El hecho de que en este caso se realicen los puntos 4.4.5.4. y 4.4.5.5. seguidos para cada placa Petri y no por separado (que sería más corto y fácil de llevar a cabo), como sí se realiza el punto 4.5.3., es debido al posible efecto de la dormancia. Este efecto puede provocarse por la exposición de las semillas a la luz o una temperatura elevada (aunque el tiempo de exposición sea corto), y provoca que las semillas entren en un estado de latencia y no germinen. Este hecho distorsionaría desde el punto de vista de la toxicidad los resultados obtenidos [17].



Figura 13 Colocación de las semillas en la placa Petri. Fuente: Elaboración propia.

4.4.5.6. Incubación de las semillas con las muestras

Una vez puestas todas las semillas en las placas Petri con su muestra correspondiente, se debe introducir el recipiente que las contiene dentro de una nevera a temperatura constante (20°C) y sin presencia de luz. Permanecerán en esas condiciones durante 120 horas (5 días), momento a partir del cual se puede proceder a la medición del crecimiento de las semillas.

4.4.5.7. Medición del crecimiento de las semillas y toma de datos

Una vez transcurridas las 120 horas se pasa a la medición del crecimiento de las radículas de las semillas (en la figura 14 se presentan las semillas después de transcurrir el tiempo de incubación). Esta tarea precisa de unas pinzas y una regla milimetrada. Es posible que, como en algunas ocasiones las radículas crecen con forma curva, se necesiten unas segundas pinzas para

poder medir correctamente toda la extensión de la radícula. En la figura 15 se observa una representación de una semilla germinada.

Los datos se anotarán directamente en una hoja de cálculo, desde donde más tarde se podrán procesar para obtener las conclusiones de estos ensayos.

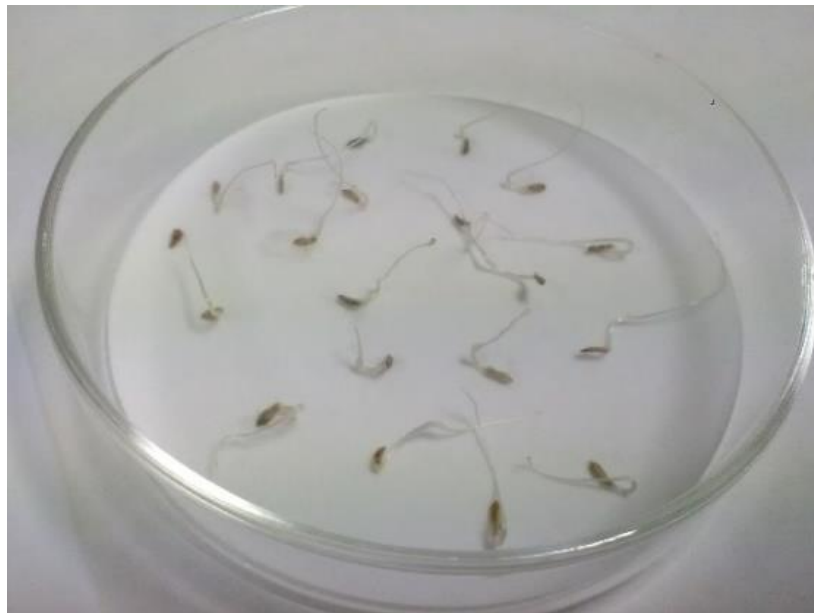


Figura 14 Semillas después de incubar 120 horas con la muestra. Fuente: Elaboración propia.

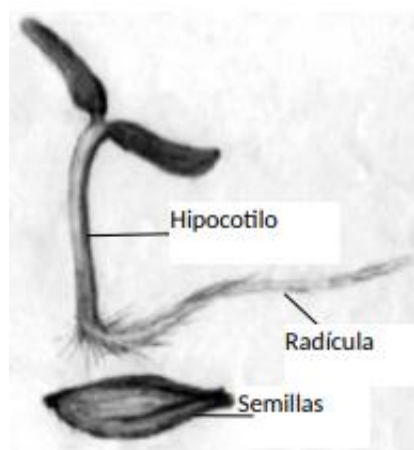


Figura 15 Representación de una semilla y una semilla germinada. Fuente: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/573/cap4.pdf> [18]

4.4.6. Procesamiento de datos

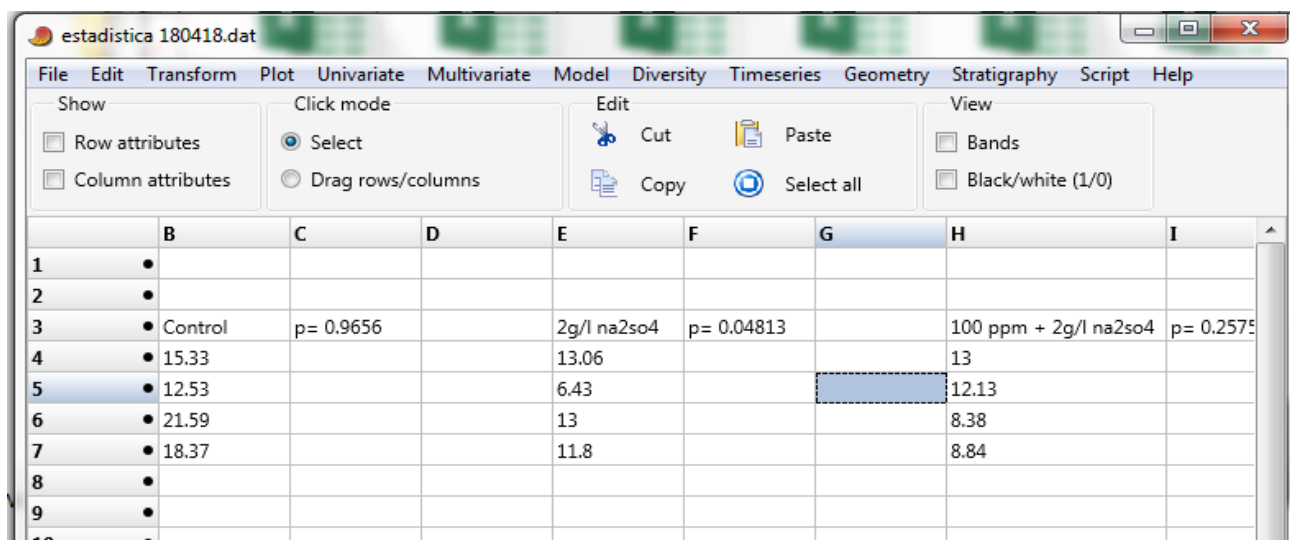
El primer paso que se realizará en esta fase será el de obtener los datos reales de la concentración de norfloxacin de las muestras a partir de la curva de calibración obtenida con los patrones de norfloxacin (ecuación (1)) y del valor teórico de la dilución realizada con cada muestra.

Por otro lado, con los resultados del crecimiento radicular se obtendrán el valor medio del crecimiento y la desviación estándar de este crecimiento, el porcentaje de reducción del crecimiento radicular respecto al blanco del agua, así como el *p-value*.

Todos estos cálculos se realizarán con un software de hojas de cálculo, excepto el *p-value*, para el cual se requerirá un software estadístico diferente. En el caso del presente TFG se utilizará el PAST versión 3,20. En la figura 16 se muestra una foto del archivo del programa PAST. El PAST (PAleontological STatistics) se puede utilizar en múltiples campos, aunque originariamente fue creado para el análisis estadístico en el área de la paleontología. Es un software gratuito que puede descargarse, conjuntamente con el manual de uso, en la dirección <https://folk.uio.no/ohammer/past/>

Con la información que se puede extraer del manual del PAST, y con un procedimiento desarrollado internamente en el departamento de Ingeniería Química y Nuclear de la UPV, se puede determinar la toxicidad de las muestras ensayadas siguiendo los siguientes pasos [19]:

1. Introducir en una hoja de PAST diferentes filas con la media de la longitud de las radículas de cada muestra. Cada fila contendrá 4 datos de longitud, correspondientes a las 4 placas Petri ensayadas por muestra.
2. A continuación se seleccionan los 4 datos y se analiza la normalidad de la serie de datos con la herramienta "Normality Test". Si se obtiene un *p-value* > 0,05 los datos de la muestra presentan una distribución normal. Si *p-value* < 0,05 la distribución de esta no es normal.
3. Repetir el punto 2 en todos los grupos de datos de las diferentes muestras.
4. Para determinar si las muestras son tóxicas o no, se debe evaluar la significancia de sus datos frente a los datos de la muestra de control. Esto se realiza de dos formas distintas, según si los datos seguían una distribución normal o no.
 - a. Si seguían una distribución normal, se seleccionan todos esos datos conjuntamente a los de la muestra de control, y se analizan con la herramienta "Several simple tests" → "Tuckey's pairwise". Las muestras con *p-value* < 0,05 se consideran tóxicas.
 - b. Si no seguían una distribución normal, se seleccionan todos esos datos conjuntamente a los de la muestra de control, y se analizan con la herramienta "Several simple tests" → "Mann-Whitney pairwise". Las muestras con *p-value* < 0,05 se consideran tóxicas.



	B	C	D	E	F	G	H	I
1	•							
2	•							
3	•	Control	p= 0.9656		2g/l na2so4	p= 0.04813		100 ppm + 2g/l na2so4 p= 0.2575
4	•	15.33			13.06			13
5	•	12.53			6.43			12.13
6	•	21.59			13			8.38
7	•	18.37			11.8			8.84
8	•							
9	•							
10	•							

Figura 16 Ejemplo de análisis de los datos con el software. Fuente: Elaboración propia.

Por último, se utilizará el software STATGRAPHICS para definir una correlación numérica entre el % de decrecimiento radicular y las concentraciones de norfloxacin y de electrolito soporte. Lo que se pretende con este software estadístico es encontrar una función válida que relacione nuestras dos variables con el % de decrecimiento. El resultado será representado como una superficie.

A diferencia de lo expuesto para el PAST, en el STATGRAPHICS para su uso se seguirán las instrucciones explicadas por la tutora y la cotutora de este TFG, resumidas en los siguientes pasos:

1. Abrir un nuevo archivo y seguir la siguiente ruta para crear un nuevo diseño experimental: “Avanzado” → “Diseño experimental” → “Crear diseño” → “Multinivelfactorial”.
2. Introducir el número de factores y variables. En nuestro caso 2 factores (concentración de norfloxacin y concentración del electrolito soporte) y una variable (% decrecimiento radicular).
3. Definir los límites inferiores y superiores de los factores.
4. Anotar en la nueva hoja creada todos los datos relativos a las experiencias realizadas.
5. Analizar los datos transcritos. Para esto se debe pulsar en “Avanzado” → “Diseño experimental” → “Analizar diseño”.
6. En este punto, entre otras cosas, se tiene un diagrama de Pareto donde se representa el *p-value* en una línea azul y en los gráficos el efecto aportado por los factores y por combinaciones entre ellos. Todos aquellos efectos que se encuentren por debajo del *p-value* deben desestimarse y quitarse de la ecuación modelizada que aporta el programa. En la figura 17 se muestra un ejemplo de lo descrito en este punto.

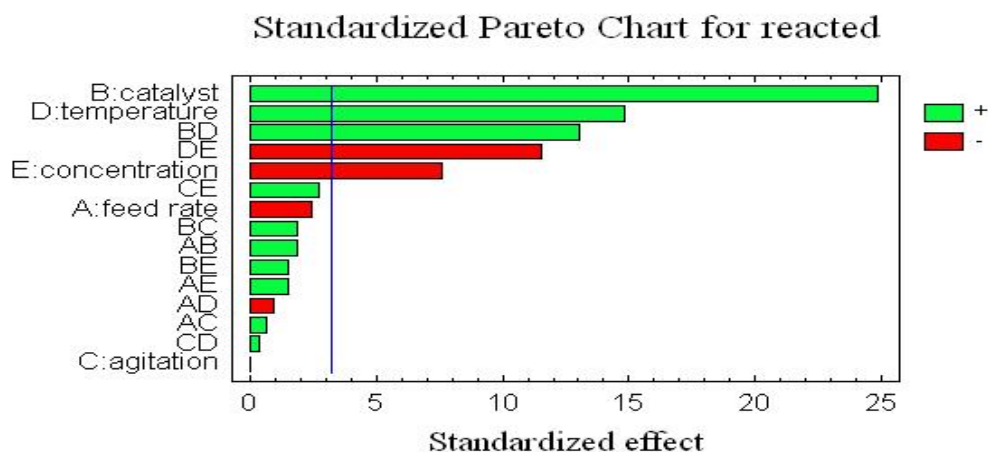


Figura 17 Ejemplo de diagrama de Pareto en el software STATGRAPHICS.
Fuente: <https://statgraphics.net/ejemplos/> [21]

7. Después de eliminar los factores que no tienen efecto sobre la variable, se pasa a estudiar los residuos (diferencia entre los valores predichos por el modelo y los valores reales obtenidos durante la experimentación). Para ello, se dispone de la información suministrada por el gráfico de caja y bigotes de los residuos y el “Resumen estadístico” para los residuos. Especialmente, si los valores del “sesgo estandarizado” y la “Curtosis estandarizada” están fuera del rango [-2 , 2], los datos se consideran no válidos. En ese caso, se deben eliminar los datos cuyos residuos sean más grandes en valor absoluto, y volver a realizar el análisis de los datos.
8. Cuando se obtiene un análisis de los residuos válido, se puede tomar la representación de la superficie y su correspondiente ecuación modelizada como correctas.

Una vez obtenida la ecuación que relaciona el % de decrecimiento radicular con las concentraciones de norfloxacin y electrolito soporte (Na_2SO_4), con ella se pueden definir los intervalos de concentraciones para los que la muestra resulta tóxica.

4.4.7 Ensayos realizados

En este TFG se van a realizar 7 ensayos con este método. Todos los ensayos requieren de una muestra que hace de blanco de referencia. Esta muestra siempre es agua destilada. Además, si las muestras contienen Na_2SO_4 (electrolito soporte), se introducirá otra muestra con un segundo blanco que es una disolución del electrolito soporte en agua a concentración igual que el resto de muestras. Cada uno de los ensayos tiene las siguientes características:

- Ensayo 1: su finalidad es conocer la influencia del pH sobre la toxicidad. Las muestras analizadas contienen 100 ppm de norfloxacin y nada de electrolito soporte. Varía su pH, siendo los valores de 1, 3, 5, 7, 9 y 11, aproximadamente.
- Ensayo 2: su finalidad es conocer la influencia de la concentración del electrolito soporte (Na_2SO_4) sobre la toxicidad. En este caso las muestras tienen un pH entre 6-7, no contienen norfloxacin y sus concentraciones de Na_2SO_4 son 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 g/l.

- Ensayo 3: su finalidad es conocer la influencia de la concentración del norfloxacin sobre la toxicidad. Las muestras tienen un pH entre 6-7, no contienen electrolito soporte y sus valores de concentración de norfloxacin son 50, 100, 150, 200, 350, 500 y 1000 ppm.
- Ensayo 4: su finalidad también es conocer la influencia de la concentración de norfloxacin sobre la toxicidad, pero en este caso en presencia de electrolito soporte; es decir, se combinan los efectos de la concentración de ambos compuestos. Las muestras tienen pH entre 6-7, 2 g/l de Na₂SO₄ y sus concentraciones de norfloxacin son 50, 100, 150, 200, 350, 500 y 1000 ppm.
- Ensayo 5: igual que el ensayo 4, pero con 4 g/l de Na₂SO₄.
- Ensayo 6: igual que el ensayo 4, pero con 6 g/l de Na₂SO₄.
- Ensayo 7: se analiza la toxicidad de muestras tratadas mediante oxidación electroquímica. Se tienen las muestras con el blanco, el blanco con 2 g/l de electrolito soporte, la muestra inicial contaminada (100 ppm de norfloxacin y 2 g/l de electrolito soporte), y una serie de muestras tratadas con oxidación electroquímica sin el uso de membrana. Concretamente se analizan muestras tratadas con electrodos BBD a 1A, 600 mA y 400 mA de intensidad y muestras tratadas con electrodos cerámicos a 1A y 600 mA de intensidad. En cuanto al pH de todas estas muestras se encuentra en el intervalo 5,5-7,5.

En la tabla 2 se muestran las características de las muestras de los ensayos 1 a 6, mientras que en la tabla 3 se muestran las características de las muestras del ensayo 7.

Tabla 2 Características de las muestras de los ensayos 1 a 6. Fuente: elaboración propia.

Ensayo	Muestras		
	[NOR] teórica (ppm)	[Na ₂ SO ₄] (g/L)	pH
Ensayo 1: estudio del efecto del pH	100	0	1,33
	100	0	3,13
	100	0	5,69
	100	0	6,90
	100	0	8,80
	100	0	11,32
Ensayo 2: estudio del efecto de la concentración del electrolito soporte (Na ₂ SO ₄)	0	0,5	6,51
	0	1	7,26
	0	2	6,26
	0	4	7,03
	0	6	6,08
	0	8	6,67
	0	10	6,19
Ensayo 3: estudio del efecto de la concentración de norfloxacin	50	0	6,21
	100	0	6,16
	150	0	6,19
	200	0	6,20
	350	0	6,11
	500	0	6,11
	1000	0	6,05

Tabla 2 Continuación. Características de las muestras de los ensayos 1 a 6. Fuente: elaboración propia.

Ensayo	Muestras		
	[NOR] teórica (ppm)	[Na ₂ SO ₄] (g/L)	pH
Ensayos 4, 5 y 6: estudio del efecto conjunto de la concentración de norfloxacin y Na ₂ SO ₄	50	2	5,80
	100	2	6,21
	150	2	6,14
	200	2	6,08
	350	2	6,09
	500	2	6,09
	1000	2	6,15
	50	4	6,10
	100	4	6,13
	150	4	6,12
	200	4	6,21
	350	4	6,10
	500	4	6,14
	50	6	6,25
	100	6	6,06
	150	6	6,19
	200	6	6,08
	350	6	6,06
	500	6	6,11

Tabla 3 Características de las muestras del ensayo 7. Fuente: elaboración propia.

Ensayo	Muestras	Variables del proceso electroquímico			Características químicas		
		Uso de membrana	Electrodo	Intensidad (mA)	[NOR] (ppm)	[Na ₂ SO ₄] (g/L)	pH
Ensayo 7	Inicial	-	-	-	103,1	2	6,23
	Tratadas mediante oxidación electroquímica	NO	BDD	1000	0,0	2	5,12
				600	0,0	2	5,42
				400	0,9	2	5,13
			Cerámico	1000	2,0	2	6,03
				600	4,0	2	5,77

4.5. Ensayo de toxicidad a través del fenómeno de la bioluminiscencia con el equipo Microtox

4.5.1. Introducción

El Microtox es un equipo empleado para medir la toxicidad de efluentes. Es un fotómetro de alta sensibilidad que determina la toxicidad a través de la bioluminiscencia de la bacteria *Vibrio fischeri*. En la figura 18 se muestra una foto del equipo



Figura 18 Equipo Microtox. Fuente: Elaboración propia.

La bacteria que se usa en este equipo para medir la toxicidad emite luz de forma natural como consecuencia de su metabolismo de respiración. Esta emisión es potente y estable, lo cual la hace óptima para este uso. Cuando esta bacteria se mezcla con sustancias tóxicas se inhibe este proceso de respiración y la emisión de luz pierde intensidad.

El método de uso del Microtox que se expone a continuación se ha desarrollado a partir del manual del propio Microtox y lo explicado por la tutora y cotutora de este TFG.

4.5.2. Materiales y equipos

- Equipo Microtox
- Vasos de precipitados
- NaCl al 22% (ajustador osmótico)
- NaCl al 2% (diluyente)
- Bacteria luminiscente *Vibrio Fischeri*.
- Agua ultrapura (reconstituyente)
- Cubetas
- Micropipetas y puntas de micropipeta

4.5.3. Condiciones de la experimentación

- pH de las muestras entre 5,5 y 8.
- Temperatura de 20°C.
- 15 minutos de tiempo de contacto de las muestras con la bacteria.

4.5.4. Descripción

4.5.4.1. Puesta en marcha del equipo Microtox

Conectar el Microtox a la red eléctrica y esperar unos minutos a que se encienda una luz en la parte frontal. En ese momento se está indicando que ha autoregulado su temperatura y que ya puede ser usado.

4.5.4.2. Preparación del reactivo

En este punto se debe colocar una cubeta en la celda del reactivo, indicada como "Reagent", y pipetear en su interior 1 ml de agua ultrapura. Se saca el vial de las bacterias del congelador, se quita la tapa, y se añade todo el contenido de la cubeta sobre el mismo vial. Se debe homogeneizar correctamente el contenido del vial y finalmente se devuelve a la cubeta del reactivo.

4.5.4.3. Preparación de las cubetas e introducción de la muestra

Se colocan 10 cubetas en 2 filas de 5 cubetas cada una. Cada orificio para las cubetas está identificado como A1, A2, A3, A4, A5, B1, B2, B3, B4 o B5. Se realizan los siguientes pasos sobre las cubetas:

1. Introducir 0,5 ml de NaCl al 2% (a partir de ahora nombrado "diluyente") en las cubetas de la fila B.
2. Añadir 1 ml de diluyente en las cubetas A1, A2, A3 y A4.
3. Introducir 2,5 ml de la muestra a ensayar en la cubeta A5.
4. Añadir 0,25 ml de NaCl al 22% (a partir de ahora "ajustador osmótico") a la cubeta A5 y mezclar el contenido.
5. Trasvasar 1 ml de la cubeta A5 a la A4, y mezclar.
6. Trasvasar 1 ml de la cubeta A4 a la A3, y mezclar.
7. Trasvasar 1 ml de la cubeta A3 a la A2, y mezclar.
8. No se trasvasa de la cubeta A2 a la A1, ya que ésta funciona como control.

4.5.4.4. Introducción del reactivo

Se añade 10 µl de las bacterias (reactivo) a la cubeta B1 y se agita levemente con la mano para asegurar la mezcla. Se hace lo mismo con el resto de las cubetas de la fila B. A continuación se espera 15 minutos para que las bacterias se estabilicen y así conseguir medidas correctas del valor de luz emitida.

4.5.4.5. Toma de valores iniciales

Una vez transcurridos los 15 minutos, se introduce, una a una, las cubetas de la fila B en la celda del fotomultiplicador para realizar una medición de la luz emitida. Cuando se introduce la B1 se pulsa el botón SET y acto seguido el botón READ. Con el resto de cubetas solo se debe apretar el botón READ para conseguir la medida de la luz emitida. De cada una de las cubetas se realizarán 3 mediciones de la luz emitida para poder trabajar con la media de los 3 valores.

4.5.4.6. Puesta en contacto del reactivo con la muestra y toma de valores finales

Se debe trasvasar 0,5 ml de las cubetas de la fila A a las cubetas de la fila B con su mismo número (de la A1 a la B1, de la A2 a la B2, etc.). Se homogeneizan los contenidos de las cubetas de la fila B y se espera 15 minutos a que se estabilicen las bacterias.

Ahora se realizan las mismas operaciones que en el punto 4.5.4.5., a excepción de que no se tiene que pulsar el botón SET, sino directamente el READ.

4.5.4.7. Análisis de los datos y resultados

Los valores tomados se introducen en el software suministrado por el fabricante junto con el equipo Microtox, el cual calcula el valor de la toxicidad en UT

Puede que al medir ciertas muestras aparezcan los siguientes textos como resultado:

- “Se tiene que concentrar”: esto quiere decir que, para que se pueda medir la toxicidad, la muestra debe estar más concentrada. Por esta razón, si aparece este mensaje la muestra se considera no-tóxica.
- “Hormesis”: esto significa que la muestra está teniendo un comportamiento extraño, y debe repetirse la medida.
- "Se tiene que diluir": en este caso hay que repetir la medida diluyendo previamente la muestra, y cuando el software proporcione el valor de la toxicidad en UT, se multiplicará por el factor de dilución aplicado a la muestra.

4.5.5. Ensayos realizados

Se van a realizar 2 ensayos con este método. Ya que uno de los ensayos coincide con el ensayo 7 del método de las semillas, se va a seguir con la numeración ascendente de los ensayos. Cada uno de los 2 ensayos tiene las siguientes características:

- Ensayo 7: Mismas muestras ensayadas en el ensayo 7 del método de las semillas.
- Ensayo 8: Se analiza la toxicidad de muestras tratadas con oxidación electroquímica. Se tienen las muestras con el blanco, el blanco con 14 g/l de electrolito soporte, la muestra inicial contaminada (100 ppm de norfloxacin y 14 g/l de electrolito soporte), y una serie de muestras tratadas con oxidación electroquímica con el uso de membrana. Hay muestras tratadas con electrodos BDD a 1A, 600 mA y 400 mA de intensidad y muestras tratadas con electrodos cerámicos a 1A y 600 mA de intensidad. En cuanto al pH de todas estas muestras se encuentra en el intervalo 5,5-7,5.

En la tabla 4 se muestran las características de las muestras de los ensayos 7 y 8.

Tabla 4 Características de las muestras de los ensayos 7 y 8. Fuente: elaboración propia.

Ensayo	Muestras	Variables del proceso electroquímico			Características químicas		
		Uso de membrana	Electrodo	Intensidad (mA)	[NOR] (ppm)	[Na ₂ SO ₄] (g/L)	pH
Ensayo 7	Inicial	-	-	-	103,1	2	6,23
	Tratadas mediante oxidación electroquímica	NO	BDD	1000	0,0	2	5,12
				600	0,0	2	5,42
				400	0,9	2	5,13
			Cerámico	1000	2,0	2	6,03
				600	4,0	2	5,77

Estudio de la influencia de distintas variables en la toxicidad del norfloxacino. Aplicación a su eliminación mediante oxidación electroquímica.

Tabla 4 Continuación. Características de las muestras de los ensayos 7 y 8. Fuente: elaboración propia.

Ensayo	Muestras	Variables del proceso electroquímico			Características químicas		
		Uso de membrana	Electrodo	Intensidad (mA)	[NOR] (ppm)	[Na ₂ SO ₄] (g/L)	pH
Ensayo 8	Inicial	-	-	-	103,3	14	5,7
	Tratadas mediante oxidación electroquímica	Sí	BDD	1000	0,0	14	7,45
				600	0,0	14	6,3
				400	0,0	14	5,9
			Cerámico	1000	1,3	14	5,6
				600	0,0	14	7,3
				400	17,6	14	5,7

5. EXPOSICIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En este apartado se van a presentar los datos obtenidos de los ensayos realizados, y se van a discutir dichos resultados, incluso realizando un análisis estadístico de los mismos.

5.1. Efecto del pH

La explicación general para poder entender los datos que se muestran en las tablas expuestas a continuación es válida para todos los resultados de los ensayos estáticos de toxicidad aguda por medio de semillas.

En las tablas se verá una casilla con el título “muestra”. Debajo de ella aparecen números del 1 al 20 ordenados ascendentemente, haciendo referencia a cada una de las 20 semillas que se introducen en cada placa Petri.

A la derecha de “muestra” aparecen los nombres de cada una de las muestras que conforman el ensayo. Debajo de cada muestra hay cuatro columnas con valores numéricos. Cada una de estas columnas representa una placa Petri, y el valor de cada casilla muestra el crecimiento radicular, medido en mm, que han tenido las semillas de dicha placa Petri. Si una semilla no germina, en lugar de poner 0mm de crecimiento radicular, se ha dejado la casilla en blanco con el fin de facilitar el cálculo de la media del crecimiento radicular y la desviación estándar (σ), ya que en ellas no se tienen en cuenta las semillas que no han germinado.

En la tabla 5 se muestran los resultados del ensayo 1, cuyo objetivo era estudiar el efecto del pH sobre el crecimiento radicular de las semillas. Se debe apuntar que en esta tabla se presenta una excepción a lo explicado en el párrafo anterior. En la muestra de pH=1,33, en la cual no ha germinado ninguna semilla, se ha indicado este hecho con un 0 en la primera casilla de cada placa Petri. Esto simplemente sirve para evitar confusiones y para que la hoja de cálculo pueda calcular la media del crecimiento radicular, que será igual a cero en este caso.

En la tabla 6 y la figura 19 se pueden ver, respectivamente, los valores de *p-value* y CI_{50} de este ensayo. El modelo de gráfico expuesto en la figura 19 se va a repetir en los diferentes ensayos. Para interpretarlo es necesario saber que:

- La barra de color rojo corresponde al valor de crecimiento radicular de la muestra con agua destilada (control).
- Las barras azules corresponden a los valores de crecimiento radicular del resto de muestras ensayadas.
- La línea roja discontinua marca el CI_{50} , cuyo valor es el 50% del crecimiento radicular de la muestra con agua destilada

Tabla 5 Resultados del crecimiento radicular obtenidos en el ensayo 1 de toxicidad en semillas de "lactuca sativa". Fuente: Elaboración propia.

Muestra	Crecimiento radicular (mm)																											
	Control (agua destilada)				100 ppm + 1,33 pH				100 ppm + 3,13 pH				100 ppm + 5,69 pH				100 ppm + 6,90 pH				100 ppm + 8,80 pH				100 ppm + 11,32 pH			
1	19	21	19	23	0	0	0	0	13	19	16	3	7	11	16	8	15	18	11	2	18	7	11	18	11	14	7	19
2	18	28	16	10					9	15	12	9	6	14	16	6	17	14	18	7	14	6	13	16	11	12	12	18
3	6	32	19	15					6	16	20	9	13	11	19	6	16	15	15	8	13	14	7	16	15	15	20	15
4	27	27	20	16					2	11	8	5	17	12	16	16	13	14	14	15	6	15	12	16	12	8	16	17
5	5	12	15	21					3	21	9	4	7	17	5	6	21	21	16	14	10	6	5	14	14	11	16	22
6	14	19	15	10					4	16	6	4	13	18	12	17	10	14	7	16	11	12	9	17	5	10	17	17
7	19	14	15	20					14	16	6	4	12	7	10	13	16	11	16	13	5	8	15	18	2	7	5	12
8	16	29	16	16					12	6	25	10	5	17	13	15	14	18	16	4	5	13	21	21	6	3	12	11
9	8	22	14	3					11	18	16	4	9	15	11	10	13	14	4	6	11	14	8	19	7	5	8	20
10	19	18	30	2					10	15	10	18	10	16	3	19	17	20	15	15	18	6	11	10	16	8	11	12
11	20	16	19	3					2	6	14	11	8	8	6	13	19	19	13	10	12	13	7	18	10	12	5	18
12	9	7	21	3					3	12	12	2	2	17	5	14	12	13	11	6	5	7	11	15	9	10	16	15
13	14	18	13	5					10	14	10	4	10	14	12	13	6	12	8	13	6		12	19	9	9	12	
14	15	10	5	11					9	15	14	3	4	14	18	12	14	15	21	2	6		6	12	10	10	10	
15	15	9	5	10					3	13	13	2	13	13		15	19	16	16	10	8		15	19	11		13	
16	15	16	10	12						15		8				9	15	16	9	10	12		10	19			12	
17		20	12	23								6					10	10	13	6	10		10					
18		20	15									6					15	18	13	12	10		8					
19			16									8					19	18	14									
20																			13									
			Media	15,36			Media	0,00			Media	10,00			Media	11,57			Media	13,28			Media	11,86			Media	11,75
			σ	6,77			σ	0,00			σ	5,47			σ	4,41			σ	4,43			σ	4,57			σ	4,48

Tabla 6 Valores de *p*-value obtenidos en el ensayo 1 de toxicidad en semillas de "lactuca sativa".
Fuente: Elaboración propia.

Muestra	<i>p</i> -value
100 ppm + 1,33 pH	-
100 ppm + 3,13 pH	0,2041
100 ppm + 5,69 pH	0,5182
100 ppm + 6,90 pH	0,9216
100 ppm + 8,80 pH	0,5980
100 ppm + 11,32 pH	0,6255

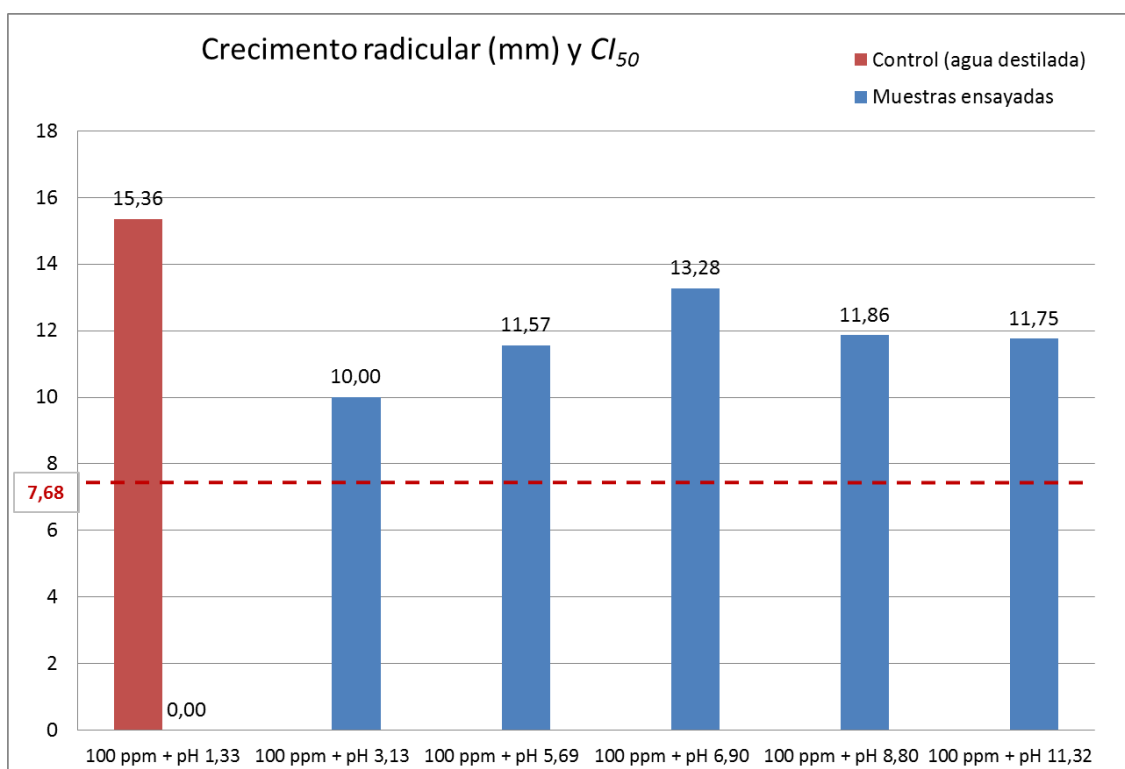


Figura 19 Crecimiento radicular y CI_{50} en del ensayo 1 de toxicidad en semillas de "lactuca sativa"
Fuente: Elaboración propia.

Aunque no existe la posibilidad de determinar a partir de qué valor de pH las muestras se consideran tóxicas, sí se observa claramente cómo la muestra de pH 1,33 es muy tóxica (no germina ninguna semilla) y que el resto de muestras no son tóxicas, ya que sus valores de *p*-value son mayores que 0,05. Además, la muestra cuyo crecimiento radicular se parece más al del control de agua destilada es la muestra de pH 6,90. Estos resultados están acorde en cuanto a lo descrito sobre los rangos biológicamente activos mostrados en la bibliografía existente.

Una de las conclusiones que se obtiene de este ensayo es que el rango de pH óptimo para el resto de ensayos será de 6 a 7. Esta decisión se toma con la información obtenida en el ensayo 1, sabiendo que el pH del agua destilada que se usa es cercano a 6, y con el fin de obtener un valor de pH que influya lo menos posible en el grado de toxicidad de las muestras (y así no se enmascare el efecto de otras variables).

5.2. Efecto de la concentración del electrolito soporte: Na_2SO_4

En el ensayo 2 lo que se quiere estudiar es el efecto de la concentración de Na_2SO_4 sobre la toxicidad. Conocer el efecto de esta sustancia es importante, ya que más tarde se analizarán muestras tratadas electroquímicamente, y este tratamiento electroquímico supone el uso de Na_2SO_4 como electrolito soporte. Las mediciones del crecimiento radicular obtenidas en este segundo ensayo se muestran en la tabla 7.

Tabla 7 Resultados obtenidos en el ensayo 2 de toxicidad en semillas de "lactuca sativa". Fuente: Elaboración propia.

Muestra	Crecimiento radicular (mm)																																			
	Control (agua destilada)				0,5 g/l Na ₂ SO ₄				1 g/l Na ₂ SO ₄				2 g/l Na ₂ SO ₄				4 g/l Na ₂ SO ₄				6 g/l Na ₂ SO ₄				8 g/l Na ₂ SO ₄				10 g/l Na ₂ SO ₄							
1	11	20	10	18	19	7	13	20	16	3	9	7	14	10	10	7	3	3	10	12	2	3	3	3	0	0	5	0	0	0	0	0				
2	8	12	8	13	13	4	5	19	7	6	8	8	10	14	5	5	7				2	3	3	3			3									
3	7		5	5	5			23		9				3	12				13	4	6		3													
4	11	22	8	14	25	4	11	27	11	3		9	13	9	7	12	5																			
5	18	7	13	15	5	7	9	16	3	4	4	11	11	6	10	6			6	5	2		4	4												
6	7		4	4	9			7	1	7				5	9		6																			
7	8	20	12	29	6	5	8	22	9	4	9	14	8	12	14	5			3	4	3		2	6												
8	10	13	5	22	8	3	8	23	8	5	3	4	14	5	13	8	5				1			6												
9	3			4				9		3				4	9		1			3	5		5													
10	15	21	11	10	15	6	10	22	10	9		2	9	10	12	8	4																			
11	12	19	6	9	3	3	12	18		4	3	9	10	6	12	4					3		4	3												
12	3	19		2											6	2																				
13	18	10	5	8	8	7	9	9	5	10	5	15	9	12	8	4								4												
14	7	11	6	14	9	3	8	17		9		8	3	7	16	7																				
15	18	7		3								4	5			2								5												
16	9		9	13	24	4	10	20	7	6	3	10		11	15	3																				
17				8	8	4		9		8				4	13	5																				
18																																				
19							4																													
20																																				
				Media	11,02			Media	10,98			Media	6,93			Media	8,45			Media	5,67			Media	3,84			Media	1,60			Media	0,00			
				σ	5,90			σ	6,82			σ	3,47			σ	3,71			σ	3,25			σ	1,55			σ	2,30			σ	0,00			

Para obtener una información más detallada se necesita del cálculo del CI_{50} y el p -value, cuyos valores se indican en la tabla 8 y la figura 20, respectivamente. En la figura 20 se ha representado la línea roja discontinua que marca el límite del CI_{50} (en este caso corresponde a 5,5mm de crecimiento radicular).

Tabla 8 Valores de p -value obtenidos en el ensayo 2 de toxicidad en semillas de "lactuca sativa".
Fuente: Elaboración propia.

Muestra	p -value
0,5 g/l Na_2SO_4	0,1124
1 g/l Na_2SO_4	0,0606
2 g/l Na_2SO_4	0,3123
4 g/l Na_2SO_4	0,0606
6 g/l Na_2SO_4	0,0304
8 g/l Na_2SO_4	0,0265
10 g/l Na_2SO_4	0,0211

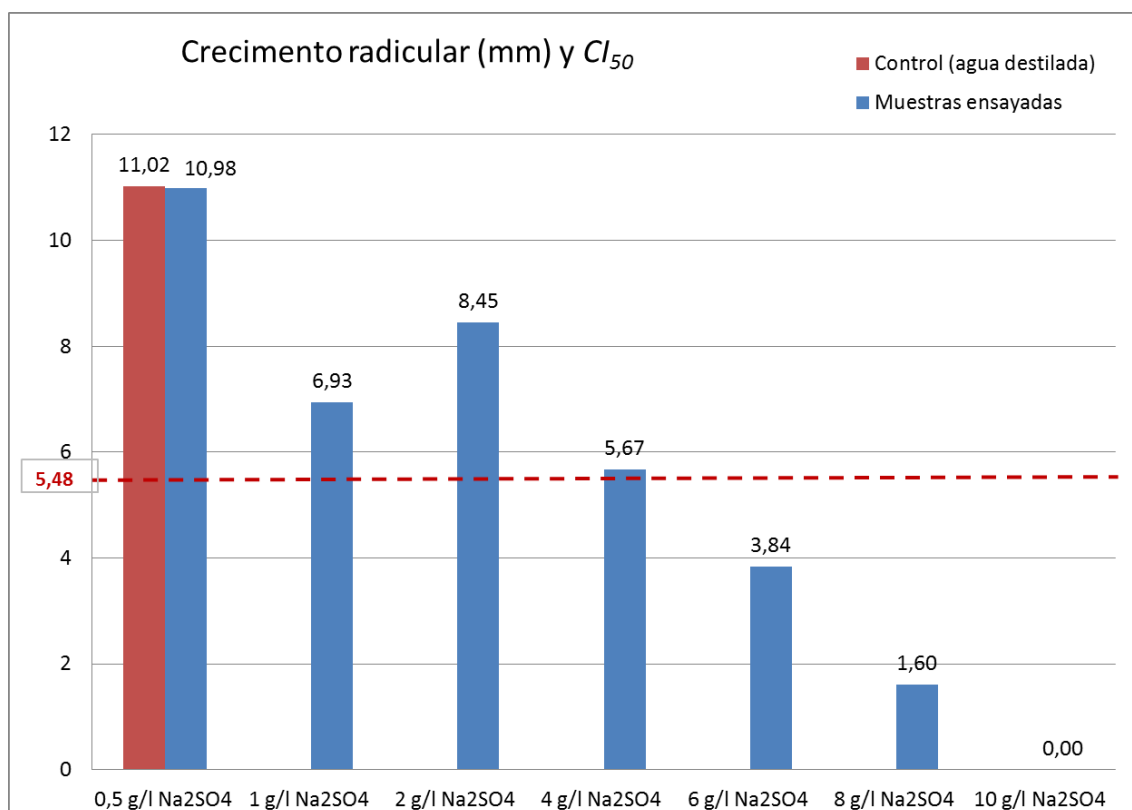


Figura 20 Crecimiento radicular y CI_{50} del ensayo 2 de toxicidad en semillas de "lactuca sativa".
Fuente: Elaboración propia.

Tal y como se ve en la tabla 8, los p -value para 6, 8 y 10 g/l de Na_2SO_4 son inferiores a 0,05, por lo que se consideran tóxicas estas muestras. Esto se confirma en la figura 20, ya que el crecimiento radicular para estas muestras es inferior al CI_{50} . Además, en general se observa cómo a medida que aumenta la concentración del electrolito soporte, aumenta la inhibición en

el crecimiento de la radícula de las semillas y así aumenta la toxicidad de las muestras. El caso límite es para 10 g/l de Na_2SO_4 , donde se inhibe totalmente el crecimiento radicular.

Por otro lado, si se representan los datos de crecimiento radicular en una gráfica y se obtiene una recta de tendencia, se puede calcular a partir de qué valor de concentración de Na_2SO_4 se consideraría tóxico un efluente. Esto lo vemos representado en la figura 21, donde el valor límite de concentración de sulfato sódico a partir del cual un efluente resultaría tóxico es de 4,82 g/l de Na_2SO_4 . Este valor se ha calculado al hacer intersectar la línea de tendencia con la línea horizontal correspondiente al Cl_{50} ; cabe indicar que para obtener la línea de tendencia no se han tenido en cuenta aquellos puntos que no se ajustaban bien.

Por tanto, el resto de ensayos no tendrán una concentración de electrolito soporte superior a 6 g/l, ya que para este valor las muestras son tóxicas incluso en ausencia de norfloxacin.

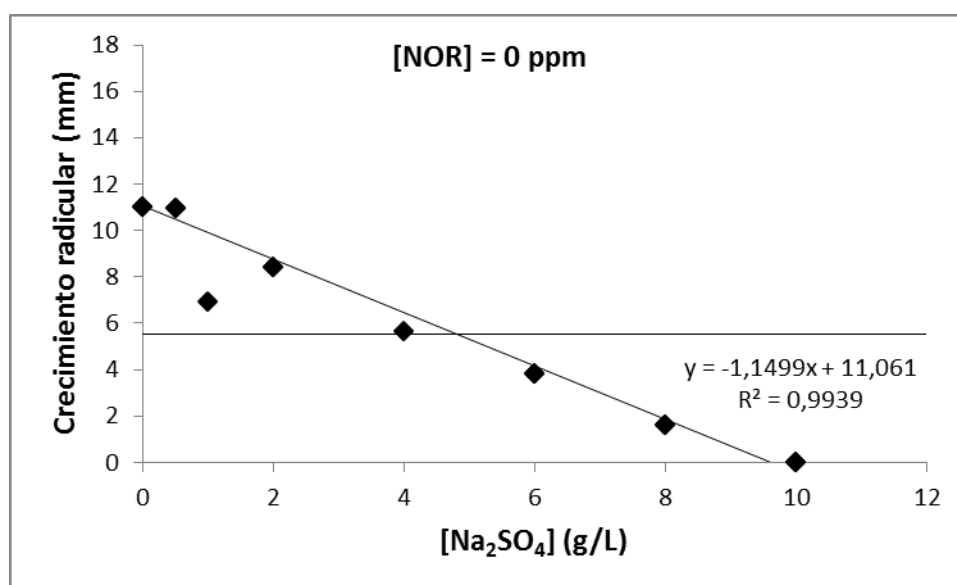


Figura 21 Crecimiento radicular frente a concentración de Na_2SO_4 . Fuente: Elaboración propia.

5.3. Efecto de la concentración de norfloxacin

En el ensayo 3, donde las muestras empleadas están formadas por disoluciones de norfloxacin a distintas concentraciones, lo que se pretende averiguar es el efecto de la concentración de norfloxacin sobre la toxicidad. Con este efecto, y juntamente con el efecto de la concentración del electrolito soporte, se podrá analizar si ambos juntos presentan sinergia, o no, en cuanto a la toxicidad. El estudio de la posible sinergia se llevará a cabo en el siguiente apartado (punto 5.4 del presente TFG).

En la tabla 9 se muestran las concentraciones reales de norfloxacin de las muestras frente a las teóricamente preparadas. Estas concentraciones reales se han calculado con la recta de calibrado correspondiente a la ecuación (1), a partir del valor de absorbancia medido con el espectrofotómetro UV-visible a la longitud de onda de 277 nm y cuyo valor también se indica en

la tabla para cada muestra; a continuación, para su cálculo también se ha tenido en cuenta el factor de dilución aplicado.

*Tabla 9 Concentraciones de norfloxacin teóricas y reales del ensayo 3.
Fuente: Elaboración propia.*

[NOR] teórica (ppm)	Factor de dilución	Absorbancia (277 nm)	[NOR] real (ppm)
0	0	0	0,0
50	1:5	1,093	41,1
100	1:5	2,265	93,2
150	1:50	0,354	135,9
200	1:50	0,471	177,8
350	1:50	0,814	331,2
500	1:50	1,134	487,9
1000	1:50	2,274	916,2

Al medir la concentración de norfloxacin, además de conocer su valor concreto, se confirma el supuesto de que las pastillas de las que se parte para preparar la disolución madre no contienen solo norfloxacin y, además, se comprueba que no ha existido un error grave durante la experimentación.

En la tabla 10 se presentan los resultados de las mediciones del crecimiento radicular del ensayo 3.

Tabla 10 Resultados del crecimiento radicular obtenidos en el ensayo 3 de toxicidad en semillas de "lactuca sativa". Fuente: Elaboración propia.

Muestra	Crecimiento radicular (mm)																																	
	Control (agua destilada)				50 ppm				100 ppm				150 ppm				200 ppm				350 ppm				500 ppm				1000 ppm					
1	14	16	22	4	5	20	6	6	6	5	2	16	8	6	4	5	6	13	8	7	10	10	13	4	4	6	4	7	5	2	5	2		
2	6	21	4	4	4	8	4	4	6	3	4	14	4	15	10	5	4	5	9	10	2	5	9	7	3	5	4	10	4	2	4	2		
3	14	15	5	9	3	17	13	8	4	4	7	12	4	2	10	3	8	4	4	11	3	14	2	8	4	3	13	7	5	2	4	2		
4	17	13	5	10	5	5	3	2	9	5	5	16	5	11	9	4	8	8	5	2	3	4	16	3	2	4	4	9	2	2	4	2		
5	9	6	5	4	6	2	5	2	12	15	8	5	3	15	3	4	7	6	6	4	7	2	13	9	4	3	3	2	2	2	2	2		
6	10	4	18	9	2	3	6	3	10	22	7	5	4	10	5	17	6	11	12	3	16	4	2	5	4	5	4	2	2	2	5	2		
7	5	12	9	11	18	5	13	6	3	6	2	4	11	2	12	3	2	8	5	2	7	4	2	3	12	4	6	2	2	2	3	2		
8	10	16	17	5	4	16	2	9	5	3	7	7	2	3	8	6	5	5	7	8	5	2	2	3	2	13	2	2	3	2	4	2		
9	14	21	14	4	8	3	2	3	9	3	5	10	2	8	5		5	9	8	4	8	3	9	2	2	2	2	4	2	2	4	2		
10	23	20	21	5	13	3	2	2	13	13	5	23	2	4	3		5	6	6	6	2	2	5	2	2	2	2	7	2	2	2	2		
11	16	21	9	2	8	3	2	2	5	19	2	25	2	18	13		10	9	12	9	2	2	5	2	2	2	2	8	2	2	4	2		
12	21	19	6	2	5	3		2	4	8	4	2		3	4		10	2	16	6	2	2	2	2	2	2	2	7	2	2	4	2		
13	9	5	5	2	13	6			4	2	2	3		3	5		4	2	12	5	3	2	2	2	2		2	2	2	4	2			
14	14	7	16	2	7				2	2	2	2		11	5		4	2	2	9	2	2	2	2	2		2	2	2	2	2	2		
15		22	8	2	5				2			14		23			12		2	8	10	2	2	2	2		2		2	7				
16		14		2	13				2			15					9		8	16	15			2	2		11			2	2			
17		12			9				2			15					6		7	2	3			5						2	4			
18		23															2			3										2	3			
19																	2															5		
20																																		
				Media	10,95			Media	6,21			Media	7,26			Media	6,75			Media	6,60			Media	4,83			Media	4,18			Media	2,66	
				σ	6,56			σ	4,64			σ	5,76			σ	4,89			σ	3,43			σ	3,98			σ	3,03			σ	1,15	

Los datos de la tabla 10 muestran que, en general, existe una relación inversa entre el aumento de la concentración de norfloxacino y el crecimiento radicular de las semillas.

Para obtener conclusiones más concretas debe observarse el *p-value* y el CI_{50} del crecimiento radicular. Estos valores se muestran en la tabla 11 y la figura 22, respectivamente.

Tabla 11 Valores de *p-value* obtenidos en el ensayo 3 de toxicidad en semillas de "lactuca sativa".
Fuente: Elaboración propia.

Muestra	<i>p-value</i>
50 ppm	0,0615
100 ppm	0,2719
150 ppm	0,1140
200 ppm	0,1350
350 ppm	0,0103
500 ppm	0,0043
1000 ppm	0,0003

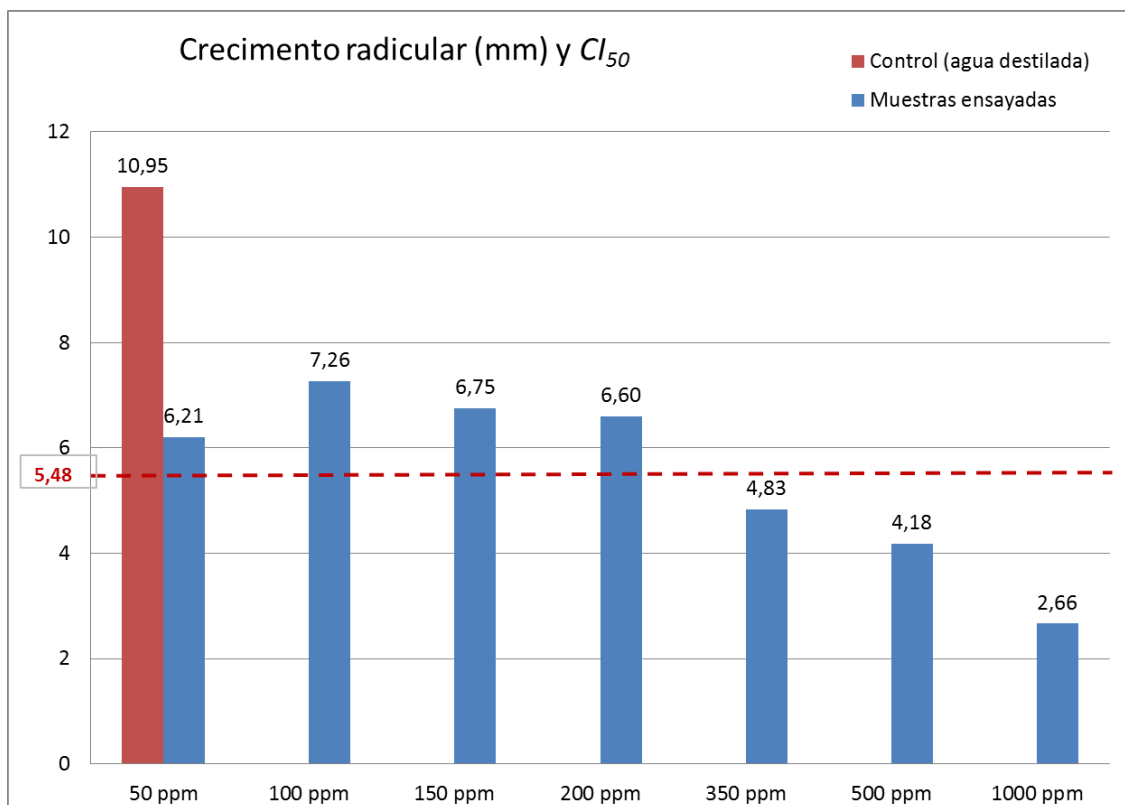


Figura 22 Crecimiento radicular y CI_{50} del ensayo 3 de toxicidad en semillas de "lactuca sativa".
Fuente: Elaboración propia.

En este caso, los dos parámetros indican que las muestras hasta 200 ppm de norfloxacino no son tóxicas (*p-value* > 0,05 y crecimiento radicular superior al CI_{50}), y a partir de los 350 ppm ya se consideran tóxicas (*p-value* < 0,05 y crecimiento radicular inferior al CI_{50}).

En la figura 23 se muestra cómo se puede considerar inversamente proporcional la relación entre la concentración de norfloxacino y el crecimiento radicular. Además, se ha obtenido una línea de tendencia para calcular el valor de la concentración de norfloxacino a

partir de la cual se consideraría tóxico un efluente. Para obtener dicha línea de tendencia no se han tenido en cuenta aquellos puntos que no se ajustaban bien y se han utilizado los valores reales de concentración de norfloxacin indicados en la tabla 10.

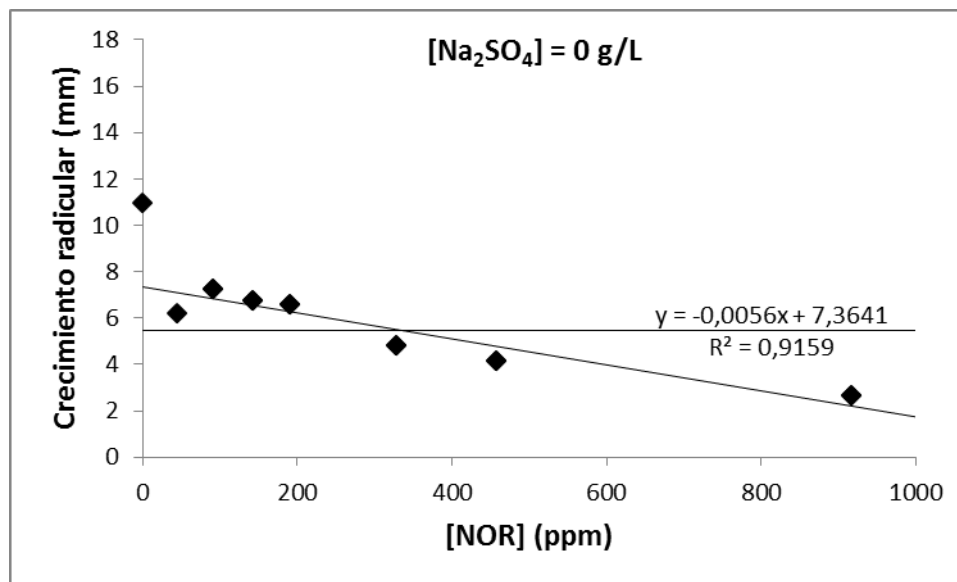


Figura 23 Crecimiento radicular frente a concentración de norfloxacin. Fuente: Elaboración propia.

Con la ecuación obtenida que relaciona la concentración de norfloxacin con el crecimiento radicular, al hacerla intersectar con la línea horizontal correspondiente al CI_{50} , se puede concluir que la concentración límite a partir de la cual se consideran tóxicas las muestras es 336 ppm de norfloxacin (sin presencia del electrolito soporte).

5.4. Efecto conjunto de la concentración de norfloxacin y Na_2SO_4

En este apartado se van a analizar los resultados de los ensayos 4, 5 y 6, en los cuales se han utilizado muestras con diferentes concentraciones de norfloxacin y de electrolito soporte. Se va a proceder a exponer los resultados de los ensayos por separado y a estudiar la posible sinergia de los efectos de las concentraciones de ambas sustancias en la toxicidad.

En la tabla 12 se indican las concentraciones reales de norfloxacin para el ensayo 4, y al igual que en el ensayo anterior se confirma que no ha habido errores durante la experimentación. Estas concentraciones reales se han calculado con la recta de calibrado correspondiente a la ecuación (1), a partir del valor de absorbancia medido con el espectrofotómetro UV-visible a la longitud de onda de 277 nm y cuyo valor también se muestra en la tabla para cada muestra; a continuación, para su cálculo también se ha tenido en cuenta el factor de dilución aplicado.

Tabla 12 Concentraciones de norfloxacino teóricas y reales del ensayo 4.
Fuente: Elaboración propia.

[NOR] teórica (ppm)	Factor de dilución	Absorbancia (277 nm)	[NOR] real (ppm)
0	0	0	0,0
50	1:5	1,046	42,1
100	1:5	2,022	81,5
150	1:50	0,353	142,2
200	1:50	0,418	168,4
350	1:50	0,795	320,3
500	1:50	1,116	449,6
1000	1:50	2,115	852,1

En la tabla 13 se presentan los resultados de las mediciones del crecimiento radicular del ensayo 4, que corresponden al estudio del efecto de la concentración del norfloxacino para una concentración de electrolito soporte de 2 g/l.

Estudio de la influencia de distintas variables en la toxicidad del norfloxacin. Aplicación a su eliminación mediante oxidación electroquímica.

Tabla 13 Resultados del crecimiento radicular obtenidos en el ensayo 4 de toxicidad en semillas de "lactuca sativa". Fuente: Elaboración propia.

Muestra	Crecimiento radicular (mm)																																				
	Control (agua destilada)				2g/l Na ₂ SO ₄ + 0 ppm				2g/l Na ₂ SO ₄ + 50 ppm				2g/l Na ₂ SO ₄ + 100 ppm				2g/l Na ₂ SO ₄ + 150 ppm				2g/l Na ₂ SO ₄ + 200 ppm				2g/l Na ₂ SO ₄ + 350 ppm				2g/l Na ₂ SO ₄ + 500 ppm				2g/l Na ₂ SO ₄ + 1000 ppm				
1	32	13	20	29	8	10	5	24	8	11	19	5	5	5	11	2	4	14	15	8	4	4	11	9	17	4	9	4	4	2	2	3	2	3	1	1	
2	20	3	4	23	7	7	10	21	4	14	10	16	5	7	7	12	4	13	17	10	16	11	3	8	15	3	10	5	6	3	5	5	1	3	1	1	
3	32	4	12	32	14	19	7	16	10	7	16	5	4	17	12	8	8	6	9	11	15	5	5	7	15	4	11	6	7	8	11	7	1	4	1	1	
4	33	9	11	16	15	15	10	20	11	11	17	8	4	4	14	4	4	15	16	4	15	4	4	4	15	3	15	7	12	10	11	7	1	4	1	1	
5	26	9	3	25	6	19	12	19	15	9	12	13	4	14	18	6	5	10	10	3	3	4	6	11	10	3	4	4	3	13	3	2	1	2	1	1	
6	11	5	3	35	7	6	18	16	11	9	3	16	11	15	6	14	3	13	7	14	4	5	7	2	14	2	5	3	2	3	3	1	2	1	1		
7	11	10	12	26	9	21	16	4	4	4	15	16	3	16	15	15	13	7	3	14	2	2	5	5	12	2	2	2	5	3	5	1	2	1	1		
8	30	5	22	33	20	5	9	20	3	4	16	15	17	9	7	12	9	8	2	10	14	10	4	19	2	10	2	7	6	5	1	1	1	1			
9	18	5	12	24	16	9	17	9	4	10	3	13	18	6	7	13	6	8	15	4	2	6	18	19	2	14	4	7	3	3	1	1	1	1			
10	23	14	14	30	14	7	17	5	4	18	6	6	6	16	3	14	7	11	15	5	10	12	17	2	5	4	8	2	4	1	1	1	1				
11	22	15	6	23	6	6	7	8	7	12	4	8	13	3	4	5	4	3	16	11	2	8	3	4	2	4	1	1	1	1	1	1	1				
12	21	22	6	8	3	15	12	8	8	9	4	9	4	5	4	12	5	9	14	14	2	4	2	7	2	7	1	1	1	1	1	1	1				
13	20	5	4	26	3	6	11	11	14	6	5	9	12	2	16	15	11	2	12	4	9	2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
14	19	10	9	20	17	15	11	6	24	3	5	4	15	3	11	7	2	2	4	11	2	7	4	11	2	7	1	1	1	1	1	1	1				
15	22			24	5	6	6	5	4	11	4	16	4	12	14	2	2	3	3	7	4	12	14	2	2	3	3	7	1	1	1	1	1				
16	20			31		3				3	3	3	3	4	5	5	3	13																			
17				30		3				3																											
18				21																																	
19				5																																	
20																																					
				Media	17,27			Media	11,24			Media	9,80			Media	8,76			Media	8,48			Media	7,67			Media	7,79			Media	4,98			Media	1,23
				σ	9,59			σ	5,77			σ	5,19			σ	4,85			σ	4,56			σ	4,76			σ	5,45			σ	3,05			σ	0,67

Con los datos de la tabla 13 se pueden confirmar las tendencias observadas en los ensayos anteriores, en los cuales se ha visto que con la presencia del norfloxacin o del Na_2SO_4 se inhibe el crecimiento de las radículas de las semillas.

Para obtener conclusiones más concretas se necesita del análisis del *p-value* y el CI_{50} del crecimiento radicular, que aparecen en la tabla 14 y la figura 24 respectivamente:

Tabla 14 Valores de *p-value* obtenidos en el ensayo 4 de toxicidad en semillas de "lactuca sativa".

Fuente: Elaboración propia.

Muestra	<i>p-value</i>
2g/l Na_2SO_4 + 0 ppm	0,8852
2g/l Na_2SO_4 + 50 ppm	0,3123
2g/l Na_2SO_4 + 100 ppm	0,1939
2g/l Na_2SO_4 + 150 ppm	0,1124
2g/l Na_2SO_4 + 200 ppm	0,0606
2g/l Na_2SO_4 + 350 ppm	0,0454
2g/l Na_2SO_4 + 500 ppm	0,0304
2g/l Na_2SO_4 + 1000 ppm	0,0294

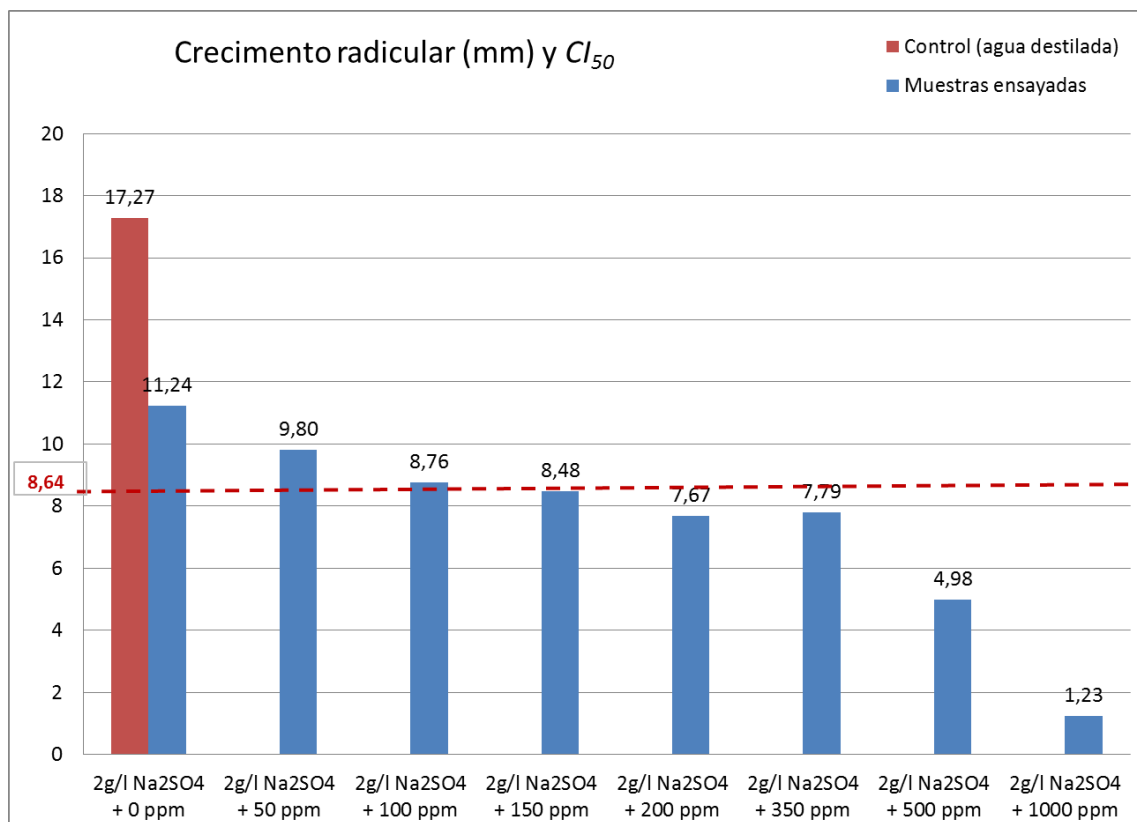


Figura 24 Crecimiento radicular y CI_{50} del ensayo 4 de toxicidad en semillas de "lactuca sativa".

Fuente: Elaboración propia.

Según la figura 24 y la tabla 14 se puede decir que las muestras hasta 100 ppm de norfloxacin no se pueden considerar tóxicas, y que las de 150 ppm y concentraciones superiores sí lo son, ya que hasta 100 ppm el crecimiento radicular se encuentra por encima del Cl_{50} , mientras que para concentraciones superiores de norfloxacin dicho crecimiento radicular se encuentra por debajo del Cl_{50} . Sin embargo, en la tabla 14 puede verse que los valores de *p-value* de las muestras de 150 y 200 ppm son 0,1124 y 0,0606, respectivamente, ambos mayores que 0,05, con lo cual deberían considerarse no tóxicas. Es decir, para esas muestras ambos indicadores son contradictorios en su resultado, aunque el *p-value* de la muestra de 200 ppm se encuentra muy cercano al límite. De esta forma, se puede concluir que hasta 100 ppm de norfloxacin las muestras son no-tóxicas y las de 200 ppm y superiores son tóxicas, quedando sin definir la toxicidad para la muestra de 150 ppm.

Por otro lado, lo que si queda claro es que a las mismas concentraciones de norfloxacin, las muestras que contienen 2 g/l de Na_2SO_4 inhiben más el crecimiento de las radículas, incluso llegando a ser tóxicas algunas de las muestras que no lo eran en el caso en que no había presencia del electrolito soporte (como la de 200 ppm).

En la figura 25 se plasma la ecuación que rige la relación del crecimiento radicular con la variación de la concentración de norfloxacin, dejando fija la concentración del electrolito soporte en 2 g/l. Para obtener dicha línea de tendencia no se han tenido en cuenta aquellos puntos que no se ajustaban bien y se han utilizado los valores reales de concentración de norfloxacin indicados en la tabla 12.

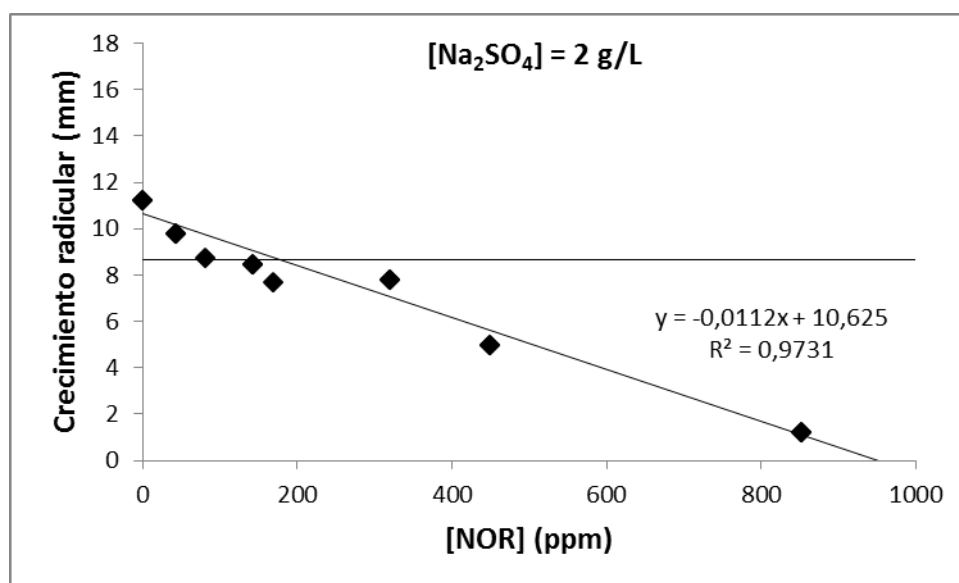


Figura 25 Crecimiento radicular frente a concentración de norfloxacin en ensayo 4. Fuente: Elaboración propia.

Se destaca que en estas condiciones, es decir, en presencia de 2 g/l de Na_2SO_4 , a partir de una concentración de 178 ppm de norfloxacin se considerarían tóxicas las muestras. De esta forma, la muestra de 150 ppm, que estaba en duda, se consideraría no-tóxica. El valor límite calculado de nuevo se ha obtenido al hacer intersectar la recta de tendencia de la figura 25 con la línea horizontal correspondiente al Cl_{50} .

Se pasa ahora a comentar el ensayo 5, en el que se analiza el efecto de la concentración de norfloxacin sobre la toxicidad para una concentración de electrolito soporte de 4 g/l. Se

debe puntualizar que éste debió repetirse ya que se detectaron errores experimentales localizados, pero se perdió la confianza en el resto de las mediciones de ese mismo ensayo. Estos errores fueron detectados cuando se midieron las concentraciones reales de norfloxacin, cuyos resultados se muestran en la tabla 15.

Tabla 15 Concentraciones de norfloxacin teóricas y reales del primer intento del ensayo 5. Fuente: Elaboración propia.

[NOR] teórica (ppm)	Factor de dilución	Absorbancia (277 nm)	[NOR] real (ppm)
0	0	0	0,0
50	1:10	0,521	42,0
100	1:10	1,097	88,4
150	1:10	1,611	129,8
200	1:10	2,143	172,7
350	1:50	1,004	404,5
500	1:50	0,856	344,9

Como puede verse en la tabla 15 los datos para 350 y 500 ppm no concuerdan. Aunque parece que se cruzaron las identificaciones de ambas muestras, se prefirió repetir el ensayo para despejar posibles dudas. Los resultados válidos del ensayo 5 se muestran en la tabla 16.

Tabla 16 Concentraciones de norfloxacin teóricas y reales del ensayo 5 válido. Fuente: Elaboración propia.

[NOR] teórica (ppm)	Factor de dilución	Absorbancia (277 nm)	[NOR] real (ppm)
0	0	0	0,0
50	1:10	0,593	47,8
100	1:10	1,182	95,2
150	1:10	1,766	142,3
200	1:10	2,272	183,1
350	1:50	0,849	342,1
500	1:50	1,185	477,4

En la tabla 17 se presentan los resultados de las mediciones del crecimiento radicular del ensayo 5.

Estudio de la influencia de distintas variables en la toxicidad del norfloxacin. Aplicación a su eliminación mediante oxidación electroquímica.

Tabla 17 Resultados del crecimiento radicular obtenidos en el ensayo 5 de toxicidad en semillas de "lactuca sativa". Fuente: Elaboración propia.

Muestra	Crecimiento radicular (mm)																																
	Control (agua destilada)				4g/l Na ₂ SO ₄ + 0 ppm				4g/l Na ₂ SO ₄ + 50 ppm				4g/l Na ₂ SO ₄ + 100 ppm				4g/l Na ₂ SO ₄ + 150 ppm				4g/l Na ₂ SO ₄ + 200 ppm				4g/l Na ₂ SO ₄ + 350 ppm				4g/l Na ₂ SO ₄ + 500 ppm				
1	28	16	13	15	9	9	16	9	15	10	12	3	12	10	4	12	5	6	6	5	4	8	7	4	4	4	11	3	4	4	3	4	
2	24	22	5	19	7	8	11	10	5	6	2	12	2	2	4	5	7	3	12	5	5	3	2	11	7	3	6	2	3	6	2		
3	26	12	14	9	4	4	3	11	3	4	3	13	10	7	6	4	3	3	10	4	9	8	5	8	7	2	2	7	4	11	3		
4	7	5	14	17	15	11	6	9	15	13	3	11	2	10	4	10	10	3	9	4	3	5	6	6	4	2	3	6	2	3			
5	8	10	21	6	3	9	5	9	4	12	8	3	9	12	3	14	3	7	5	14	3	5	4	10	3	5	8	2	8				
6	19	4	11	4	11	12	4	8	15	11	4	12	4	3	2	3	5	3	11	5	3	3	15	4	3	4	3						
7	21	13	21	20	10	2	9	14	6	11	3	13	13	3			6	3	11	4	3	4	15	3	7	4							
8	25	17	11	15	5	12	5	10	7	2		3	5	3			2	4	5	4	10	3	3	3									
9	21	5	10	8	5	5	4	10	9	6		4	2	8			9			4	4		4	5									
10	13	6	16	8	2	6	6	14		3		3	7	2			3																
11	11	12		11	2	7		10				3	4	4			4																
12	5	4		4				10				3		4			4																
13	2	7		5				13				2					6																
14	17	8		16				13				3					6																
15	2	3		6				7				3																					
16	2	17		2								11																					
17																																	
18																																	
19																																	
20																																	
				Media	11,95			Media	8,17			Media	7,00			Media	5,97			Media	5,72			Media	5,65			Media	4,60			Media	4,21
				σ	6,95			σ	3,66			σ	4,43			σ	3,74			σ	2,93			σ	3,29			σ	2,37			σ	2,39

En un primer análisis de los datos, se observa, como era de esperar por los ensayos realizados hasta el momento, que el norfloxacino y el electrolito soporte inhiben el crecimiento de las radículas de las semillas. Además, al tener ahora una mayor concentración del electrolito soporte, se ve un mayor decrecimiento en el tamaño de las radículas.

Para obtener mayores conclusiones más afinadas se analiza el *p-value* y el CI_{50} del crecimiento radicular, que se presentan en la tabla 18 y en la figura 26, respectivamente.

Tabla 18 *p-value* ensayo 5. Fuente: Elaboración propia.

Muestra	<i>p-value</i>
4g/l Na ₂ SO ₄ + 0 ppm	0,1124
4g/l Na ₂ SO ₄ + 50 ppm	0,1035
4g/l Na ₂ SO ₄ + 100 ppm	0,0607
4g/l Na ₂ SO ₄ +150 ppm	0,0304
4g/l Na ₂ SO ₄ + 200 ppm	0,0150
4g/l Na ₂ SO ₄ + 350 ppm	0,0078
4g/l Na ₂ SO ₄ + 500 ppm	0,0070

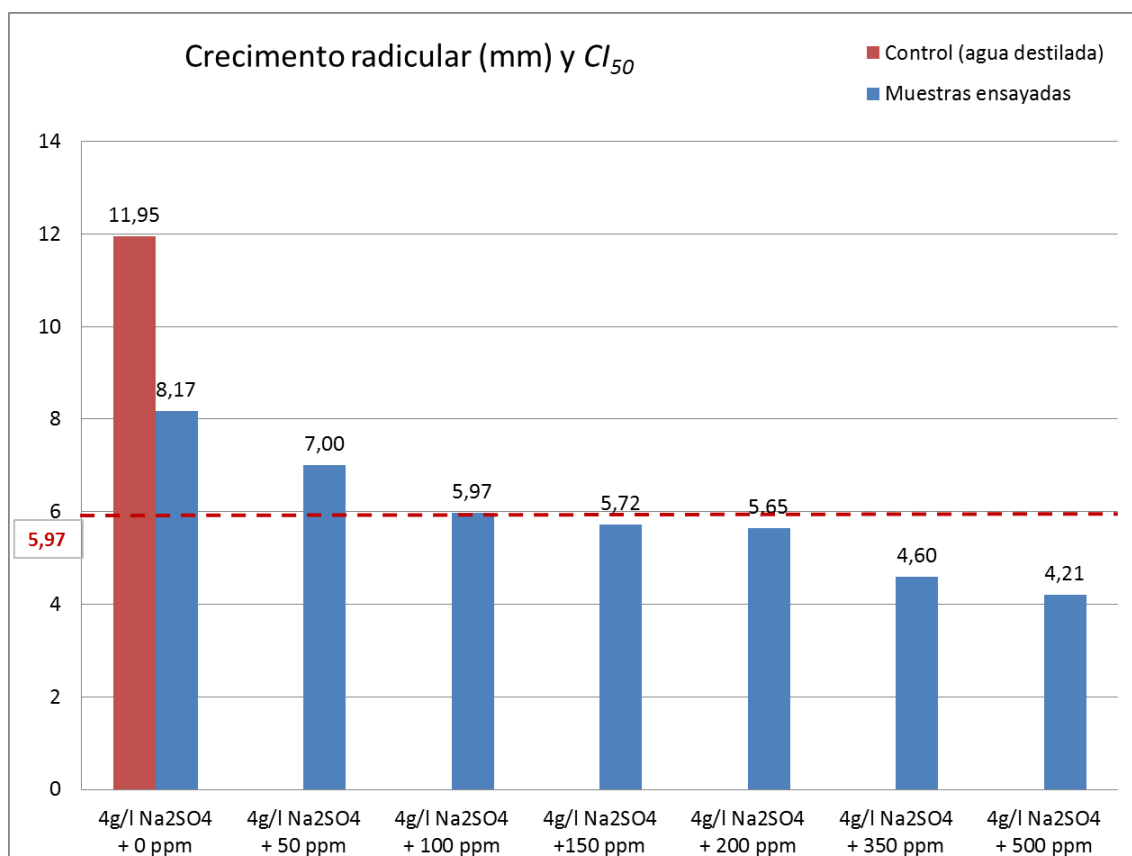


Figura 26 Crecimiento radicular y CI_{50} del ensayo 5 de toxicidad en semillas de "lactuca sativa".

Fuente: Elaboración propia.

Fijándose en el Cl_{50} la primera muestra tóxica es la de 150 ppm (aunque cerca del valor de no-toxicidad), y la de 100 ppm se encuentra justo en el 50% de crecimiento del control. Mirando el p -value la muestra de 100 ppm no es tóxica, ya que su valor es de 0,0607 (0,05).

Para finalizar con este ensayo se puede prestar atención a la figura 27, donde se muestra la ecuación que define la relación del crecimiento radicular con la variación de la concentración de norfloxacin, dejando fija la concentración del electrolito soporte en 4 g/l. Para obtener dicha línea de tendencia no se han tenido en cuenta aquellos puntos que no se ajustaban bien y se han utilizado los valores reales de concentración de norfloxacin indicados en la tabla 16.

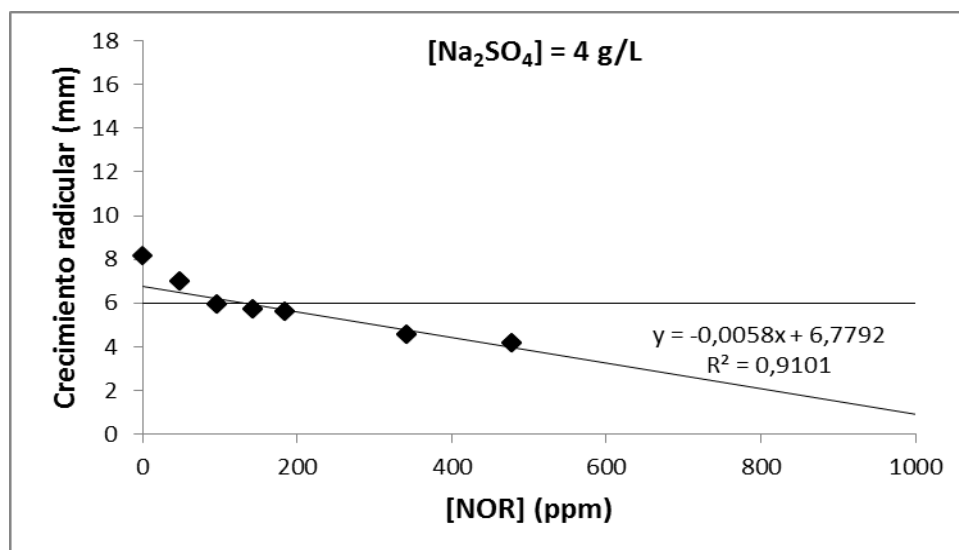


Figura 27 Crecimiento radicular frente a concentración de norfloxacin en ensayo 5. Fuente: Elaboración propia.

Para estas condiciones de trabajo, es decir, en presencia de 4 g/l de Na_2SO_4 , el punto que marca si una muestra es tóxica, o no, es el de 138 ppm de concentración de norfloxacin. De nuevo, el valor límite se ha obtenido al hacer intersectar la recta de tendencia de la figura 27 con la línea horizontal correspondiente al Cl_{50} .

Por último, se van a mostrar los resultados del último ensayo: el ensayo 6. Las condiciones de trabajo de este ensayo contemplan una concentración de 6 g/l de electrolito soporte en todas las muestras. Según el ensayo 2, todas las muestras del ensayo 6 deberían ser tóxicas. Esta afirmación se contrasta con los valores de p -value, Cl_{50} y la ecuación de la función del crecimiento radicular en relación a la concentración de norfloxacin, que se pueden ver en las tablas 19, 20 y 21 y figuras 28 y 29.

Tabla 19 Concentraciones de norfloxacin teóricas y reales del ensayo 6. Fuente: Elaboración propia.

[NOR] teórica (ppm)	Factor de dilución	Absorbancia (277 nm)	[NOR] real (ppm)
0	0	0	0,0
50	1:10	0,51	41,1
100	1:10	1,156	93,2
150	1:10	1,687	135,9
200	1:10	2,206	177,8
350	1:50	0,822	331,2
500	1:50	1,211	487,9

Estudio de la influencia de distintas variables en la toxicidad del norfloxacin. Aplicación a su eliminación mediante oxidación electroquímica.

Tabla 20 Resultados del crecimiento radicular obtenidos en el ensayo 6 de toxicidad en semillas de "lactuca sativa". Fuente: Elaboración propia.

Muestra	Crecimiento radicular (mm)																																	
	Control (agua destilada)				6g/l Na ₂ SO ₄ + 0 ppm				6g/l Na ₂ SO ₄ + 50 ppm				6g/l Na ₂ SO ₄ + 100 ppm				6g/l Na ₂ SO ₄ + 150 ppm				6g/l Na ₂ SO ₄ + 200 ppm				6g/l Na ₂ SO ₄ + 350 ppm				6g/l Na ₂ SO ₄ + 500 ppm					
1	21	22	17	15	9	9	10	5	11	5	5	4	9	2	12	6	11	12	12	11	9	11	10	2	7	5	9	5	8	5	5	2		
2	27	24	32	26	9	8	8	4	12	3	7	5	10	10	2	8	7	8	12	2	6	16	3	2	8	5	5	9	7	4	3	4		
3	15	25	33	13	8	2	8	4	16	3	5	4	6	2	2	12	13	6	5	4	7	9	4	2	2	2	10	3	6	5	3	6		
4	20	17	24	6	9	7	11	5	12	6	2	6	9	2	2	7	9	8	15	4	12	11	3	6	6	5	9	2	3	4	3	5		
5	22	22	29	19	9	4	13	4	14	9	4	11	4	12	2	3	11	3	13	3	6	2	2	7	4	7	5	4	8	4	3	2		
6	24	21	27	26	5	4	7	4	13	3	12	11	3	3	2	12	8	8	5	8	11	2	2	3	8	6	4	3	2	4	2	3		
7	12	17	20	5	5	8	5	5	4	4	9	15	3	3	2	3	3	9	4	3	10	4	10	5	8	4	6	3	4	4	3	2		
8	13	21	21	9	9	4	7	6	11	7	8	4	6	3	7	9	5	3	8	3	4	8		12	5	4	4	6	7	4	2	4		
9	20	20	21	24	8	3	13	3	11		8	5		8	3	14	6	4	8	5	7	7		6	9	7	4	3	4	2	2	7		
10	4	20	23	24	6	5	10	4	11		7	5		3	6	11	7	7	13		3	13		3	5	7	5	7	2	2	2	2		
11	13	22	23	25	9	8	10		13		8	5		8	4	4	11	5	7		4	3		7	4	3	9	4	6	2	7	2		
12	11	11	26	15	6	10	11		15		6	3		3	9	2	10	2			11	10			3	3	5	2	7	3		2		
13	13	15	27	12	5	10	9		10		4	9		3	9	3	2				3	12			8	3	9	2	10	3		2		
14	16	16	15	20	8	5	6		8		11	8				3	7				7	8			10	2	3	2	4	2		6		
15	11	15	13	13		9										4						5			13	2	10		2			7		
16	16	29	13	5												7									11									
17		3	11																						10									
18		5	9																															
19																																		
20																																		
				Media	18,00				Media	7,04			Media	7,84			Media	5,64			Media	7,17			Media	6,60			Media	5,54			Media	4,02
				σ	7,02				σ	2,64			σ	3,75			σ	3,53			σ	3,54			σ	3,70			σ	2,75			σ	2,03

Estudio de la influencia de distintas variables en la toxicidad del norfloxacino. Aplicación a su eliminación mediante oxidación electroquímica.

Tabla 21 Valores de p-value obtenidos en el ensayo 6 de toxicidad en semillas de "lactuca sativa".
Fuente: Elaboración propia.

Muestra	p-value
6g/l Na ₂ SO ₄ + 0 ppm	4,88E-07
6g/l Na ₂ SO ₄ + 50 ppm	1,40E-06
6g/l Na ₂ SO ₄ + 100 ppm	7,11E-08
6g/l Na ₂ SO ₄ + 150 ppm	6,54E-07
6g/l Na ₂ SO ₄ + 200 ppm	1,90E-07
6g/l Na ₂ SO ₄ + 350 ppm	5,49E-08
6g/l Na ₂ SO ₄ + 500 ppm	6,20E-09

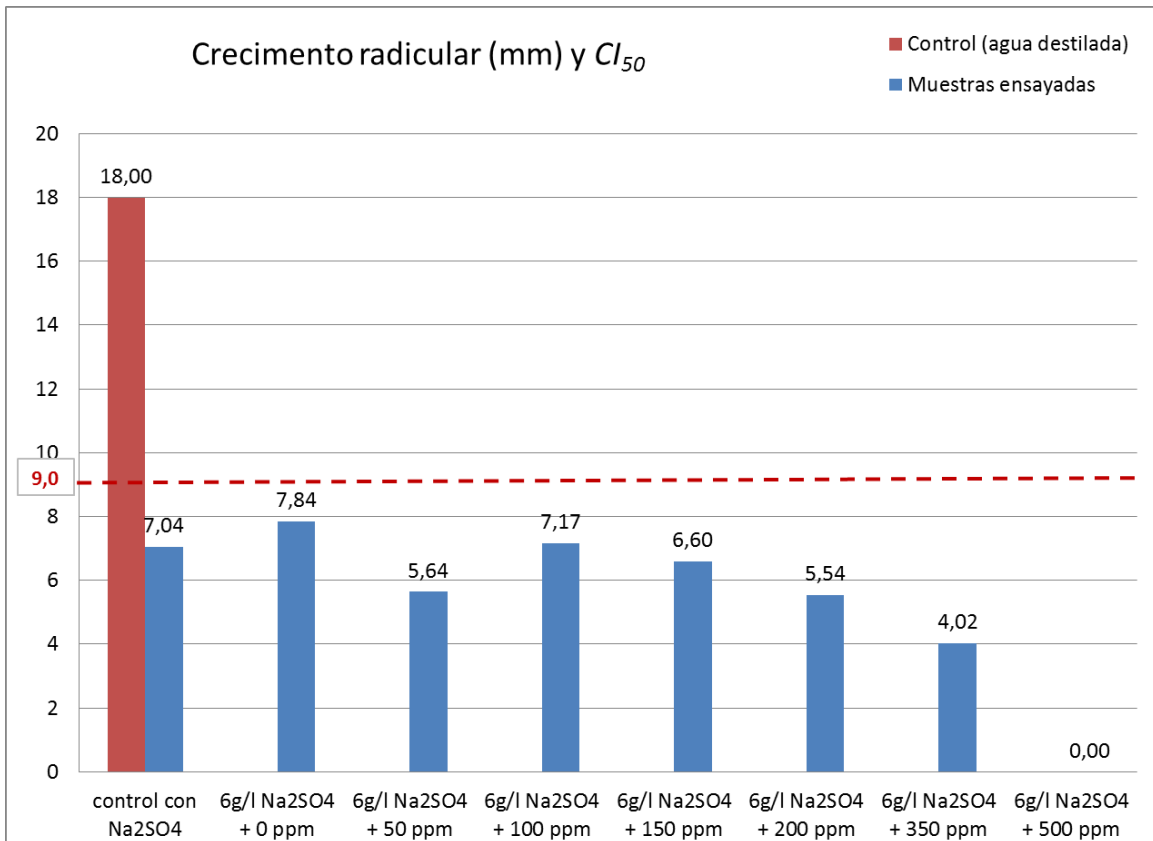


Figura 28 Crecimiento radicular y CI₅₀ del ensayo 6 de toxicidad en semillas de "lactuca sativa".
Fuente: Elaboración propia.

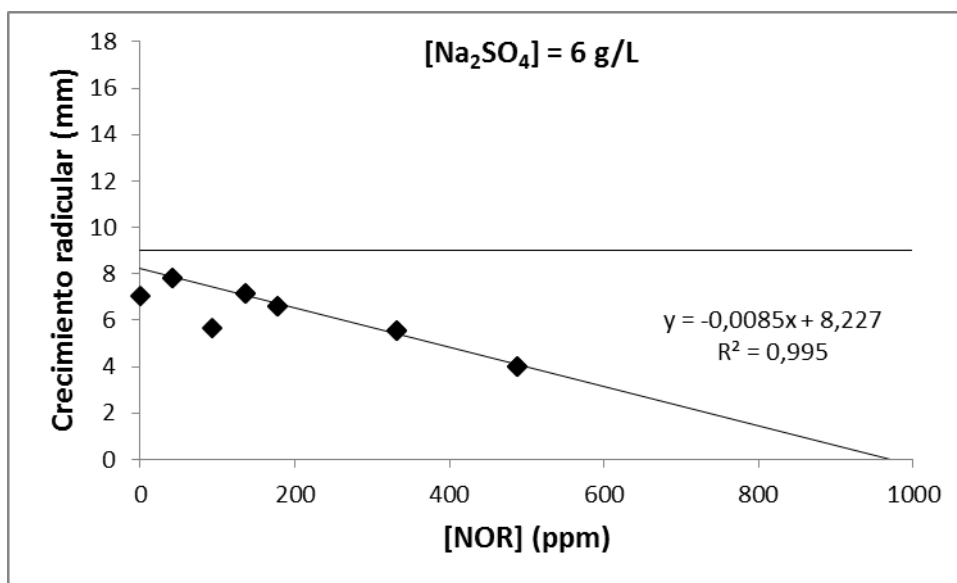


Figura 29 Crecimiento radicular frente a concentración de norfloxacin en ensayo 6. Fuente: Elaboración propia.

Una vez expuestos los resultados de estos 3 ensayos se va a proceder a realizar un análisis conjunto de ambos efectos: la concentración de norfloxacin y la concentración de electrolito soporte. Esencialmente para medir la toxicidad se está usando el crecimiento radicular de las semillas. Sin embargo, este crecimiento no es global ni extrapolable para todas las pruebas, tal y como se ha comprobado al colocar muestras de control con agua destilada en todos los ensayos, ya que el crecimiento radicular de dicha muestra de control no alcanza siempre el mismo valor. Por esta razón, para estudiar el efecto conjunto de las dos sustancias, en lugar de usar como medida el crecimiento radicular, se va a emplear el porcentaje de decrecimiento de las radículas calculado frente al de las muestras de control con agua destilada.

En las figuras 30, 31 y 32 se presentan gráficos en función de la concentración de norfloxacin. Para cada concentración se observan 3 barras de distintos colores: rojo para el decrecimiento de la muestra que solo contiene norfloxacin (efecto solo del norfloxacin; resultado del ensayo 3), azul para la muestra con norfloxacin y una concentración X del electrolito soporte (efecto conjunto real; resultados de los ensayos 4, 5 y 6, respectivamente en cada gráfico), y verde para la suma teórica de los efectos por separado. Las figuras 32, 33, y 34 representan los efectos conjuntos para los ensayos 4, 5 y 6 respectivamente.

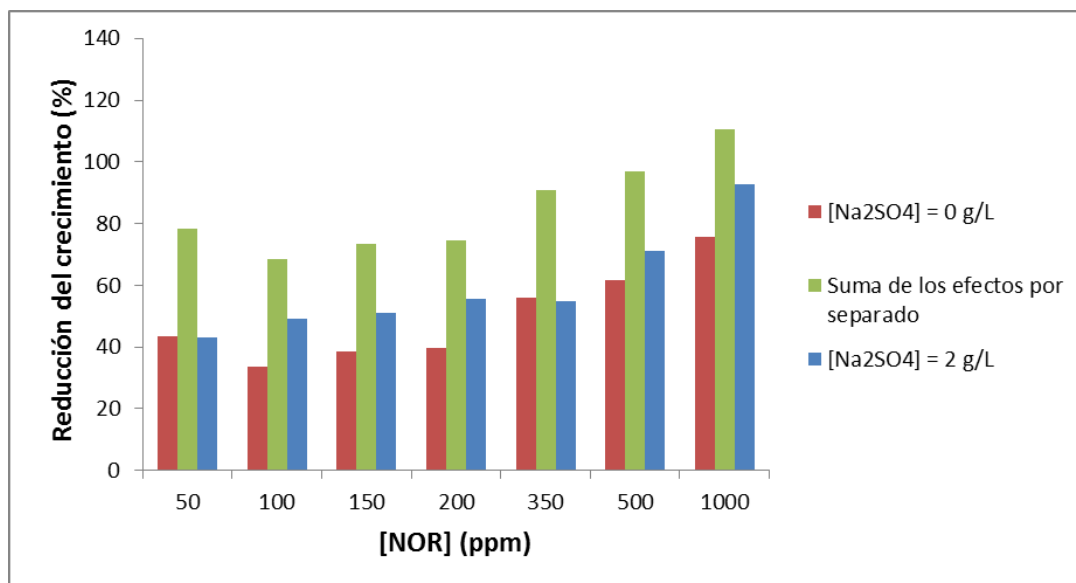


Figura 30 Efecto conjunto de las concentraciones de norfloxacin y electrolito soporte sobre la reducción del crecimiento radicular para el ensayo 4. Fuente: Elaboración propia.

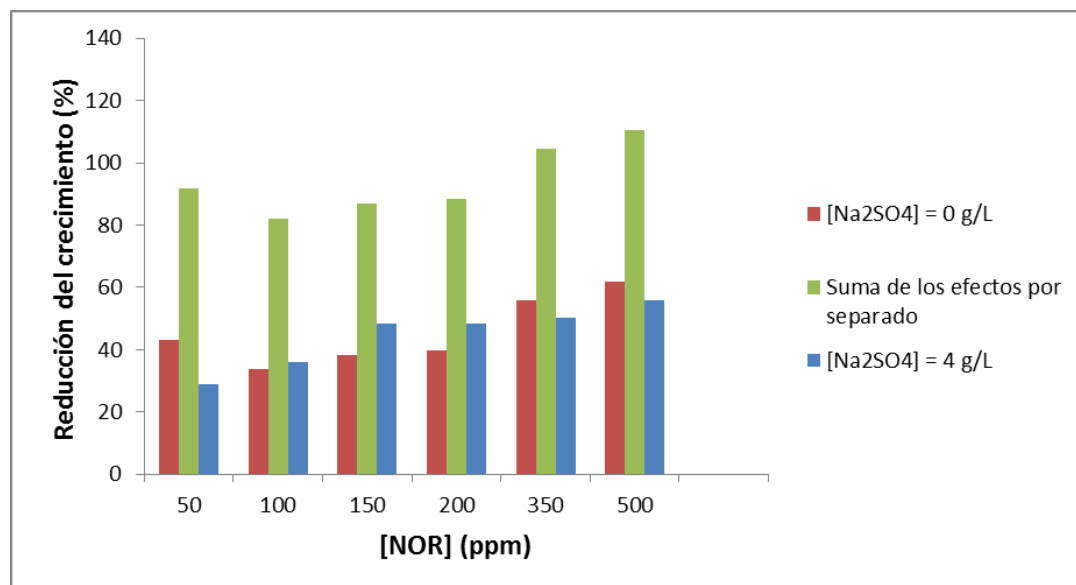


Figura 31 Efecto conjunto de las concentraciones de norfloxacin y electrolito soporte sobre la reducción del crecimiento radicular para el ensayo 5. Fuente: Elaboración propia.

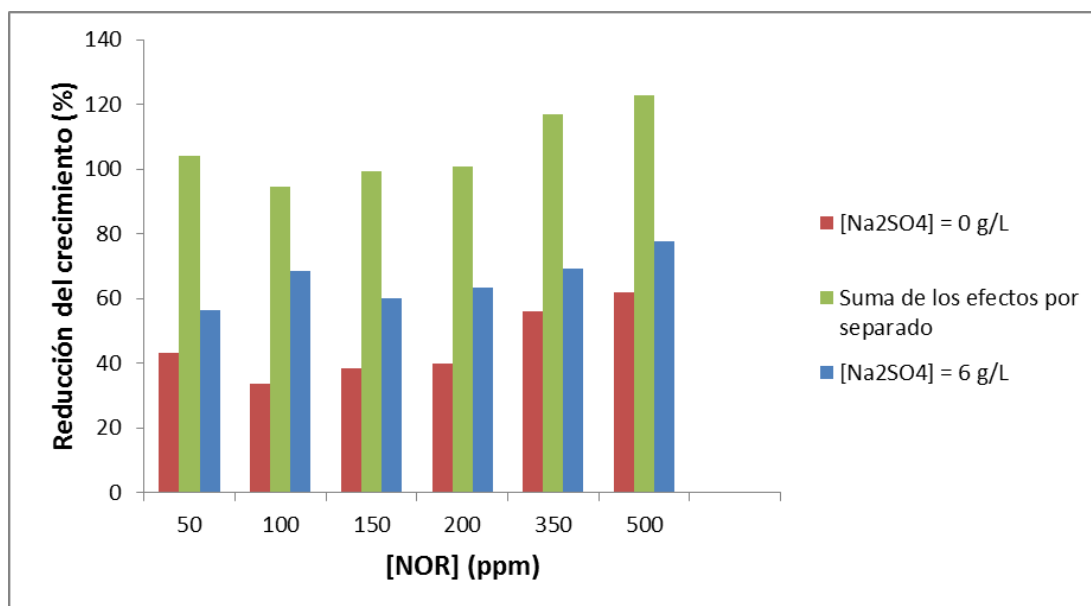


Figura 32 Efecto conjunto de las concentraciones de norfloxacin y electrolito soporte sobre la reducci3n del crecimiento radicular para el ensayo 6. Fuente: Elaboraci3n propia.

Se puede considerar que ocurre el fen3meno de la sinergia cuando el efecto real (barra azul) es mayor a la suma te3rica de los dos efectos por separado (barra verde). Como puede verse en las figuras 30, 31 y 32, en ninguna de las muestras de ninguno de los 3 ensayos ocurre este hecho, por lo cual se puede concluir que no ocurre la sinergia; m3s a3n, el efecto real es en todos los casos menor que la suma te3rica de los dos efectos por separado, siendo mayor la diferencia a mayor concentraci3n de Na₂SO₄.

5.5. An3lisis estad3stico con STATGRAPHICS

Con el fin de obtener una superficie que relacione la concentraci3n de norfloxacin y la concentraci3n de electrolito soporte con el decrecimiento radicular, se ha aplicado el procedimiento explicado en el punto 4.4.6 de este TFG para el STATGRAPHICS.

En la tabla 22 se muestran los datos de concentraci3n de norfloxacin, concentraci3n de electrolito soporte y decrecimiento radicular que se han introducido en el STATGRAPHICS.

Estudio de la influencia de distintas variables en la toxicidad del norfloxacino. Aplicación a su eliminación mediante oxidación electroquímica.

Tabla 22 Datos utilizados en el análisis estadístico con STATGRAPHICS. Fuente: elaboración propia.

Ensayo	Muestras		
	[NOR] (ppm)	[Na ₂ SO ₄] (g/L)	Decrecimiento radicular (%)
2	0,00	0,5	0,36
	0,00	1	37,11
	0,00	2	23,32
	0,00	4	48,55
	0,00	6	65,15
	0,00	8	85,48
	0,00	10	100,00
3	44,04	0	43,29
	91,26	0	33,70
	142,63	0	38,36
	189,77	0	39,73
	327,96	0	55,89
	456,89	0	61,83
	916,20	0	75,71
4	0,00	2	34,92
	42,14	2	43,25
	81,47	2	49,28
	142,22	2	50,90
	168,41	2	55,59
	320,31	2	54,89
	449,64	2	71,16
	852,14	2	92,88
5	0,00	4	31,63
	47,78	4	41,42
	95,25	4	50,04
	142,30	4	52,13
	183,08	4	52,72
	342,06	4	61,51
	477,44	4	64,77
6	0,00	6	60,89
	41,1	6	56,44
	93,15	6	68,67
	135,94	6	60,17
	177,76	6	63,33
	331,18	6	69,22
487,91	6	77,67	

En la figura 33 se presenta el diagrama de Pareto obtenido una vez descartados los efectos no significativos.

Diagrama de Pareto Estandarizada para %decrecimiento

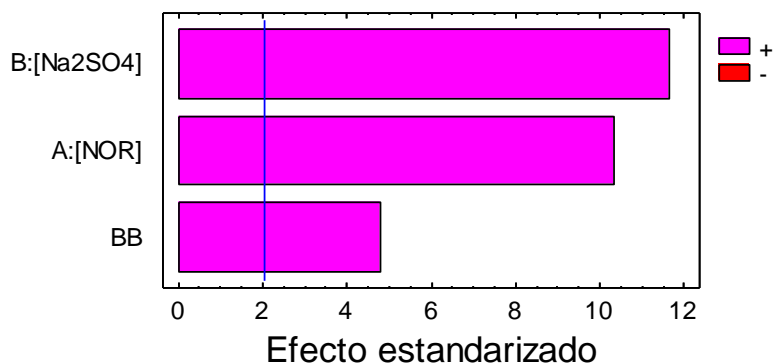


Figura 33 Diagrama de Pareto obtenido del análisis estadístico. Fuente: Elaboración propia.

En el diagrama de Pareto aparecen representados el efecto de la concentración del norfloxacin de forma proporcional, y el de la concentración del electrolito soporte de forma proporcional y cuadrática. Los tres tienen un *p-value* > 0,05 (línea azul), lo que hace que estos efectos se consideren significativos para el decrecimiento radical. Además, los tres efectos son positivos, es decir, cuando se incrementan sus valores el valor del decrecimiento radical es mayor.

El STATGRAPHICS facilita la siguiente ecuación para el % de decrecimiento radical en función de la concentración de norfloxacin y del electrolito soporte, además de la representación gráfica de dicha función (figura 34):

$$\%decrecimiento = 35,2646 + 0,0533701 \cdot [NOR] - 0,551462 \cdot [Na_2SO_4] + 0,713145 \cdot [Na_2SO_4]^2 \quad (2)$$

Superficie de Respuesta Estimada

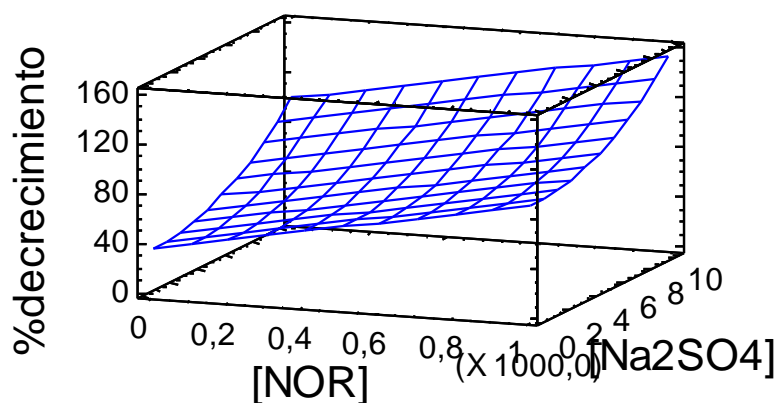


Figura 34 Representación gráfica de la relación entre el % decrecimiento radical y la concentración del norfloxacin y el electrolito soporte. Fuente: Elaboración propia.

Por último, se muestra la tabla 23 con diversos valores estadísticos del análisis estadístico.

Tabla 23 Valores estadísticos resultantes del análisis estadístico. Fuente: Elaboración propia.

Valores estadísticos	
Sesgo Estandarizado	-0,470019
Curtosis Estandarizada	-1,18816

Con estos datos se puede validar el análisis estadístico realizado, ya que los valores del sesgo estandarizado y la curtosis estandarizada están dentro del rango de valores [-2 , 2].

La ecuación (2) obtenida para el decrecimiento radicular en función de las concentraciones de norfloxacin y electrolito soporte permite calcular los valores de las concentraciones de ambas sustancias a partir de las cuales un efluente se consideraría tóxico. Para ello, se asigna al decrecimiento radicular el valor 50%, obteniéndose la siguiente función de una parábola:

$$50 = 35,2646 + 0,0533701 \cdot [\text{NOR}] - 0,551462 \cdot [\text{Na}_2\text{SO}_4] + 0,713145 \cdot [\text{Na}_2\text{SO}_4]^2 \quad (3)$$

Reordenando los términos, se tiene:

$$[\text{NOR}] = -13,3622571 \cdot [\text{Na}_2\text{SO}_4]^2 + 10,3327893 \cdot [\text{Na}_2\text{SO}_4] + 276,0984147 \quad (4)$$

En la figura 35 se ha representado el tramo de la ecuación (4) correspondiente al primer cuadrante, ya que es el único con sentido físico (valores positivos de las concentraciones de las sustancias). Todos los puntos situados por encima de la línea representada corresponden a efluentes tóxicos.

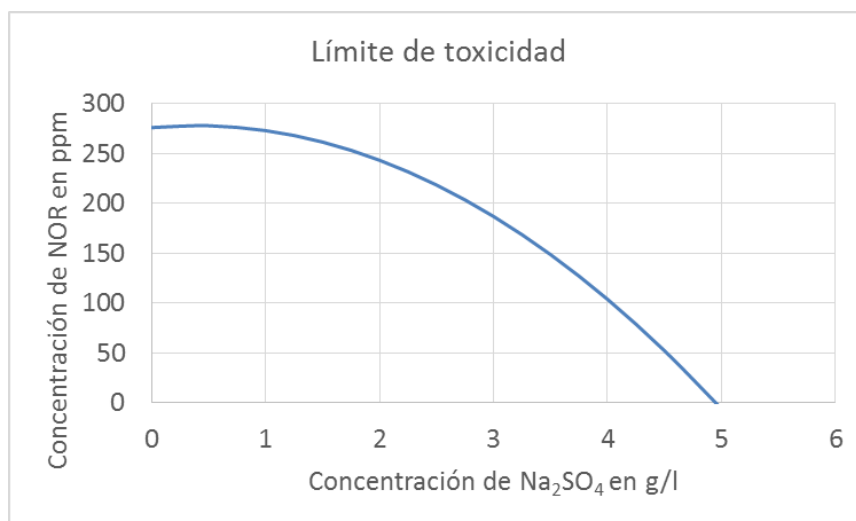


Figura 35 Representación del límite de la toxicidad según la concentración de NOR y de Na₂SO₄. Fuente: Elaboración propia.

5.6. Toxicidad de las muestras tratadas electroquímicamente

El ensayo estático de toxicidad aguda mediante el empleo de semillas de lechuga se ha empleado, conjuntamente con el análisis de toxicidad mediante el equipo Microtox, para analizar la eficacia de la oxidación electroquímica sobre muestras reales que contienen norfloxacin.

Los resultados de las muestras tratadas electroquímicamente sin el uso de membrana (ensayo 7) obtenidos con el método de las semillas se ven reflejados en las tablas 24 y 25, y la figura 36.

Estudio de la influencia de distintas variables en la toxicidad del norfloxacin. Aplicación a su eliminación mediante oxidación electroquímica.

Tabla 24 Resultados del crecimiento radicular obtenidos en el ensayo 7 de toxicidad en semillas de "lactuca sativa". Fuente: Elaboración propia.

Muestra	Crecimiento radicular (mm)																																
	Control (agua destilada)				0 ppm + 2 g/l Na ₂ SO ₄				100 ppm + 2 g/l Na ₂ SO ₄				BDD 1A				BDD 600mA				BDD 400mA				Cerámico 1A				Cerámico 600mA				
1	12	24	32	17	22	8	12	20	20	15	15	9	4	3	4	3	5	5	6	5	9	5	4	2	5	10	3	6	5	6	10	8	
2	18	21	30	16	6	9	20	25	25	13	16	3	2	3	2	4	5	4	5	6	3	5	4	2	6	5	8	9	5	5	10	6	
3	13	22	26	22	16	7	10	6	6	10	3	10	4	5	3	4	6	5	5	5	4	7	4	2	10	4	2	5	6	10	7	5	
4	3	14	16	20	12	5	8	5	6	23	4	13	2	4	3	4	6	6	5	6	5	4	8	5	6	3	6	10	7	10	10	8	
5	16	18	19	23	18	6	18	11	14	5	4	11	2	6	3	10	6	6	5	7	7	6	9	7	4	5	9	2	5	9	8	5	
6	18	6	24	9	10	5	7	15	12	18	6	9	3	3	3	5	6	4	5	7	8	12	3	4	3	8	3	3	7	7	9	6	
7	21	20	20	22	15	10	15	15	6	12	15	8	2	3	6	3	5	3	7	4	5	4	2	6	6	2	6	7	10	6	9	9	
8	18	11	28	17	23	9	9	9	17	11	12	11	4	4	4	3	5	5	5	6	8	9	5	9	6	2	4	9	6	4	6	2	
9	11	19	39	14	10	15	18	10	14	15	10	10	4	4	9	4	5	2	11	5	5	3	7	5	7	6	6	4	5	5	10	6	
10	20	15	18	14	9	3	12	6	14	13	12	8	3	5	3	3	5	6	6	8	7	2	9	2	5	2	2	3	9	5	5	8	
11	20	21	22	25	10	3	12	10	19	15	9	14	4	3	6	2	2	5	3	5	3	4	2	2	7	5	5	3	5	7	9	13	
12	15	6	23	28	10	3	17	15	19	9	3	3	4	4	4	2	2	5	5	5	3	5	2	2	8	5	3	4	6	5	10	6	
13	8	14	29	20	5	3	16	18	14	11	5	9	3	3	5	4	3	3	6	6	5	2	2	9	2	4	5	4	9	12	12		
14	4	14	19	20	20	4	8	10	11	2	3	3	2	4	2	2	5	5	6	3	5	2	3	4	7	4	4	6	8	5	5		
15	6	5	15	12	6	13	2	8	10	4	4	4	2	4	2	2	10	5	5	10	2	2	2	8	5	8	5	8	6	6	6		
16	6	4	6	17	4	12	13	14	2	3	14	2	3	6	5	2	6	5	2	2	2	2	6	6	6	5	11	11	11	11	11		
17	4	3	24	12	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
18			20	16	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
19			20	7	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
20																																	
			Media	17,04			Media	11,18			Media	10,54			Media	3,63			Media	5,28			Media	4,76			Media	5,38			Media	7,16	
			σ	7,60			σ	5,63			σ	5,18			σ	1,52			σ	1,64			σ	2,60			σ	2,28			σ	2,44	

Tabla 25 *p-value* ensayo 7. Fuente: Elaboración propia.

Muestra	<i>p-value</i>
0 ppm + 2 g/l Na ₂ SO ₄	0,1124
100 ppm + 2 g/l Na ₂ SO ₄	0,0606
BDD 1A	6,42E-08
BDD 600mA	6,72E-07
BDD 400mA	3,41E-07
Cerámico 1A	7,50E-07
Cerámico 600mA	1,27E-08

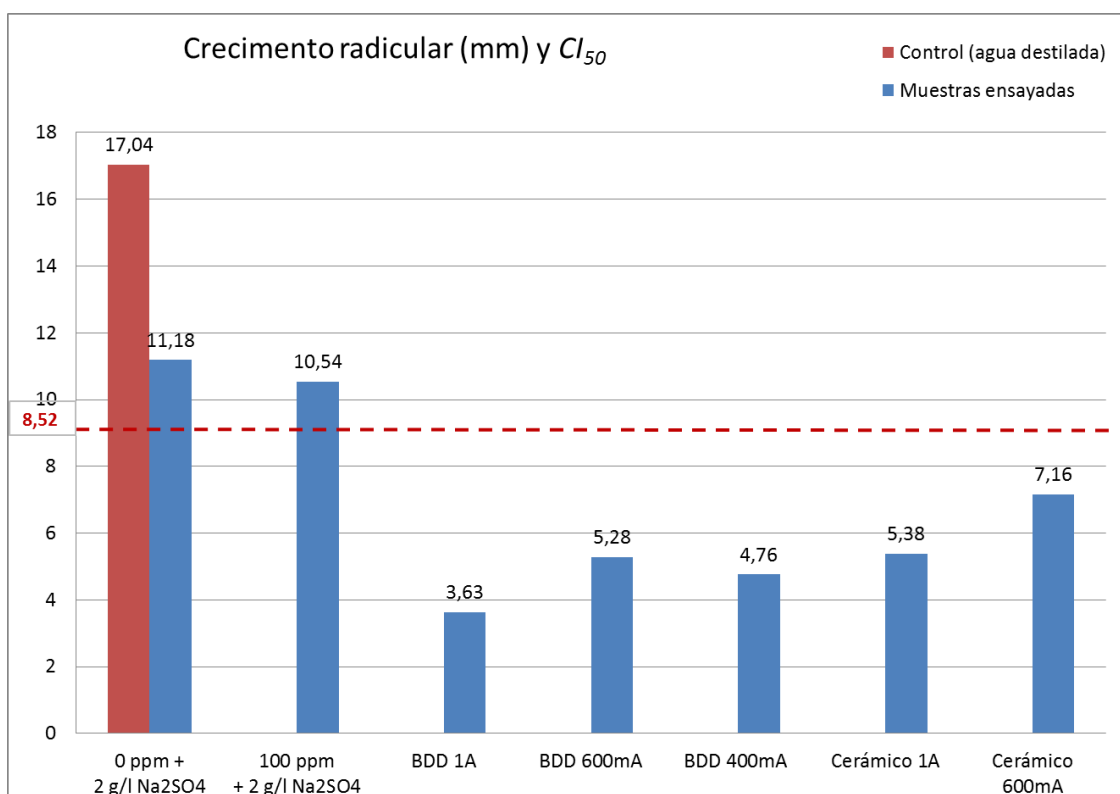


Figura 36 Crecimiento radicular y CI₅₀ del ensayo 7 de toxicidad en semillas de "lactuca sativa". Fuente: Elaboración propia.

Si se observan los datos obtenidos se puede ver cómo la muestra de partida con 100ppm de norfloxacin y 2 g/l del electrolito soporte no es tóxica, reafirmando la conclusión obtenida anteriormente en el ensayo 4; sin embargo, todas las muestras que han sido sometidas a oxidación electroquímica sí son tóxicas, tanto por el *p-value* como por el CI₅₀. Una explicación, que se puede apoyar en la bibliografía sobre esta temática es, que aunque durante el proceso de oxidación electroquímica se haya logrado degradar el norfloxacin (elemento que aporta toxicidad a la muestra), los productos de la oxidación y los compuestos intermedios sean más tóxicos que el norfloxacin original. Otra explicación es que el proceso sea tan oxidante que la especie [SO₄]⁻² pase a la forma de persulfato, [S₂O₈]⁻², el cual es más tóxico.

Si se analizan las condiciones de trabajo de cada una de las muestras tratadas electroquímicamente, se puede concluir que:

- Para los electrodos BDD, la intensidad de trabajo que proporciona una disolución final más tóxica es la de 1A, seguida de la de 400 mA, mientras que la menos tóxica es la correspondiente a 600 mA.
- Con los electrodos cerámicos, la muestra más tóxica es la tratada con una intensidad de trabajo de 1A y la menos tóxica la correspondiente a 600 mA.
- A una misma intensidad, los electrodos BDD proporcionan disoluciones finales más tóxicas que los cerámicos.

La toxicidad de este mismo ensayo se ha comparado con la obtenida con el equipo Microtox, medida en UT, presentándose los resultados en la tabla 26.

Tabla 26 Comparación de los resultados de toxicidad obtenidos para el ensayo 7 con el equipo Microtox (UT) y con las semillas de "lactuca sativa" (crecimiento radicular). Fuente: Elaboración propia.

MUESTRA	UT	CRECIMIENTO RADICULAR (mm)	TOXICIDAD
100 ppm + 2g/l Na ₂ SO ₄	0	10,54	NO
Electrodo BDD con 1A	3,6	3,63	SI
Electrodo BDD con 600 mA	1,08	5,28	SI
Electrodo BDD con 400 mA	1,35	4,76	SI
Electrodo cerámico con 1A	1,03	5,38	SI
Electrodo cerámico con 600 mA	HORMESIS	7,16	SI

De los datos de toxicidad obtenidos con el equipo Microtox se puede deducir que las muestras tratadas con oxidación electroquímica son más tóxicas que la original, siendo éste el mismo resultado que el obtenido con el método de las semillas.

A continuación se pasa a comentar los resultados obtenidos para el ensayo 8. En este ensayo las muestras han sido sometidas a un proceso de oxidación electroquímica en el que se ha utilizado una membrana de separación entre los compartimentos anódico y catódico; además, por requerimientos del proceso, las muestras tienen 14 g/l de electrolito soporte. Según la experiencia obtenida en los ensayos anteriores con las semillas, se estimó que se iban a obtener unos crecimientos de radícula tan bajos que no permitirían extraer conclusiones sólidas. Por esta razón, el análisis de la toxicidad de este último ensayo solo se realizó con el equipo Microtox. Los resultados del ensayo 8 se muestran en la tabla 27.

Tabla 27 Resultados de toxicidad obtenidos para el ensayo 8 con el equipo Microtox. Fuente: Elaboración propia.

MUESTRA	UT	TOXICIDAD
100 ppm + 14g/l Na ₂ SO ₄	HORMESIS	SI
Electrodo BDD con 1A	250	SI
Electrodo BDD con 600 mA	400	SI
Electrodo BDD con 400 mA	10	SI
Electrodo cerámico con 1A	20	SI
Electrodo cerámico con 600 mA	200	SI
Electrodo cerámico con 400 mA	20	SI

En la tabla 27 se observa una alta toxicidad de estas muestras tratadas mediante oxidación electroquímica (mayor que en el ensayo 7), algo de esperar con los niveles de electrolito soporte presente en las muestras. Con estos datos y los obtenidos por el equipo Microtox en el ensayo anterior se puede concluir que:

- Los electrodos BDD dan como resultado efluentes más tóxicos que los tratados con el electrodo cerámico para un mismo valor de intensidad aplicada.
- De las intensidades estudiadas, la de 600 mA siempre da el resultado más tóxico, y la de 400mA el menos tóxico, sin influir en esta afirmación la cantidad de electrolito presente ni el tipo de electrodo.

6. CONCLUSIONES

Según los objetivos propuestos, y una vez realizado el análisis de los resultados obtenidos durante la experimentación, se pueden obtener las siguientes conclusiones:

- Se considera el método de las semillas como un ensayo válido de toxicidad estática aguda para efluentes contaminados con norfloxacin, ya que los resultados obtenidos muestran un comportamiento estable.
- El rango de pH óptimo para el estudio de la toxicidad mediante el cultivo de semillas de lechuga es de 6 a 7. A valores de pH más ácidos o más básicos se observa un efecto tóxico del propio pH, siendo muy tóxico para un pH cercano a 1.
- La concentración del electrolito soporte utilizado, Na_2SO_4 , tiene una relación inversamente proporcional al crecimiento radicular de las semillas y, por tanto, directamente proporcional a la toxicidad. Un efluente se considera tóxico a partir de una concentración de 4,82 g/l de esta sustancia.
- La concentración del norfloxacin tiene una relación inversamente proporcional al crecimiento radicular de las semillas y, por tanto, directamente proporcional a la toxicidad. Un efluente se considera tóxico a partir de una concentración de 336 ppm de norfloxacin.
- Cuando ambos compuestos, el norfloxacin y el sulfato sódico, se encuentran presentes en un efluente, la concentración de norfloxacin a partir de la cual un efluente se considera tóxico disminuye a medida que aumenta la concentración de sulfato sódico.
- Cuando ambos compuestos, el norfloxacin y el sulfato sódico, se encuentran presentes en un efluente, no se produce el fenómeno de la sinergia en cuanto a la toxicidad del efluente. De hecho, se produce el fenómeno inverso, ya que la suma de los efectos de la toxicidad de ambas sustancias por separado sobre las semillas es mayor que el efecto de la toxicidad del efluente con presencia conjunta de norfloxacin y sulfato sódico.
- Se han podido determinar, con la ayuda de herramientas estadísticas, los umbrales de toxicidad de efluentes contaminados con norfloxacin en presencia de sulfato sódico. El umbral corresponde a una línea parabólica.
- Para comparar efluentes con toxicidad muy elevada, se recomienda utilizar el ensayo de toxicidad a través del fenómeno de bioluminiscencia con el equipo Microtox, ya que el ensayo estático de toxicidad aguda en semillas de lechuga no permitiría apreciar diferencias porque el crecimiento radicular sería nulo para todos ellos. Y viceversa: para comparar efluentes con toxicidad baja, se recomienda utilizar el ensayo estático de toxicidad aguda en semillas de lechuga, ya que resulta más sensible para observar posibles diferencias.
- La intensidad eléctrica aplicada en la oxidación electroquímica del norfloxacin no parece mostrar una relación lineal con la toxicidad de los efluentes tratados. En posteriores estudios se podría determinar esta relación.
- Los ánodos BDD utilizados en la oxidación electroquímica del norfloxacin dan como resultado un efluente más tóxico que los ánodos cerámicos.
- El uso de membrana para separar los compartimentos anódico y catódico en la oxidación electroquímica del norfloxacin proporciona un efluente más tóxico debido a

la mayor concentración de electrolito soporte utilizada, no pudiéndose distinguir posibles diferencias debidas exclusivamente al uso o no de membrana.

- No se puede considerar que la oxidación electroquímica con los tipos de ánodos utilizados en este TFG sea un buen método para eliminar la toxicidad que aporta el norfloxacin a un efluente, aunque durante el proceso sí se elimine el norfloxacin. Se concluye esto por dos razones: las muestras tratadas con oxidación electroquímica son más tóxicas que las muestras originales (con electrolito soporte añadido); y para aplicar esta técnica es necesario añadir un electrolito soporte que aporta una toxicidad extra al efluente. El hecho que las muestras tratadas sean más tóxicas que la muestra original sin tratar puede deberse a que los productos intermedios de la oxidación electroquímica son más tóxicos que el propio norfloxacin, o a que se forme la especie persulfato durante el proceso de oxidación (más tóxica que la especie sulfato). Esto podría ser objeto de estudios posteriores, con el fin de encontrar tipos de ánodos que no generen este fenómeno.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Sánchez Bardoza, Leadina. Control Borroso para la valoración del impacto ambiental generado por contaminantes emergentes en aguas residuales hospitalarias, *Gestión y Ambiente*, Volumen 18 (1), pp.81-93, junio de 2015, ISSN 0124.177X
- [2] Naidu, Ravi. Aries España, Víctor Andrés. Liu, Yanju. Jit, Joytishna. Emerging contaminants in the environment. Risk-based analysis for better management, *Chemosphere*, Volumen 154, pp. 350-357, julio 2016
- [3] García Rodríguez, Juan. Álvarez Torrellas, Silvia. Adsorción de contaminantes emergentes sobre Carbón Activado, EAE, 2014, ISBN 3848451905
- [4] Peña Álvarez, Araceli. Castillo Alanís, Alejandra. Identificación y cuantificación de contaminantes emergentes en aguas residuales por microextracción en fase sólida, cromatografía de gases, espectrometría de masas, *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, Volumen 18 (1), pp. 29-42, 2015, ISSN 1405-888X
- [5] Petrovic, M. Barceló, D. Emerging contaminants from industrial and municipal waste: Removal technologies, Springer, 2008, ISBN 978-3-540-79209-3
- [6] Hijosa Valsero, María. Eliminación de contaminantes emergentes (fármacos y fragancias) del agua residual urbana mediante humedales construidos, tesis doctoral en la Universidad de León, 2010
- [7] Gil, Miriam Janet. Soto, Adriana María. Usma, Jorge Iván. Gutiérrez, Omar Darío. Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos, *Producción + Limpia*, Volumen 7 (2), pp. 52-73, 2012
- [8] Prospecto del Norfloxacin. Disponible en la web de la Asociación Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). https://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/p/68627/Prospecto_68627.html.pdf Última consulta en mayo de 2018.
- [9] García Martínez, Francisca. Farmacocinética de norfloxacin en conejos. Tesis de la Universidad de Murcia, 2016. Disponible en <http://hdl.handle.net/10803/373205>
- [10] Sukul, P. Spittler, M. Fluoroquinolone antibiotics in the environment, *Environment, Contamination and Toxicology*, volumen 191, pp. 131-162, 2007
- [11] Martínez-Huitle, Carlos. Hernández, Fernando. Ferro, Sergio. Quiroz Alfaro, Marco Antonio. De Battisti, Achille. Oxidación electroquímica: Una alternativa para el tratamiento de aguas con contaminantes orgánicas, *Afinidad*, volumen 63, pp. 26-34, 2006.
- [12] Silbergeld, Ellen K. Toxicología, *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*, capítulo 33, 2001.
- [13] Castillo Morales, Gabriela. Ensayos ecotóxicos y métodos de evaluación de calidad de aguas, 2004, ISBN 968-5536-33-3.
- [14] Reglamento de la Unión Europea 1357/2014 de diciembre de 2014. DO L 365/89

- [15] Reglamento de la Unión Europea 440/2008 de mayo de 2014. DO L 142/1
- [16] Ronald L. Wasserstein & Nicole A. Lazar. The ASA's Statement on *p-values*: Context, Process, and Purpose, *The American Statistician*, 70:2, pp. 129-133, 2016
- [17] Apuntes de "introducción a la biología" de la Universidad de Avellaneda, 2014. Disponibles en http://ibio.ddns.net/Ensayo_de_Ecotoxicidad.pdf
- [18] Sobrero, María Cecilia. Ronco, Alicia. Ensayo de toxicidad agua en semillas de lechuga "lactuca sativa", Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático de México, pp. 55-68, 2014
- [19] Hammer, Øyvind. Reference manual. Natural History Museum, University of Oslo, 2018. Disponible en <https://folk.uio.no/ohammer/past/past3manual.pdf>
- [20] <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4380.html> Última consulta en mayo de 2018
- [21] <https://statgraphics.net/ejemplos/> Última consulta en mayo de 2018

II. PRESUPUESTO

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	4
2. MATERIAL DE LABORATORIO Y REACTIVOS.....	4
3. EQUIPOS.....	5
4. LICENCIAS DE SOFTWARE.....	6
5. MANO DE OBRA.....	6
6. PRESUPUESTO FINAL.....	6

1. INTRODUCCIÓN

En el documento que se presenta a continuación se pretende hacer una valoración económica lo más cercana a la realidad, es decir, como si todas las actividades recogidas en este TFG hubieran sido realizadas dentro del departamento de I+D+i de una empresa privada.

2. MATERIAL DE LABORATORIO Y REACTIVOS

Se va a considerar que todo el material de laboratorio y los reactivos utilizados para la realización del TFG han sido adquiridos para el uso exclusivo y único de este proyecto, por lo que la totalidad de su coste se adjudica al presente presupuesto. En la tabla 1 se detallan los costes de los materiales, mientras que en la tabla 2 aparecen los reactivos y productos usados.

Tabla 1 Coste de los materiales. Fuente: Elaboración propia.

MATERIAL LABORATORIO	UDS. USADAS	PRECIO UNITARIO (€)	PRECIO TOTAL (€)
Placa Petri	40	0,25	10
Mortero y pilón	1	3	3
Matraz aforado 250 ml	1	7	7
Matraz aforado 100 ml	8	5	40
Matraz aforado 1 l	1	21	21
Vaso de precipitados 250 ml	10	3	30
Cuentagotas	2	0,20	0,40
Agitador magnético + imán	1	224	224
Regla milimetrada	1	7	7
Tiras indicadoras de pH (caja 100 uds.)	1	5	5
Pinzas	2	2	4
Guantes de nitrilo (caja 100 ud.)	1	3,50	3,50
Bomba de vacío	1	100	1
Pro-pipeta	1	5	5
Espátula	1	2,50	2,50
Pipeta 5 ml	1	2	2
Pipeta 20 ml	1	8	8
Papel filtro Whatmann (caja 50 uds.)	5	5	25
Micropipeta 10 µl	1	90	90
Micropipeta 1000 µl	1	92	92
Puntas micropipeta 10 µl (bolsa 1000 ud.)	1	8,80	8,80
Puntas micropipeta 1000 µl (bolsa 1000 ud.)	1	8,80	8,80
Cubetas equipo Microtox	1	200	200
TOTAL			798,00

Tabla 2 Coste de los reactivos y productos. Fuente: Elaboración propia.

PRODUCTO/REACTIVOS	UDS. USADAS	PRECIO POR UD. (€)	PRECIO TOTAL (€)
Alcohol 96º (bote de 1 l)	10	2,50	25
Agua destilada (bote de 25 l)	2	14	28
Norfloxacin CINFA 400 mg (caja 14 comprimidos)	1	5	5
Semillas "lactuca sativa" (Bolsa 6 gramos)	2	1	2
Jabón concentrado (bote 615 ml)	1	2,50	2,50
H ₂ SO ₄ concentrado (bote 1 l)	1	8	8
NaOH concentrado (bote 1 l)	1	24	24
NaCl al 2% (bote 50 ml)	1	26	26
NaCl al 22% (bote 50 ml)	1	64	64
Norfloxacin (bote 5 g)	1	131	131
Na ₂ SO ₄ (bote 0,5 kg)	1	240	240
Agua ultrapura (bote de 50 ml)	1	31,50	31,50
Bacterias luminiscentes (caja de 10 viales)	1	577,50	577,50
TOTAL			1164,50

3. EQUIPOS

En cuanto a los equipos que suponen una inversión económica mayor se les otorga un tiempo de amortización (normalmente entre 2-5 años). En este caso se va a suponer 2 años de amortización para los más económicos y que están sujetos a mayor rotación dentro del laboratorio, y 5 años a los más caros, y que más vida útil presentan. Se asignará a este trabajo el coste proporcional a 4 meses de uso.

Por otro lado, solamente se va a reflejar el coste de compra del producto, obviando el coste que produce su mantenimiento o el alquiler de equipos de sustitución en caso de avería de los mismos. Aparece la información en la tabla 3.

Tabla 3 Coste de los equipos. Fuente: Elaboración propia.

EQUIPO	COSTE (€)	TIEMPO DE AMORTIZACIÓN (AÑOS)	COSTE ASIGNADO A 4 MESES DE USO (€)
Nevera pequeña	400	2	67
Ordenador VAIO	1100	5	73
pH-metro electrónico	756	2	126
Báscula de precisión	256	2	43
Espectrofotómetro UV-Visible	9111,30	5	607,40
Microtox 500	20475	5	1365
Total			2281,40

4. LICENCIAS DE SOFTWARE

En este TFG se ha utilizado software libre y software que requiere adquirir una licencia de uso. El coste de una licencia para hacer uso del "Office 365 Professional" asciende a 127 € y la del STATGRAPHICS a 1500 €.

5. MANO DE OBRA

Se va a partir del supuesto que para la realización de todo este proyecto a nivel profesional solo haría falta la intervención de 1 profesional cualificado con un nivel de estudios de grado o superiores. Se resume la información en la tabla 4.

Tabla 4 Coste de la mano de obra. Fuente: Elaboración propia.

HORAS DE TRABAJO	PRECIO POR HORA (€)	COSTE TOTAL (€)
350	15	5250

6. PRESUPUESTO FINAL

En la tabla 5 se reúne la información de todos los presupuestos parcial, y se suman los gastos generales. El precio incluye el 21% de IVA.

Tabla 5 Presupuesto total. Fuente: Elaboración propia.

CONCEPTO	COSTE (€)
Material de laboratorio	798
Productos / Reactivos	1164,50
Equipos	2281,40
Licencias de software	1627
Mano de obra	5250
Total sin costes generales	11120,90
Costes general (+15%)	1668,14
Total con costes generales	12789,04

En total el presupuesto del presente TFG asciende a la cantidad de **DOCE MIL SETECIENTOS OCHENTA Y NEUVE EUROS CON CUATRO CÉNTIMOS.**