

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESTROGENICA (RYA) DE AGUAS CONTAMINADAS CON COMPUESTOS DERIVADOS DE LA INDUSTRIA DEL CORCHO, TRATADAS CON FOTO-FENTON

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGIA

ALUMNO/A: **Marta Selma Royo**

TUTOR/A: **M^a Ángeles Castillo López**
Consuelo Sabater Marco

Curso Académico: 2013-2014

VALENCIA, JUNIO 2014

Datos personales

Alumno/a: Marta Selma Royo

Datos del Trabajo Fin de Grado :

Título del TFC: Evaluación de la actividad estrogénica (RYA) de aguas contaminadas con compuestos derivados de la industria del corcho, tratadas con foto-Fenton.

Lugar de realización: Departamento de Biotecnología

Fecha de lectura: Junio 2014

Titulación: Grado en Biotecnología

Especialidad: Toxicología ambiental

Director/a: M^a Ángeles Castillo López

Codirector/a: Consuelo Sabater Marco

Resumen

La preocupación por el creciente número de compuestos tóxicos detectados en el medio ambiente va en aumento. Entre éstos se encuentran productos farmacéuticos, drogas de abuso, productos de cuidado personal, esteroides y hormonas, agentes tensioactivos y compuestos perfluorados, entre otros. Estos compuestos son incorporados al medio ambiente por actividad industrial y agrícola y eliminación de desechos municipales, provocando efectos adversos en los organismos vivos. Uno de los efectos más preocupantes es de disrupción endocrina. Una de las principales fuentes de contaminantes son los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales, ya que, en muchos casos, no se consigue una eliminación completa de los mismos.

Es por ello que, actualmente, se están desarrollando nuevas tecnologías para conseguir una completa eliminación de este tipo de sustancias (Procesos de Oxidación Avanzada). En este trabajo de investigación, aguas artificialmente contaminadas con ocho compuestos relacionados con la industria del corcho (ácidos gálico, tánico, elágico, protocatecuico, valínico, siríngico y sinápico y el 2,4-dinitrofenol) y sometidas a un Proceso de Oxidación Avanzada (Foto- Fenton) van a ser evaluadas mediante el ensayo RYA (Recombinant Yeast Assay) determinando la actividad estrogénica de dichas aguas.

Este ensayo está basado en una cepa recombinante de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El potencial estrogénico de las muestras se detecta mediante emisión de fluorescencia, previo tratamiento de las muestras.

La evaluación mediante el ensayo RYA demuestra un aumento de la toxicidad a los 20 min de tratamiento de las aguas, debido a la aparición de compuestos intermedios que son más tóxicos que los contaminantes originales, por lo que es necesario alargar los tiempos de tratamiento en los procesos de oxidación avanzada, con el fin de reducir la toxicidad de las aguas contaminadas.

Palabras clave

Contaminants emergents, fotocàlisis, disrupció endocrina, RYA, EDCs, AOPs.

Resum

La preocupació pel creixent nombre de compostos tòxics detectats en el medi ambient va en augment. Entre aquests compostos es troben productes farmacèutics, drogues d'abús, productes de cura personal, esteroides i hormones, agents tensioactius i compostos perfluorats, entre d'altres. Aquests compostos són incorporats al medi ambient per l'activitat industrial i agrícola i l'eliminació de deixalles municipals, provocant efectes adversos en els organismes vius. Una de les principals fonts de contaminants són els efluent de les plantes de tractament de aigües residuals, ja que, en molts casos, no es aconsegueix una eliminació completa de aquests. Un dels efectes més preocupants és la disrupció endocrina, la qual té efectes importants en l'ecosistema.

És per això que, actualment, s'estan desenvolupant noves tecnologies per aconseguir una completa eliminació d'aquest tipus de substàncies (AOPs). En aquest treball d'investigació, aigües artificialment contaminades amb huit compostos relacionats amb la indústria del suro (àcid gàl·lic, tànnic, el·làgic, protocatecuic, vaníl·lic, siríngic i sinàpic i el 2,4-dinitrofenol) i sotmeses a un procés de oxidació avançada (Foto-Fenton) varen ser avaluades mitjançant el assaig RYA (Recombinant Yeast Assay) determinant la seua activitat estrogènica.

Aquest assaig està basat en una capa recombinant del llevat *Saccharomyces cerevisiae*. El potencial estrogènica de les mostres es detecta mitjançant la emissió de fluorescència, previ tractament de les mostres.

L'avaluació mitjançant el assaig RYA demostra un augment de la toxicitat als 20 minuts de tractament de les aigües, debut a la aparició de compostos intermediaris que són més tòxics que els contaminants originals, per el que es necessari allargar els temps de tractament en els processos de oxidació avançada, amb el fi de reduir la toxicitat de les aigües contaminades

Paraules claus

Contaminants emergents, fotocàlisis, disrupció endocrina, RYA, EDCs, AOPs.

Abstract

The concern about the increasing number of toxic compounds found in the environment is increasing. Among these compounds are pharmaceuticals, drugs of abuse, personal care products, steroids and hormones, surfactants and perfluorinated compounds, among others. These compounds are incorporated into the environment by industrial and agricultural activity and municipal waste disposal.

One of the main sources of contaminants are emerging effluents of wastewater treatment plants, because in many cases there isn't achieved a complete elimination thereof. That is why, today, new technologies are being developed to achieve complete elimination of these substances.

In this research, artificially contaminated waters with eight compounds related to the cork industry (gallic acid, ellagic acid, protocatechuic acid, vanillic acid, sinapic acid, siringic acid, tannic acid and 2,4-dinitrofenol) and subjected to advanced oxidation processes (photo-Fenton) for different times, have been evaluated from the ecotoxicological point of view by testing RYA (Recombinant Yeast Assay) that evaluates estrogenic activity in the wastewater.

This assay is based on a recombinant strain of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The estrogenic potential of the samples were detected by fluorescence emission after treatment.

Ecotoxicological evaluation of water samples contaminated by assay RYA demonstrates a increased toxicity at 20 min of treatment of the waters, due to the appearance of intermediate compounds which are more toxic than the original pollutants, so it is necessary to extend the treatment time in the advanced oxidation processes, in order to reduce the toxicity of contaminated waters.

Keywords

Emerging pollutants, photocatalysis, endocrine disruption, RYA, EDCs, AOPs.

AGRADECIMIENTOS

En primer lloc, gracies a Consuelo y M^a Ángeles, en especial a aquesta última que ha estat súper pendent de mi durant aquest projecte, sempre amb una paraula amable per a mi.

Clarament, gracies a les meues xiquetes, sabeu que tot açò no haguera passat sense vosaltres, sobre tot perquè ja haguera perdut el cap, oblidat, en algun banc de la UPV. Gracies per estar en mi en els millors anys de la meua vida i sobre tot gracies per deixar-me ser jo mateixa. En estos anys he sigut lliure per a construir-me i ser la persona que volia ser i, en part ha sigut gracies a vosaltres.

Gracies al Grup, la meua família, per acompanyar-me en la meua vida i ajudar-me a descobrir el meu camí. Ara vull començar a tornar al món tot el amor que he rebut de les vosaltres.

I per últim, gracies a mon pare i a ma mare. Ells ho han donat tot per mi i el únic que han volgut sempre es que jo fer-me feliç. Ho heu aconseguit, espere no decebre-us.

*Els mars naixen a les valls,
Si vols viure el que somies,
Has de començar somiant.*

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El problema de la contaminación del agua	1
1.2. Contaminantes emergentes	2
1.2.1. Disruptores endocrinos (EDCs).....	2
1.2.2. Compuestos con actividad <i>dioxin-like</i>	4
1.3. Valoración de la actividad endocrina y <i>dioxin-like</i> : bioensayos.....	5
1.3.1. Ensayos con levaduras recombinantes: RYA (Recombinant Yeast Assay)	6
1.4. Nuevos tratamientos de descontaminación de aguas residuales	9
1.5. La industria del corcho	13
1.5.1. Contaminantes específicos	14
Ácido tánico.....	14
Ácido gálico	15
Ácido elágico.....	16
2,4-Dinitrofenol	17
Ácido protocatecuico	18
Ácido sinápico.....	19
Ácido siríngico.....	20
Ácido vanílico.....	20
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAL Y MÉTODOS	22
3.1. Muestras.....	22
3.2. Preparación y extracción de las muestras.....	22
3.3. Ensayos de toxicidad: Recombinant Yeast Assay (RYA)	23
3.3.1. Organismos de ensayo.....	23
3.3.2. Preparación de medios de cultivo	23
3.3.3. Reactivos	24
3.3.4. Cultivo de la levadura	25
3.3.5. Procedimiento de ensayo	25
3.3.6. Análisis de datos: cálculo de equivalentes.....	27
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
4.1. Proceso de tratamiento de resultados.....	30
4.2. Valoración de la actividad de interrupción endocrina-ensayo RYA-ER.....	31

4.2.1. Actividad de disrupción endocrina en las muestras de aguas complejas, sometidas a tratamiento.....	31
4.2.2. Actividad de disrupción endocrina de los compuestos derivados de la industria del corcho	34
4.3. Valoración de la actividad dioxin-like - ensayo RYA-AhR	35
4.3.1. Actividad dioxin-like en las muestras de aguas complejas, sometidas a tratamiento ...	35
4.3.2. Actividad dioxin-like de los compuestos derivados de la industria del corcho.....	36
5. CONCLUSIONES	37
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
7. ANEXOS	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Poder de oxidación relativo de algunas especies.....	10
Tabla 2. Constante de reacción (k, M-1 s-1) del ozono y del radical hidroxilo.....	11
Tabla 3. Tipos de Procesos de Oxidación Avanzada (AOPs).	11
Tabla 4. Propiedades físico-químicas del ácido tánico.....	15
Tabla 5. Propiedades físico-químicas del ácido gálico.....	16
Tabla 6. Propiedades físico-químicas del ácido elágico.....	17
Tabla 7. Propiedades físico-químicas del 2,4-dinitrofenol.....	18
Tabla 8. Propiedades físico-químicas del ácido protocatecuico.....	19
Tabla 9. Propiedades físico-químicas del ácido sinápico.....	19
Tabla 10. Propiedades físico-químicas del ácido siríngico.....	20
Tabla 11. Propiedades físico-químicas del ácido vinílico.....	20
Tabla 12. Actividad estrogénica (EEQ de E2) de las muestras de agua.....	31
Tabla 13. Carbono Orgánico Total de las muestras de agua tratadas.....	32
Tabla 14. Concentraciones de 17 β -Estradiol detectadas en muestras de agua.....	33
Tabla 15. Valores NOEC* y concentraciones iniciales de los compuestos para el ensayo.....	34
Tabla 16. Actividad estrogénica (EEQ de E2) de los compuestos químicos.....	34
Tabla 17. Actividad dioxin-like de las muestras de agua tratadas.....	35
Tabla 18. Actividad dioxin-like de los compuestos químicos.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema que muestra las reacciones en cadena en la levadura inducidas por la unión de un compuesto estrogénico a su receptor específico (ER). Ensayo RYA-ER con detección colorimétrica	7
Figura 2. Esquema que muestra las reacciones en cadena en la levadura inducidas por la unión de un compuesto con actividad dioxin-like a su receptor específico (AhR). Ensayo RYA-AhR	9
Figura 3. Sistema de extracción a vacío Extra Vac 12 (Scharlau) para cartuchos de SPE.....	23
Figura 4. Disposición de las distintas diluciones de la muestra analizadas y controles en la microplaca	26
Figura 5. Síntesis de β -galactosidasa consecuencia de la unión del ligando al receptor ER	27
Figura 6. Rectas de regresión: Fluorescencia/Tiempo.....	30
Figura 7. Actividad relativa de una muestra representativa.....	31
Figura 8. Degradación de los compuestos químicos que forman la muestra de agua sometida a foto-Fenton a lo largo del tiempo de tratamiento	32

ÍNDICE DE SIGLAS

2,4-DNP: 2,4-dinitrofenol

AhR: receptores específicos de aril-hidrocarburos

AOPs: Procesos de oxidación avanzada

Arel: Actividad relativa

BaP: benzo[a]pyreno

BNF: β -naftoflavona

DQO: demanda química de oxígeno

DBO: demanda biológica de oxígeno

E2: 17 β -estradiol

EDC: Contaminantes con actividad disruptora endocrina.

EDAR: Estaciones de depuración de aguas residuales

EQQ: Equivalentes del patrón

ER: Receptor de estrógenos

ERE: Elemento de respuesta a estrógenos

MU-gal: 4-metilumbeliferil b-d galactosidasa.

NOEC: Concentración sin efecto observado

PAHs: Hidrocarburos aromáticos policíclicos

PCA: Ácido protocatecuico

PCBs: Bifenilos policlorados

RYA: Recombinant Yeast assay

SD: Synthetic Dextrose

SPE: Solid Phase Extraction

YPD: Yeast Peptone Dextrose

YPER: Yeast Protein Extraction Reagent

TCDD: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina

TEF: Factor de toxicidad equivalente

INTRODUCCIÓN

1.1. El problema de la contaminación del agua

En las últimas décadas tanto en el ambiente social como científico, existe un creciente interés relacionado con la alteración del medioambiente y las correspondientes consecuencias de este hecho en los organismos que lo pueblan. Entre estas alteraciones se encuentran las debidas a la presencia de contaminantes en el agua, introducidos en el ciclo por la acción humana, sobre todo por la actividad industrial.

Uno de los mayores aspectos de la cualidad del agua es la contaminación química por metales pesados, disolventes, plaguicidas, etc. Los productos químicos entran en el medio acuático de muy diferentes formas, incluso vertidos directamente, como los efluentes industriales o de plantas de tratamientos de agua (WWTP). En general, muchas sustancias solubles en agua pueden ser transportadas y distribuidas más fácilmente en el ciclo del agua (Oller et al., 2011).

Por tanto, cada vez más grupos de investigación dedican su esfuerzo en la búsqueda de nuevos métodos más eficientes en la eliminación de estas sustancias generadas por la actividad industrial, así como de métodos para detectar la calidad del agua y sus posibles efectos en el ecosistema.

En el pasado, la atención fue centrada en detectar los efectos directos e individuales de los contaminantes a corto plazo en el ecosistema. Pero como el conocimiento científico ha avanzado, ahora que las emisiones más concentradas se han reducido, la evaluación medioambiental revela un considerable número de efectos crónicos que normalmente no son detectados hasta después de un largo periodo de tiempo. La evaluación también suele concentrarse mayoritariamente en los efectos individuales de las sustancias, algo que obvia los efectos de la interacción en la mezcla de sustancias. En la actualidad se tiende a la evaluación de la calidad del agua mediante bioensayos, los cuales han demostrado tener ventajas respecto a los ensayos químicos tradicionales (Oller et al., 2011).

En la práctica, la aplicación de los métodos de descontaminación de las aguas debe tener en cuenta fundamentalmente la naturaleza y las propiedades fisicoquímicas de éstas o efluentes a tratar. Las aguas contaminadas por la actividad humana pueden, en general, ser procesadas eficientemente por plantas de tratamiento biológico, por adsorción con carbón activado u otros adsorbentes, o por tratamientos químicos convencionales. Sin embargo, las aguas industriales a diferencia de las aguas domésticas suelen tener una composición no similar cuantitativamente y cualitativamente (Oller et al., 2011). Por tanto, en algunos casos estos procedimientos resultan inadecuados para alcanzar el grado de pureza requerido por ley o por el uso ulterior del efluente tratado. Sobre todo, se debe poner atención en la reutilización de agua, ya sea de procedencia industrial o domestica para otros usos.

El interés de la sociedad por el medioambiente y el ahorro de recursos unido a los problemas de escasez de agua de algunas zonas del planeta han facilitado que se extienda el uso de aguas procedentes de plantas de depuración. Como se ha demostrado, muchos de los procedimientos de tratamientos son insuficientes por lo que al final de éstos, el agua aún contiene contaminantes que tienen actividades perjudiciales para el ecosistema, como por ejemplo la actividad endocrina. Además el reiterado uso de estas aguas produce una acumulación de estos contaminantes en el ecosistema acuático, aumentando cada vez más su concentración. Con esto, no se plantea que la reutilización de agua sea una mala estrategia de ahorro de

recursos, si no que se pone de manifiesto la necesidad de tratamientos más eficaces de eliminación de contaminantes y de evaluación de la calidad de las aguas al final del proceso de depuración. A tal efecto, y cada vez más crecientemente, se está recurriendo en los países industrializados al uso de las llamadas Tecnologías o Procesos Avanzados de Oxidación (TAOs, PAOs o AOPs, siglas en inglés) que ofrecen una perspectiva prometedora para la descontaminación de todos estos contaminantes de las aguas residuales (Doménech et al., 2001).

1.2. Contaminantes emergentes

El crecimiento de la población mundial y el aumento de la actividad industrial y agrícola, sumados a un uso irracional del agua, han conllevado a un deterioro de la calidad de este recurso vital. Algunas sustancias de uso doméstico, agrícola e industrial son incorporadas al medioambiente principalmente a través de los desagües, y debido a su estabilidad y solubilidad en el agua, resultan resistentes ante las técnicas convencionales de tratamiento empleadas en las estaciones depuradoras de aguas residuales y terminan siendo descargados a través de sus efluentes a las aguas superficiales (Marugán et al., 2012). Dentro de estas sustancias persistentes, destacan los denominados contaminantes emergentes.

Los contaminantes emergentes comprenden un grupo diverso de compuestos químicos, incluyendo productos farmacéuticos, drogas de abuso, productos de cuidado personal, esteroides y hormonas, agentes tensoactivos, compuestos perfluorados, aditivos industriales y agentes y aditivos de la gasolina, así como sus productos de transformación (US. EPA, 2002; OECD, 2000).

Una vez liberados en el medio ambiente, los contaminantes emergentes están sujetos a procesos de degradación (biodegradación y degradación química y fotoquímica) que contribuyen a su eliminación, aunque en la mayoría de los casos, pueden llegar a formarse productos que difieren en comportamiento ambiental y perfil ecotoxicológico (Sánchez-Prado et al., 2010). Este tipo de contaminantes representa un riesgo potencial para las especies vivas, puesto que se ha comprobado que muchos de éstos presentan efectos de mutación genética, carcinogénesis, defectos congénitos y disrupción del sistema endocrino (Bolong et al., 2009).

Los contaminantes emergentes se definen como compuestos que no están contemplados en los actuales reglamentos de calidad del agua, no se han estudiado antes y se cree que son posibles amenazas para los ecosistemas del medio ambiente y para la seguridad y salud humana.

Además de una alta toxicidad, estas sustancias se caracterizan por una alta persistencia medioambiental y alta lipofiliidad lo que resulta en una bioacumulación en la cadena trófica, incrementando el riesgo medioambiental y para la salud humana.

1.2.1. Disruptores endocrinos (EDCs)

Uno de los efectos de mayor preocupación y repercusión, tanto en la salud humana como en la de los organismos es la disrupción endocrina por parte de algunos de los mencionados contaminantes emergentes.

La agencia americana para la protección del medio ambiente (EPA, US) define los disruptores endocrinos (EDCs) como xenobióticos que interfieren en la síntesis, secreción, transporte, unión, acción o eliminación de las hormonas naturales en el cuerpo, las cuales son

responsables del mantenimiento de homeostasis, reproducción, desarrollo y/o comportamiento de los organismos (Blegiomo et al., 2007).

Se han identificado más de 500 sustancias químicas sintéticas con estructuras químicas y usos muy variados (Liu et al., 2009; Itekin et al., 2007) sobre las que se conoce o se sospecha su actividad estrogénica. Destacan los insecticidas clorados, tales como DDT, dieldrin y metoxicloro; insecticidas organofosforados como clornitrofenol, fenitrotion y fention, así como compuestos usados en la fabricación de plásticos y en la industria de los detergentes, tales como alquilfenoles y bisfenol A. Otros compuestos como los PCBs (bifenilos policlorados) poseen actividad hormonal anti-tiroidea, además de actividad estrogénica. Todos estos compuestos pueden alterar el equilibrio del sistema endocrino de los seres humanos y de otras muchas especies de seres vivos, como moluscos, crustáceos, peces, reptiles, aves y mamíferos (Romano-Mozo, 2012) provocando una gran variedad de efectos adversos como cánceres dependientes de hormonas, desordenes de los sistemas reproductivos y anomalías del comportamiento normal reproductivo. Los efectos en los animales son variados y entre otros, se produce un síndrome que resulta en una feminización de machos, reducción de la próstata y vesícula seminal o una incompleta formación testicular. También se observa alteraciones en la función tiroidea de las aves y peces, disminución de la fecundidad y de la eficacia en el proceso de incubación de peces, aves y mamíferos (Romano-Mozo, 2012). Esto se puede explicar por varios modos de acción como la reducción de síntesis hormonal, incremento del pulso de hormonas en el cuerpo o el bloqueo de receptores (Romano-Mozo, 2012). La principal función de un sistema endocrino es transformar estímulos a mensajeros químicos y hormonas, resultando una expresión adecuada de genes y síntesis de proteínas y/o activación de sistemas enzimáticos específicos. El crecimiento humano, la coordinación del desarrollo y la maduración implican una compleja interacción de señales hormonales que tienen consecuencias permanentes en la forma y función de tejidos (Auriol et al., 2006).

Por otra parte, es necesario considerar la actividad de los metabolitos de estos productos, fruto de las biotransformaciones que tienen lugar en las células. Así, por ejemplo, es uno de los metabolitos del bisfenol A el que exhibe actividad estrogénica. Los alquilfenoles etoxilados se usan en detergentes, plaguicidas, etc. y pueden llegar a ser más tóxicos que las sustancias que les dan origen (Becerril, 2009).

Estas sustancias que interactúan directamente con el receptor tienen el potencial para producir efectos a muy bajas concentraciones (Gaido et al., 1997), lo que dificulta su detección cuando se encuentran por debajo de los límites de detección de los procedimientos analíticos (Noguerol et al., 2006). Por ejemplo el estradiol puede tener actividad estrogénica en peces a niveles tan bajos de 0.1 a 10 ng/L (Saura et al., 2004).

Los efluentes industriales/municipales y los desechos urbanos/agrícolas son importantes fuentes de vertidos de EDCs dentro del medio acuático. En particular, destacan los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales de origen doméstico ya que pueden contener hormonas masculinas y femeninas excretadas con la orina y que son sólo parcialmente eliminadas por tratamiento convencional (Itekin et al., 2007; Belgiomo et al., 2007).

Compuestos como nonilfenol, bisfenol A, y los estrógenos esteroideos naturales y sintéticos tales como estrona, 17 β -estradiol (E2), estriol y 17 α -etinil estradiol, han sido identificados como los principales contaminantes. Su presencia en las aguas residuales se agrava ya que algunos son eliminados por el hombre como restos glucurónidos y sulfatos solubles en agua, pudiéndose

disociar de nuevo en estrógenos libres más activos (Fernández et al., 2009). Por tanto, es de máxima importancia el desarrollo de herramientas que puedan detectar la presencia de disruptores endocrinos en aguas (Céspedes et al., 2004; Noguerol et al., 2006; Bistan et al., 2011).

Aunque muchos estudios han mostrado los efectos de los EDCs, todavía muchos países no tienen establecidos límites de EDCs en el vertido de aguas residuales (Belgiomo et al., 2007).

La clave para resolver el problema que se plantea es la identificación de los EDCs, la medida real de su presencia en sistemas acuáticos y el desarrollo de métodos de eliminación del medioambiente (Liu et al., 2009).

La reutilización de las aguas residuales está creciendo en importancia, pero se ha de tener cuidado en su uso para obtener los máximos beneficios y minimizar los riesgos. Varias normativas europeas regulan los disruptores endocrinos. En 1999 La Comisión Europea publicó la Estrategia Comunitaria en materia de alteradores endocrinos COM (1999)706, que estableció las líneas de actuación a corto, medio y largo plazo para hacer frente a los riesgos de la salud ocasionados por los EDCs. A lo largo de los años 2001, 2004 y 2007 la Comisión ha ido publicando informes sucesivos sobre la aplicación de la estrategia. Entre otras iniciativas destacan el establecimiento de una lista prioritaria de sustancias con capacidad de alteración endocrina, identificación de grupos de población vulnerables y mediciones de niveles de EDCs en el medioambiente. A medio y largo plazo las acciones se centran en el desarrollo de métodos de identificación y evaluación de riesgos.

Concretamente, en España no ha habido ninguna iniciativa en este sentido hasta la fecha, limitándose a transponer las directrices comunitarias, como la prohibición de comercialización de biberones con bisfenol A. El único avance importante en España ha sido la inclusión de una anotación "ae" (alteración endocrina) en la lista de valores límite de exposición profesional a agentes químicos que publica anualmente el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (Romano-Mozo, 2012).

1.2.2. Compuestos con actividad *dioxin-like*

Bajo el término de dioxinas se incluye una serie de compuestos químicos con estructura casi planar y con propiedades químicas y físicas muy similares entre sí: dibenzo-dioxinas, furanos polihalogenados, PCBs (bifenilos policlorados), PAHs (hidrocarburos aromáticos policíclicos), entre otros.

Algunos de ellos (dioxinas y furanos) no son generados intencionadamente, sino como productos secundarios de la actividad industrial (fabricación de pasta de papel, producción de plásticos) y procesos de combustión. Otros, como los PCBs sí que han tenido un uso específico (refrigerantes industriales) pero actualmente se encuentran en desuso. Los PAHs se encuentran formando parte del humo del tabaco, tiene su origen en la combustión de materia orgánica (incendios forestales y o de combustibles fósiles).

Debido a su gran estabilidad química son contaminantes medioambientales persistentes y, dado que son lipofílicos, tienden a acumularse en el tejido adiposo de los animales.

El 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina, también denominado TCDD o, simplemente, dioxina, es el miembro prototipo de esta clase de compuestos y el más ampliamente estudiado. El TCDD es la sustancia cancerígena más potente que se ha utilizado en animales de experimentación, en los

que se ha caracterizado exhaustivamente su efecto como inductor de tumores. Generalmente la actividad *dioxin-like* se mide asignándole a la sustancia un factor de toxicidad equivalente (TEF) relacionado con la sustancia con mayor actividad, el TCDD (TEF 1) (Rodríguez et al., 2008).

Las dioxinas o los compuestos *dioxin-like* son ejemplos de contaminantes orgánicos persistentes que inducen toxicidad en el medio, tanto para humanos como para animales. Entre los efectos de éstos compuestos se observan consecuencias en la vida de vertebrados, especialmente en el desarrollo temprano, incluyendo aspectos neurológicos, inmunológicos y reproductivos (White et al., 2008).

1.3. Valoración de la actividad endocrina y *dioxin-like*: bioensayos

La presencia de compuestos estrogénicos en el agua y sus efectos sobre los organismos acuáticos se ha convertido en un indicador importante de la contaminación de origen humano e industrial (Noguerol et al., 2006).

Se hace necesario encontrar herramientas de monitorización medioambientales con una ratio coste-efectividad eficiente, además de servir como un método de evaluación de las nuevas tecnologías de descontaminación. En algunos casos, se ha encontrado que la toxicidad del efluente crece durante el tratamiento debido a la formación de intermediarios tóxicos. Es importante tener en mente que diferentes procesos darán diferentes productos intermedios (Oller et al., 2011). De esta forma los bioensayos son la clave para estudiar la eficacia de los diferentes tratamientos (Marugán et al., 2012).

Debido a la gran variedad de productos químicos con actividad similar al estrógeno, el análisis instrumental clásico no es lo más adecuado para evaluar la potencia estrogénica de mezclas complejas. Esto es debido a que las concentraciones a las que se encuentran son inferiores a los límites de detección de los métodos analíticos convencionales (Nguyen et al., 2011).

En los últimos años se han desarrollado una serie de ensayos, tanto *in vitro* como *in vivo*, para identificar y evaluar sustancias con presunta actividad estrogénica o, en su caso, el potencial que presentan (Céspedes et al., 2004; Noguerol et al., 2006; Brix et al., 2010; Nguyen et al., 2011).

Los ensayos *in vivo* son altamente valiosos para evaluar el efecto biológico global de un compuesto (Nguyen et al., 2011). Algunos ejemplos de ensayos *in vivo* son: el ensayo uterotrófico de ratón (Tinwell et al., 2000) que detecta la capacidad de un químico para estimular o inhibir la respuesta estrogénica del útero; el ensayo de Hershberger (Liu et al., 2011) que detecta la capacidad de un químico de estimular o inhibir la respuesta androgénica en los testículos y órganos sexuales secundarios; y el ensayo de reproducción de peces (Schwartz et al., 2010) que examina las anomalías asociadas con la supervivencia, comportamiento reproductivo, características sexuales secundarias, fecundación, número de huevos, fertilidad, y desarrollo de la prole.

Sin embargo, debido a los altos costes, la laboriosidad que representan, su relativamente escasa sensibilidad y su modesta capacidad de respuesta, los ensayos *in vivo* son generalmente inadecuados para la detección de la actividad estrogénica a gran escala. Además, los enfoques *in*

vivo no son capaces de identificar los mecanismos endocrinos para los efectos observados (Nguyen et al., 2011).

En los ensayos *in vitro*, tales como los ensayos competitivos de unión a ligando, la proliferación celular, los ensayos de transcripción del receptor de estrógeno (Céspedes et al., 2004), y los ensayos con levaduras recombinantes, son más adecuados. Cada ensayo mide diferentes aspectos de la cadena de efectos que resultan de los compuestos estrogénicos (Murk et al., 2002).

Los más utilizados son los ensayos de proliferación celular basados en el uso de células humanas de cáncer de mama (células MCF7 y células T47D) (Céspedes et al., 2004). Pero estos ensayos presentan un problema debido a que las células también expresan andrógenos, progesterona, receptores de glucocorticoides y retinoides; lo que puede comprometer la idoneidad del ensayo si las sustancias son también capaces de unirse a otros receptores. Además, las respuestas proliferativas se producen sólo después de un número de días (Céspedes et al., 2004).

1.3.1. Ensayos con levaduras recombinantes: RYA (Recombinant Yeast Assay)

Medida de la actividad estrogénica

Entre los diferentes ensayos de estrogénicidad funcionales disponibles en la actualidad, el ensayo de levadura recombinante (RYA) es uno de los más convenientes para evaluar el potencial endocrino de disrupción de una sustancia o de una muestra ambiental (Céspedes et al., 2004).

El ensayo RYA está basado en una cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* modificada genéticamente, desarrollada por el departamento de Genética de Glaxo (Inglaterra). Routledge y Sumpter (1996) pusieron a punto el ensayo con la finalidad de analizar los principales grupos de agentes tensioactivos debido a la aparición de daños en el sistema reproductivo, problemas en el desarrollo y la elevada incidencia de cánceres, detectados tanto en los seres humanos como en la vida silvestre, relacionados con los contaminantes ambientales capaces de imitar las actividades biológicas de los estrógenos.

La levadura, es un organismo del que se conoce totalmente su genoma, además, es considerado como modelo de célula eucariótica. La modificación a la que se sometió consiste en la adición de un receptor estrogénico humano en el ADN de la levadura (hER- α) instalándose como un gen cromosomal, y un gen reportero a nivel plasmidial (Lac-Z), el cual codifica para la síntesis del enzima β -galactosidasa gracias a la ayuda de un promotor transcripcional o elemento de respuesta estrogénica (ERE) y a un promotor fuerte (PGk) (Roda et al., 2006).

La presencia de un contaminante con potencial estrogénico es detectado por la levadura. El contaminante se une al receptor hormonal (hER), el cual se transforma en un receptor activo, éste estimula al activador transcripcional y se expresa el gen reportero produciéndose el enzima β -galactosidasa, el cual sale al medio y, actúa sobre un sustrato cromógeno. El producto de la reacción se detecta mediante un espectrofotómetro (Figura 1). La cinética de la aparición del nuevo compuesto está directamente relacionada con la cantidad de enzima producido, que a su vez se relaciona con la concentración del compuesto estrogénico (Noguerol et al., 2006).

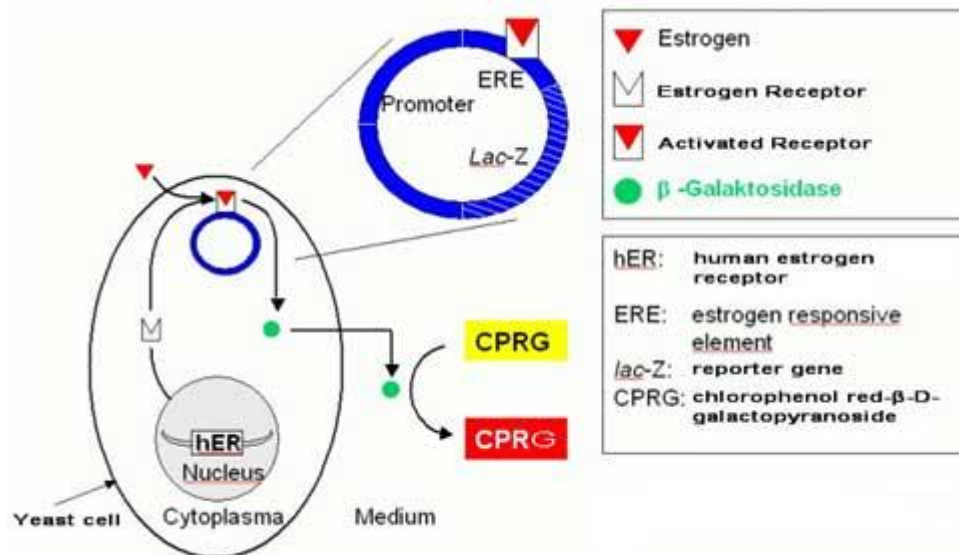


Figura 1. Esquema que muestra las reacciones en cadena en la levadura inducidas por la unión de un compuesto estrogénico a su receptor específico (ER). Ensayo RYA-ER con detección colorimétrica (Routledge & Sumpter, 1996.).

También se suele utilizar la detección por fluorescencia en lugar de la colorimétrica. En este caso, el enzima β -galactosidasa actúa sobre el sustrato Mu-Gal que se añade al medio, cuyo producto genera fluorescencia (Noguerol et al., 2006). La fluorescencia se lee con una longitud de onda de excitación de 360 nm y, de emisión de 460 nm.

Los ensayos RYA tienen algunos inconvenientes indudables. En algunos casos, las especies que interactúan con los receptores celulares de los vertebrados *in vivo* no son el compuesto original, sino uno de sus metabolitos, fruto de las biotransformaciones. Además, los ensayos RYA no permiten la caracterización química exacta de los ligandos de los receptores hormonales, es decir, del compuesto con actividad disruptiva endocrina, sólo la detección y cuantificación de la actividad total, agonista o antagonista de un compuesto dado o de la muestra que lo contiene. Sin embargo, el uso de levaduras para estudiar la estrogenicidad tiene muchas ventajas por su bajo coste, fácil manipulación y crecimiento rápido en el laboratorio, lo que proporciona la oportunidad de probar un gran número de muestras o compuestos pobremente caracterizados así como evaluar simultáneamente su toxicidad aguda (Céspedes et al., 2004; Noguerol et al., 2006). Todo ello ha hecho que los ensayos RYA sean uno de los métodos más elegidos en este campo.

Dos características de la célula de levadura contribuyen al éxito de los ensayos RYA. En primer lugar, la levadura no tiene un sistema endógeno homólogo a receptores de vertebrados que podrían interferir en el ensayo. En segundo lugar, el proceso de post traducción y plegamiento de la proteína de vertebrado en levaduras es muy similar a la de las células de mamíferos, lo que resulta en la preservación de la estructura del receptor nativo cuando se expresa en levadura. Esto es de interés primordial, ya que la estructura correcta del dominio de unión a ligando del receptor determina la especificidad del sistema, es decir, su capacidad para distinguir entre los ligandos y los no-ligandos (Noguerol et al., 2006).

Estudios previos han indicado que el uso de ensayos basados en levaduras modificadas genéticamente puede ser una metodología altamente fiable para un primer nivel de cribado en la evaluación de la calidad del agua en términos de actividad estrogénica (Pawlowski et al., 2003; Reddy y Brownawell, 2005; Schmitt et al., 2005). En la actualidad, los bioensayos para la determinación de la actividad estrogénica basados en levaduras se utilizan principalmente con fines de investigación dentro de la vigilancia ambiental (Céspedes et al., 2005; Thomas et al., 2004; Tollefsen et al., 2007). Sin embargo, un enfoque diferente, consistiría en cribar muestras ambientales desconocidas para su actividad estrogénica total sin conocimiento de la presencia de compuestos individuales. En este enfoque, la idea es usar el ensayo como un método de selección previo a su análisis químico, por lo tanto, básicamente, debe dar respuestas afirmativas o negativas respecto a si hay o no actividad hormonal. Las muestras con una respuesta positiva pueden ser analizadas adicionalmente por técnicas cromatográficas para identificar y cuantificar los compuestos activos. El propósito de este tipo de pruebas es realizar una eliminación rápida y barata de muestras que tienen bajas actividades estrogénicas y permitir así un mayor análisis en profundidad de las muestras que dan una clara respuesta positiva en el bioensayo (Brix et al., 2010).

En este sistema cualquier compuesto con actividad estrogénica, presente en el medio se une al receptor de estrógenos (hER), y forma un complejo que dimeriza. Este dímero se une al Elemento de Respuesta a Estrógenos (ERE) y se activa la transcripción del gen LacZ. El enzima β -galactosidasa se libera al medio transformando un determinado sustrato en un producto fácilmente detectable (Noguerol, 2007).

Con este tipo de ensayo se pueden detectar una gran variedad de compuestos estrogénicos ya que el hER no sólo se une a esteroides femeninos, como 17- β -estradiol y sus derivados, sino que puede unirse a otros tipos de estructuras químicas con efectos feminizantes. Gran cantidad de compuestos naturales, farmacéuticos o industriales como plaguicidas, presentan actividad estrogénica, es decir, pueden actuar como ligandos del hER y dar positivo en el ensayo (Céspedes et al., 2004; Noguerol, 2007).

Medida de la actividad *dioxin-like*

Como ya se ha mencionado, el sistema endocrino de los seres humanos y animales se ve afectado también por compuestos similares a las dioxinas (*dioxin-like*). Estas sustancias siguen un patrón de respuesta similar a los disruptores endocrinos, uniéndose a receptores específicos de aril-hidrocarburos (AhR).

A tal efecto se ha desarrollado un método similar al anterior en el que la levadura tiene integrado en el cromosoma un promotor GAL (galactosa), el translocador ARNt y el receptor AhR (Miller, 1999). El receptor AhR forma un complejo con el compuesto *dioxin-like*. El translocador ARNt se une a dicho complejo formando una estructura que se une al elemento de respuesta a xenobióticos XRE e inicia la transcripción del gen reportero LacZ. La presencia de ARNt hace que el complejo tenga el tamaño suficiente para ocupar el centro activo de la polimerasa y activarla. Se ha demostrado que sin ARNt los ligandos de pequeño tamaño no actúan en la transcripción del gen LacZ.

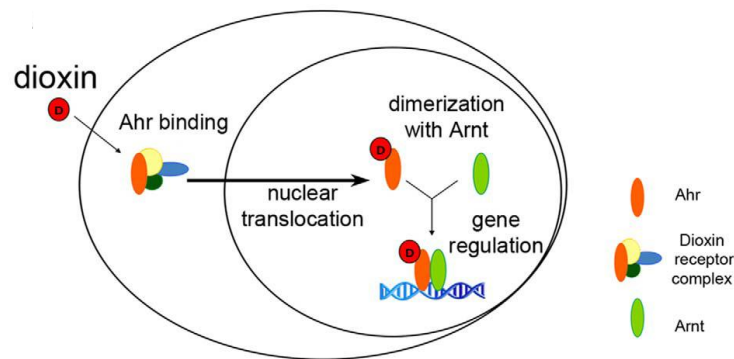


Figura 2. Esquema que muestra las reacciones en cadena en la levadura inducidas por la unión de un compuesto con actividad *dioxin-like* a su receptor específico (AhR). Ensayo RYA-AhR. Fuente: Céspedes et al. (2010).

Aunque este ensayo puede servir como una herramienta útil en la identificación de sustancias químicas, la opinión general es que no solo un ensayo *in vitro* puede determinar la actividad disruptiva de una sustancia química, ya que no se tiene en cuenta la acumulación de estas sustancias en el organismo, el metabolismo y la disponibilidad de los componentes en la célula diana. Por eso se propone este tipo de ensayos como un componente útil dentro de una estrategia *in vitro-in vivo* para encontrar los efectos de disrupción endocrina (Gaido et al., 1997).

1.4. Nuevos tratamientos de descontaminación de aguas residuales

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la contaminación del agua por la continua aportación de contaminantes como fármacos y/o plaguicidas y la necesidad de conservar el medio ambiente ha provocado la búsqueda y desarrollo de nuevos métodos cada vez más eficientes para descontaminar las aguas residuales.

De todos los procedimientos, los métodos biológicos, aerobios y anaerobios, han sido reconocidos por ser la forma más viable de depuración de aguas residuales. Sin embargo la alta toxicidad de los efluentes puede inhibir parcialmente los microorganismos, particularmente sensibles a la presencia de algunos componentes orgánicos (Peres et al., 2004), lo cual resulta en una disminución de la actividad de degradación (Bernardo et al., 2011).

La biodegradabilidad es un factor importante a considerar cuando se elige un tratamiento de aguas residuales apropiado. Muchos estudios han demostrado que los procesos biológicos usados para el tratamiento de estas aguas, especialmente los lodos activados, resultan en una reducción insuficiente de la demanda química de oxígeno (DQO) debido a la baja biodegradabilidad del contenido orgánico, especialmente de los componentes fenólicos que también presentan una toxicidad significativa. Por ello, han sido estudiados varios métodos fisicoquímicos para mejorar esa disminución de la DQO e incrementar la biodegradabilidad (Bernardo et al., 2011).

La biodegradación es vista como un proceso útil en el tratamiento del agua, el cual bajo condiciones adecuadas, pueden promover una eficiente reducción de materia orgánica con un gasto de energía mínima, y por tanto, con un bajo coste. La mayor limitación es la

biodisponibilidad de la materia orgánica y el encontrar biodegradadores eficientes (Días-Machado et al., 2006).

Para aumentar la biodegradabilidad de la materia orgánica de las aguas residuales se han propuesto diferentes tecnologías (Segneanu et al., 2013):

- Procesos no-destructivos basados en procesos físicos de adsorción y/o filtración.
- Procesos biológicos destructivos mediante lodos activados.
- Procesos oxidativos destructivos basados en procesos de oxidación química, que a su vez pueden incluirse en una de estas categorías:
 - incineración
 - WO (“Wet Oxidation”): Alta temperatura de presión y temperatura.
 - Oxidación líquida: AOPs (Procesos de oxidación avanzada), operando en condiciones de presión y temperatura mediante el uso de agentes oxidantes como el O_3 , H_2O_2 con catalizadores y/o radiaciones UV.

De todos estos procedimientos o tecnologías, los AOPs constituyen los más estudiados y sobre los que se dirigen la mayoría de los esfuerzos en investigación.

Los AOPs se basan en procesos fisicoquímicos capaces de producir cambios profundos en la estructura química de los contaminantes. En 1987, Glaze los definió como procedimientos de tratamiento de agua a una presión y temperatura cercanas a las ambientales que involucran la generación de radicales hidroxilos ($OH\cdot$) en una cantidad suficiente para tener como efecto la purificación del agua (Munter, 2001).

El radical hidroxilo es un oxidante químico poderoso y no selectivo (Tabla 1) que actúa muy rápido con la mayoría de compuestos orgánicos (Tabla 2); puede ser generado por medios fotoquímicos (incluida la luz solar) o por otras formas de energía. Posee alta efectividad para la oxidación de materia orgánica, siendo no selectivos por lo que pueden oxidar una gran variedad de compuestos químicos. Han sido utilizados a nivel global en tratamientos de agua residual y contaminada, para la eliminación de materia orgánica e inorgánica y para mejorar la biodegradabilidad del agua residual de origen industrial antes de los procesos de tratamiento biológico (Arslan Alaton y Teksoy, 2007; Rizzo et al., 2008; Zapata et al., 2010).

Tabla 1. Poder de oxidación relativo de algunas especies.

Especies oxidantes	Poder de oxidación relativo
Clorina	1,00
Ácido hipocloroso	1,10
Permanganato	1,24
Peróxido de hidrogeno	1,31
Ozono	1,52
Oxígeno atómico	1,78
Radical hidroxilo	2,05
TiO_2^+	2,35

Fuente: Munter (2001).

Tabla 2. Constante de reacción (k , $M^{-1} s^{-1}$) del ozono y del radical hidroxilo.

Compuesto	O ₃	OH·
Alquenos clorados	10^3-10^4	10^9-10^{11}
Fenoles	10^3	10^9-10^{10}
Orgánicos que contienen N	$10-10^2$	10^8-10^{10}
Compuestos aromáticos	$1-10^2$	10^8-10^{10}
Cetonas	1	10^9-10^{10}
Alcoholes	$10^{-2}-1$	10^8-10^9

Fuente: Doménech et al. (2001).

Entre los AOPs más estudiados en el tratamiento de aguas residuales se encuentran la fotocatalisis heterogénea y homogénea, la ozonización, la reacción de Fenton, los ultrasonidos, la oxidación electroquímica y la oxidación en húmedo del aire (Rizzo, 2011).

Los AOPs pueden ser usados en tratamientos de aguas residuales con el objetivo de:

- Mejorar la calidad de los efluentes de las plantas de tratamiento de agua residual urbana mediante la eliminación de xenobióticos residuales para reducir la toxicidad final y hacer que el agua finalmente tratada sea reutilizable.
- Desinfectar el agua urbana tratada biológicamente para ser reutilizada, como alternativa a los desinfectantes químicos convencionales (tales como el dióxido de cloro y ozono), que pueden dar lugar a sub-productos tóxicos.
- Incrementar la biodegradabilidad del agua residual de origen industrial antes de su tratamiento biológico.
- Eliminar o convertir a una forma no tóxica los metales que puedan ser encontrados en agua residual de origen industrial.

La Tabla 3 recoge la clasificación de los AOPs en dos grandes bloques, procesos no fotoquímicos y procesos fotoquímicos.

Tabla 3. Tipos de Procesos de Oxidación Avanzada (AOPs).

NO FOTOQUIMICOS	FOTOQUIMICOS
Ozonización en medio alcalino	Oxidación en agua sub/y supercrítica
Ozonización con peróxido de hidrogeno	Procesos fotoquímicos
Procesos Fenton y relacionados	Fotólisis del agua en el ultravioleta de vacío (UVV)
Oxidación electroquímica	UV/peróxido de hidrogeno
Radiólisis y tratamiento con haces de electrones	UV/O ₃
Plasma no térmico	Foto-Fenton y relacionados
Descarga electrohidráulica	Fotocatalisis heterogénea

Fuente: Doménech et al. (2001).

Entre las ventajas de los AOPs cabe mencionar la transformación química de los contaminantes, generalmente se alcanza la mineralización completa; no generan barros que a su

vez requieran descontaminación; son útiles para contaminantes refractarios que resisten otros métodos; sirven para contaminantes a muy bajas concentraciones; mejoran las propiedades organolépticas del agua; en muchos casos consumen menos energía que otros métodos y eliminan los efectos sobre la salud de desinfectantes y oxidantes residuales como el cloro (Doménech et al., 2001).

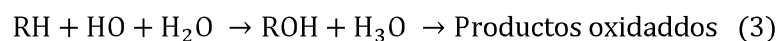
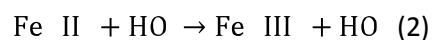
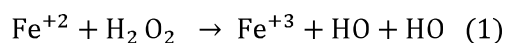
En los últimos años, diferentes AOPs han sido investigados para enfocarlos hacia la eliminación de contaminantes emergentes en los efluentes de aguas residuales urbanas (Baumgarten et al., 2007; Naddeo et al., 2009; Klamerth et al., 2010) y en el agua destinada a ser consumida (Broséus et al., 2009; Sanches et al., 2010).

Las AOPs son especialmente útiles como pretratamiento antes de un tratamiento biológico en el caso de contaminantes resistentes a la biodegradación o como proceso de postratamiento para efectuar un pulido de las aguas antes de la descarga a los cuerpos receptores (Guedes et al., 2003).

Como se ha explicado anteriormente, el agua del estudio realizado es el resultado de la aplicación de la técnica AOP llamada Foto-Fenton, por lo que se exponen sus aspectos concretos.

Muchas de las tecnologías fotoquímicas, fueron desarrolladas al aplicar luz a las tecnologías AOPs ya desarrolladas, este es el caso del Foto-Fenton.

El reactivo de Fenton se basa en peróxido de hidrógeno y sales ferrosas eran capaces de oxidar los ácidos tartárico y málico, y otros compuestos orgánicos. Más tarde, Haber y Weiss sugirieron que se formaba HO· por la reacción 1. Dichos radicales podían reaccionar luego por dos vías, la oxidación de Fe (II) (una reacción improductiva) y el ataque a la materia orgánica (Doménech et al., 2001).



Las ventajas del método son varias: el Fe (II) es abundante y no tóxico, el peróxido de hidrógeno es fácil de manejar y ambientalmente benigno. No se forman compuestos clorados como en otras técnicas oxidantes, y no existen limitaciones de transferencia de masa por tratarse de un sistema homogéneo. El diseño de reactores para la aplicación tecnológica es bastante sencillo (Benítez et al., 2003).

Entre las ventajas que presentan las tecnologías fotoquímicas es que evita el uso de O₃ o reduce su proporción, con la consiguiente reducción de costos, riesgos para la salud y preocupaciones medioambientales; aumenta la velocidad de reacción en comparación con la misma técnica en ausencia de luz, lo que evita el uso de tanques grandes y hace más compactos a los sistemas de tratamientos; evita cambios de pH drásticos, aumenta la flexibilidad del sistema ya que permite el uso de una variedad de oxidantes y condiciones de operatividad y reduce costos operativos debido a un menor consumo de potencia para generar HO·.

Una clave para este proceso foto-activado es la posibilidad de oxidar compuestos orgánicos inhibitorios bajo condiciones suaves de temperatura y presión. Además, la mayoría de ellos usan radiación solar por lo que su aplicación es especialmente indicada para los países con una alta

incidencia solar, como lo son los países Mediterráneos donde son más relevantes las industrias del corcho (Silva et al., 2004).

Aunque se dispone de mucha información de la eficiencia de nuevas tecnologías, es necesaria más información sobre la eficiencia de las nuevas tecnologías (AOPs) para la eliminación de contaminantes concreto. Por esta razón, son requeridos estudios en planta pilotos y a pequeña escala para la recopilación de información para el procesado de aguas industriales (Oller et al, 2011).

Por todo ello, aún quedan por abordarse los siguientes aspectos de los AOPs:

- Un mejor entendimiento de los mecanismos de los AOPs y de los parámetros.
- Medidas de eficiencia de los procesos en condiciones experimentales controladas
- Evaluaciones de los costes relativos para tratamientos selectivos vs otros tratamientos.
- Evaluación de la toxicidad de los productos de los AOPs.

La oxidación parcial de los contaminantes orgánicos puede dar como resultado la formación de componentes intermedios más tóxicos que el original. Para evitar esto, los AOPs deben ser realizados y monitorizados cuidadosamente, y deben acompañarse de test de toxicidad para evaluar el efluente resultante (Rizzo et al., 2009; Klammerth et al., 2010).

1.5. La industria del corcho

La explotación del alcornoque (*Quercus suber* L.) en la Península Ibérica se lleva a cabo desde tiempos históricos, con especial incidencia desde finales del siglo XVII, y alcanzando su máxima importancia en el siglo XX, hasta el presente. El corcho es el producto principal del procesado de las masas de alcornocales.

Las industrias corcheras son el grupo industrial más en auge del sector forestal debido al aumento constante de los precios, lo que posibilita una explotación beneficiosa del producto. (Barroso et al., 1998). Dentro de la producción mundial, que ronda unas 370.000 toneladas anuales, los países con mayor producción son los de la zona del Mediterráneo, especialmente España y Portugal con un 50,5% y un 22,7% de producción anual respectivamente. En España se producen unas 85.000 toneladas, de las que el 25% se dedican a fábricas nacionales (Barroso et al., 1998).

El corcho es utilizado para la fabricación de diversos productos, entre los que se encuentra los tapones utilizados en los diferentes tipos de botellas de vinos. Teniendo en cuenta la importancia de la industria vinícola en España, en los últimos años, se han realizado diversos esfuerzos para incrementar los controles de calidad de estos tapones, con un especial interés en cómo los cambios en la composición del corcho afectan a la calidad del producto final (Benitez et al., 2003). Otros usos del corcho los podemos encontrar en sectores como el de la construcción: aislamientos, revestimientos, decoración; la industria del frío, la industria textil, etc.

El proceso completo desde la extracción del árbol productor hasta el producto final comprende varios pasos. El primero de ellos es el secado del material durante tres meses (Días-Machado et al., 2006). Le sigue la etapa más importante, el cocido del corcho, para la eliminación de insectos y suciedades del corcho y reblandecerlo para su posterior etapa de transformación. En

esta etapa de cocido, el corcho es sumergido en una piscina de agua hirviendo (una temperatura de unos 98 °C) durante aproximadamente 75 minutos, generando un agua residual que contiene sustancias hidrosolubles como sales minerales, compuestos de largas cadenas de carbono, taninos, azúcares, así como algunos compuestos volátiles (derivados del fenol).

Tradicionalmente, la industria del corcho ha sido considerada una industria ecológica, ya que el corcho es un producto natural no contaminante y los procesos de transformación no tienen un impacto natural importante. Sin embargo, el corcho natural contiene en la estructura lignínica y una serie de compuestos tanínicos o clorados que, durante el proceso de cocción se hidrolizan, transformándose entre otros en pentaclorofenol, 2,4,6- tricloroanisol y ácidos polifenólicos. Estos compuestos no solo confieren mal sabor al vino, cava, licores, etc., sino que por su carácter tóxico y cancerígeno están, hoy en día, siendo especialmente controlados sus niveles en tapones de corcho (Benítez et al., 2003).

En total, se producen unos 400 litros de agua por tonelada de corcho (Mendoza et al., 2007). Aunque este proceso mejora las propiedades mecánicas del material, elasticidad, textura y/o consistencia (Benítez et al., 2003), puede llegar a ser un foco de contaminación importante (Beltrán de Heredia et al., 2004). Esta agua se caracteriza por una DQO y DBO altas, y un pH alrededor de 5. Entre los componentes fenólicos que contienen, encontramos los ácidos gálico, protocatecuico, vanílico, sirínico, ferúlico y eláxico, así como fracciones de ácidos tánicos (Oller et al., 2011).

Estos componentes polifenólicos son de descomposición complicada y son potentes toxinas y peligrosos contaminantes orgánicos. Dejar estas aguas contaminadas con los compuestos fenólicos en el medioambiente puede conllevar efectos deletéreos en el ecosistema. Por ejemplo, se ha observado que la circulación física de N y P se ve reducida, así como la mineralización de material orgánica en el suelo si las cantidades de polifenoles aumentan más de un 3%. También se observa que unas concentraciones de polifenoles de 6-7 mg/L en agua, tiene efectos letales para los peces (Fernández-Alba et al., 2002).

Estas aguas resultado de la industria corchera son vertidas directamente, o como veremos más adelante después de procesos de depurado insuficiente, a los ríos cercanos, causando graves problemas medioambientales debido a su alto contenido en contaminantes y su toxicidad.

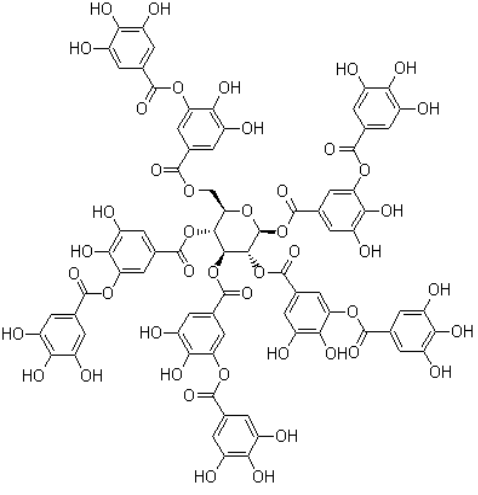
A continuación se revisan las propiedades y características más destacadas de ocho compuestos químicos, derivados de la actividad corchera y que forman parte del estudio llevado a cabo en el presente Trabajo de investigación.

1.5.1. Contaminantes específicos

Ácido tánico

El ácido tánico está presente en multitud de especies vegetales y comidas como el té, granos de cacao, uva, fresa, etc. El ácido tánico tiene beneficios para la salud humana, incluyendo actividad antioxidante y anti-cáncer. Se especula que esa actividad antioxidante sería la responsable de la disminución de la incidencia del cáncer debido a la protección celular al daño oxidativo. En la Tabla 4 se listan sus propiedades físico-químicas así como su estructura química.

Tabla 4. Propiedades físico-químicas del ácido tánico.

Nombre	Ácido Tánico
Nombre IUPAC	2,3-dihidroxi-5-({[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5,6-tetrakis({3,4-dihydroxy-5-[(3,4,5-trihydroxyphenyl) carboniloxi] fenil} carboniloxi) oxan-2-yl] metoxi}carbonil) fenil 3,4,5-trihidroxibenzoato
Peso molecular	1701,28 g/mol
Punto de fusión	218 °C
Fórmula	C ₇₆ H ₅₂ O ₄₆
Solubilidad	259 g/L (20°C) en agua
Densidad	2,12 g/cm ³
Estructura química	

Debido a su estructura polifenólica con un grupo hidroxilo en posición –orto, el ácido tánico puede reaccionar como ligando de iones metálicos formando complejos metal-tánico, como el Mg²⁺, Al³⁺ (Zhang et al., 2012). Pertenecen a un grupo químico conocido como taninos que tienen en común la propiedad química de poder precipitar proteínas.

Pruebas con animales de experimentación demuestran que son responsables de la disminución de la ingesta de alimento, la tasa de crecimiento y la energía neta metabolizable.

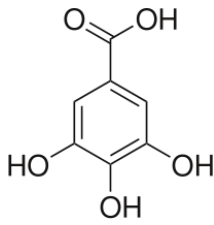
Ácido gálico

El ácido gálico, también conocido como ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico es un ácido fenólico presente en diversas fuentes naturales como plantas (*Larrea tridentata*, gobernadora); frutas como la uva, la granada, las nueces, el plátano, la fresa; verduras como las acelgas o espinacas y bebidas como el café, el vino tinto o el té verde. En la Tabla 5 se muestran las propiedades físico-químicas y la estructura química del compuesto.

Este ácido se obtiene directamente del alimento o por hidrólisis del ácido tánico mediante una reacción con la enzima tanasa, que cataliza la hidrólisis de los enlaces tipo éster presentes en los galotaninos. Asimismo, se le atribuyen varios efectos biológicos, que van desde la actividad

antiinflamatoria, antioxidante y antibiótica, hasta la protección cardiovascular y anticancerígena (Govea et al., 2013).

Tabla 5. Propiedades físico-químicas del ácido gálico.

Nombre	Ácido gálico
Nombre IUPAC	Ácido 3, 4, 5-trihidroxibenzoico
Peso molecular	170,1 g/mol
Punto de fusión	250 °C
Fórmula	C ₇ H ₆ O ₅
Solubilidad	1,5 g/100 mL
Densidad	1,70 Kg/cm ³
	

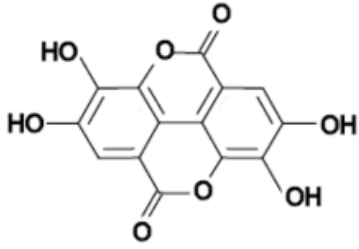
Según Cortés (2012), se ha demostrado que la cadena alquímica lateral de los derivados del ácido gálico es importante para su capacidad antioxidante y que la capacidad de unirse o atravesar la membrana celular depende en gran parte del largo de la cadena lipofílica de los compuestos. La citotoxicidad no es una característica común de los compuestos fenólicos, pero sí es una propiedad específica del ácido gálico, siendo los 3 grupos hidroxilos adyacentes presentes en la molécula los responsables de la citotoxicidad observada.

Ácido elágico

El ácido elágico es un fenol antioxidante natural conocido como 2,3,7,8-tetrahidroxichromeno [5,4,3-cde] cromeno-5,10-diona y está presente en numerosas frutas y verduras. Se trata de una molécula muy termoestable con cuatro grupos fenoles y dos lactonas, los cuales pueden actuar como dadores de hidrógenos o aceptores de electrones, respectivamente. Aunque es muy termoestable tiende a formar complejos fenólicos con otras moléculas como proteínas, polisacáridos y alcaloides. En vista a estas propiedades, este ácido ha tenido mucho interés en el estudio de algunos procesos biotecnológicos. Entre las propiedades descubiertas en los primeros estudios, destacan su capacidad antiproliferativa y antioxidante. Se están realizando estudios sobre su posible uso en el tratamiento de cáncer. En la Tabla 6 se muestran sus propiedades físico-químicas y estructura química.

La apariencia del ácido elágico puro es un sólido cristalino amarillo claro, insoluble en agua y reacciona como un ácido débil.

Tabla 6. Propiedades físico-químicas del ácido elágico.

Nombre	Ácido elágico
Nombre IUPAC	2,3,7,8-tetrahidroxicromeno[5,4,3-cde]cromeno-5,10-diona
Peso molecular	302,197 g/mol
Punto de fusión	362 °C
Fórmula	C ₁₄ H ₆ O ₈
Solubilidad	Insoluble en agua
Densidad	1,67 g/cm ³
Estructura	

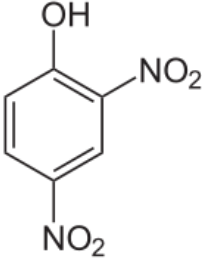
2,4-Dinitrofenol

Los compuestos nitroaromáticos se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente y han sido detectados en efluentes líquidos, ríos y suelos.

Según Gemini et al. (2008), los nitrofenoles son utilizados como intermediarios en la producción de fármacos, colorantes, plaguicidas, conservantes de la madera y explosivos. Concretamente, el 2,4-dinitrofenol es el nitrofenol comercialmente más importante y es ampliamente utilizado en la industria. Estos compuestos son altamente tóxicos para el ser humano y mamíferos dado que son sustancias que pueden llevar a la formación de metahemoglobina y son potentes desacoplantes de la fosforilación oxidativa.

El 2,4-dinitrofenol (2,4-DNP) es un compuesto persistente en el ambiente considerado contaminante prioritario por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA), que recomienda un nivel guía en aguas naturales menor de 10 ng/L. En Argentina el 2,4-DNP se encuentra en aguas residuales industriales, hospitalarias, agrícolas y cloacales que son vertidas a los cursos de agua sin tratamiento previo o escasamente tratadas, provocando serios impactos ambientales (Murillo, 2011). Las propiedades físico-químicas y estructura del compuesto de muestran en la Tabla 7.

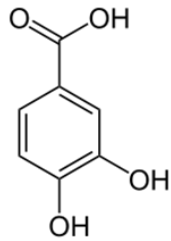
Tabla 7. Propiedades físico-químicas del 2,4-dinitrofenol.

Nombre	2,4-dinitrofenol
Nombre IUPAC	2,4-dinitrofenol
Peso molecular	184,106 g/mol
Punto de fusión	108 °C
Fórmula	C ₆ H ₄ N ₂ O ₅
Solubilidad	0,6 g/L
Densidad	1,68 g/cm ³
Estructura	

Ácido protocatecuico

El ácido protocatecuico (PCA) es un componente altamente distribuido en especies vegetales y en la alimentación humana. Está presente en el arroz, cebolla, y frutas como la uva, grosellas y nueces. El PCA despierta mucho interés, sobre todo en la industria farmacéutica y biotecnológica, debido a la multitud de propiedades descubiertas en estudios preliminares. Ha sido observada su acción antioxidante, antibacteriana, anti-úlceras, anti-diabética, anti-edad, anti-fibrosis, anti-viral, anti-inflamatoria, analgésica, anti-esclerótica, hepatoprotectiva y neurológica. Actualmente, hay numerosas líneas de investigación abiertas para intentar discernir cuales de estas actividades podrían trasladarse para el tratamiento de enfermedades humanas. Químicamente es un compuesto fenólico considerado un metabolito secundario que se obtiene de la fenilalanina por la vía del ácido siquímico. En la Tabla 8 se listan las propiedades físico-químicas y estructura química del compuesto.

Tabla 8. Propiedades físico-químicas del ácido protocatecuico.

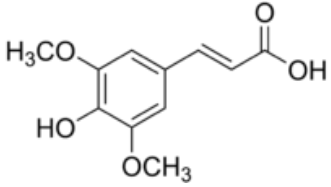
Nombre	Ácido protocatecuico
Nombre IUPAC	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico
Peso molecular	154,12 g/mol
Punto de fusión	202-204 °C
Fórmula	C ₇ H ₆ O ₄
Solubilidad	Poco soluble en agua 20 g/L (20°C)
Densidad	1,68 g/cm ³
Estructura	

Tiene la apariencia de un sólido cristalino gris claro en forma de polvo con una temperatura de ebullición de 410 °C. Desprende un olor ligeramente fenólico y es escasamente soluble en agua (1:50), soluble en alcohol. También se ha demostrado su actividad quelante de Fe⁺² y Cu⁺². El PCA es generalmente estable pero incompatible con agentes oxidantes fuertes y fuertes bases. Es irritante de pulmones, ojos y piel.

Ácido sinápico

Esta dentro de los derivados del ácido cinámico. Se encuentran en frutas, bayas, setas, canela, clavo y productos lácteos fermentados. En la Tabla 9 se listan sus propiedades físico-químicas así como su estructura química.

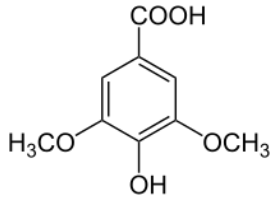
Tabla 9. Propiedades físico-químicas del ácido sinápico.

Nombre	Ácido sinápico
Nombre IUPAC	Ácido 3-methoxy-4-hidroxibenzaldehido
Peso molecular	224,20 g/mol
Punto de fusión	202 °C
Fórmula	C ₁₁ H ₁₂ O ₅
Estructura	

Ácido siríngico

Se encuadra dentro de los derivados del ácido benzoico. Al igual que el ácido sinápico se encuentra en la mayoría de las frutas, especialmente en las bayas. Son usados como conservantes en los productos alimenticios ácidos ya que actúan contra levaduras y bacterias. En la Tabla 10 se listan sus propiedades físico-químicas así como su estructura química.

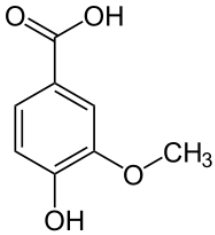
Tabla 10. Propiedades físico-químicas del ácido siríngico.

Nombre	Ácido siríngico
Nombre IUPAC	ácido (4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)metanóico
Peso molecular	198,17 g/mol
Fórmula	$C_9H_{10}O_5$
Estructura	

Ácido vanílico

Es un derivado, al igual que el ácido siríngico del ácido benzoico. Se puede obtener a partir del ácido ferúlico. Es un producto muy valioso, ya que se usa como material iniciador para la síntesis química de compuestos aromáticos oxigenados, como la vainillina (3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído), una de las moléculas más importantes en la industria alimentaria utilizada como saborizante. En la Tabla 11 se listan sus propiedades físico-químicas así como su estructura química.

Tabla 11. Propiedades físico-químicas del ácido vanílico.

Nombre	Ácido vanílico
Nombre IUPAC	Ácido 4-Hidroxi-3-metoxibenzoico
Peso molecular	168,14 g/mol
Punto de fusión	210–213 °C
Fórmula	$C_8H_8O_4$
Estructura	

OBJETIVOS

Muchos autores han propuesto sistemas de tratamiento para procesar las aguas de corcheras, incluyendo métodos físicos y químicos. Los métodos físicos originan efluentes muy concentrados, alcanzando el medio sin que los compuestos potencialmente peligrosos sean eliminados. Debido a la complejidad del afluente, el agua residual originada en el proceso posee una baja biodegradabilidad, por lo que los procesos de oxidación avanzada se han mostrado como potenciales tratamientos para este tipo de aguas residuales (Vilar et al., 2009).

Uno de los aspectos a tener en cuenta cuando se usan procesos de oxidación avanzada para la descontaminación de las aguas es que puede dar lugar a productos intermedios con actividades tóxicas diferentes a los productos de origen. Por ello se hace necesario realizar evaluaciones de la toxicidad lo cual se lleva a cabo principalmente mediante bioensayos. Dado, además, que las aguas pueden contener compuestos con actividad disruptiva endocrina, en este Trabajo Fin de Grado nos hemos decantado a la utilización de bioensayos específicos (con levaduras recombinantes) para determinar dicha actividad.

En este sentido, el principal objetivo del trabajo es la determinación de la disrupción endocrina de muestras de agua tratadas mediante Foto-Fenton y de los compuestos que la forman.

Dado que en el laboratorio se disponía de la cepa de levadura modificada para la detección de compuestos con actividad *dioxin-like*, se decidió incluir la medida de dicha actividad sobre las mismas muestras.

Los objetivos propuestos para el presente trabajo fueron:

1. Determinar la actividad estrogénica mediante ensayo con levadura recombinante (RYA-ER) en muestras de agua complejas, contaminadas con ocho compuestos químicos derivados de la industria del corcho y sometidas durante tiempos diferentes a un proceso foto-Fenton.
2. Determinar la actividad estrogénica de los ocho compuestos químicos mediante ensayo con levadura recombinante (RYA-ER).
3. Determinar la actividad *dioxin-like* mediante ensayo con levadura recombinante (RYA-AhR) en muestras de agua complejas, contaminadas con los ocho compuestos y sometidas durante tiempos diferentes a un proceso foto-Fenton.
4. Determinar la actividad *dioxin-like* de los ocho compuestos químicos mediante ensayo con levadura recombinante (RYA-AhR).
5. Evaluar desde el punto de vista toxicológico la eficacia del tratamiento foto-Fenton para la depuración de las aguas complejas.

MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación se describen los materiales utilizados, así como la metodología seguida para la realización del presente trabajo de investigación. Todos los trabajos de experimentación que forman parte del presente estudio se han realizado en el laboratorio de Ecotoxicología del Departamento de Biotecnología de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Natural (ETSIAMN) de la Universidad Politécnica de Valencia.

3.1. Muestras

Los ensayos de toxicidad se han llevado a cabo sobre dos tipos de muestras:

- 1) Muestras de agua procedentes del Grupo de Procesos de oxidación avanzada (POA) del Departamento de Ingeniería Textil y Papelera de la Escuela Politécnica Superior de Alcoy (EPSA), consistentes en una disolución acuosa de ocho compuestos químicos, contaminantes habituales de la industria corchera: ácido gálico, ácido tánico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido sinápico, ácido protocatecuico y 2,4- dinitrofenol, a una concentración de 1 mg/L. La muestra de agua ha sido tratada mediante un proceso de oxidación avanzada, concretamente foto-Fenton: irradiadas durante 210 minutos con un simulador solar tipo ABET 2000 en un vaso Pyrex de 250 mL de volumen. Se tomaron muestras a diferentes tiempos de tratamiento: 0, 5, 10, 20, 60, 120 y 180 minutos.
- 2) Disoluciones acuosas de cada uno de los ocho contaminantes anteriores cuyas concentraciones de partida han sido calculadas a partir de los valores NOEC resultantes de ensayos de toxicidad sobre algas (datos proporcionados por el equipo del laboratorio de Ecotoxicología). Todos los compuestos fueron suministrados por Sigma-Aldrich.

3.2. Preparación y extracción de las muestras

Las muestras de agua fueron concentradas en un sistema de vacío (Extra Vac 12, Scharlab) (Figura 3) mediante cartuchos SPE (Solid Phase Extraction) (ExtraBond EBH 500 mg, 6 mL, Scharlab). Los cartuchos son previamente acondicionados con 10 mL de Hexano, seguido de 10 mL de diclorometano, 10 mL de metanol y 15 mL de agua MiliQ a un flujo de 5 mL/min. Todos los disolventes utilizados son grado HPLC (J.T Baker).

Un volumen de 500 mL de muestra de agua se filtra a través de los cartuchos a un flujo aproximado de 10 mL/min. El cartucho es finalmente lavado con 5 mL de agua MiliQ y se seca al vacío durante 30 minutos. Los compuestos son eluidos del cartucho por el paso de 10 mL de diclorometano:hexano (1:1), seguido de 10 mL de diclorometano:acetona (1:1). El disolvente es evaporado mediante rotavapor (SELECTA). El extracto seco obtenido se reconstituye en un volumen final de 500 µL de metanol. Las muestras se mantienen a -4°C hasta su ensayo.



Figura 3. Sistema de extracción a vacío Extra Vac 12 (Scharlau) para cartuchos de SPE.

3.3. Ensayos de toxicidad: Recombinant Yeast Assay (RYA)

Los ensayos de toxicidad, realizados sobre las muestras tratadas y los contaminantes puros, consisten en valorar la actividad estrogénica y la actividad *dioxin-like*. A grandes rasgos la técnica es la misma aunque existen diferencias que serán citadas en las secciones siguientes.

3.3.1. Organismos de ensayo

Los organismos utilizados en los ensayos de toxicidad RYA pertenecen a la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Para el ensayo de estrogenicidad se utiliza la cepa BY4741 (en adelante cepa ER) y la cepa YCM1 de la misma levadura para determinar la actividad *dioxin-like* (en adelante cepa AhR). Ambas cepas fueron cedidas por el doctor Benjamín Piña del Instituto de Biología Molecular de Barcelona-CSIC.

3.3.2. Preparación medios de cultivo

Suplementos

Las disoluciones necesarias para el cultivo de la cepa ER son glucosa (Sigma-Aldrich) al 40%, histidina (Sigma-Aldrich, riqueza $\geq 98\%$) al 1%, metionina (Sigma-Aldrich, riqueza $\geq 98\%$) al 1%. Todas ellas se esterilizan en autoclave (121 °C, 15 min) y se conservan a 5-6 °C. La disolución de histidina se cubre con papel de aluminio para protegerla de la luz.

Para la levadura AhR se preparan las siguientes disoluciones: galactosa (Sigma-Aldrich) al 20%, adenina (Sigma-Aldrich) al 0,5 %, uracilo (Sigma-Aldrich) al 0,5% y CAS AA (aminoácidos de caseína, Difco) al 10%. Adenina y CAS AA son esterilizados por filtración (Millex, 0,2 μm); uracilo se esteriliza en autoclave (121 °C, 15 min).

Medio enriquecido YPD

Se disuelven 50 g de YPD (Yeast Peptone Dextrose, Difco) en 1L de agua MiliQ. Se reparte en tubos de ensayo a razón de 1-2 mL y esterilizándose en autoclave (121 °C, 15 minutos).

Para preparar YPD sólido se añaden 20 g/L de Bacto Agar (Difco) antes de la esterilización. A continuación, una vez atemperado se reparte en placas Petri.

Medio selectivo SD (Synthetic Dextrose)

Se pesan 1,7 g de YNBAA/AS (Yeast Nitrogen Base) (Difco) y 5 g de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Panreac) y se disuelven en un litro de agua MilliQ. El medio así preparado se esteriliza en autoclave (120 °C, 20 min). Si no se va a usar inmediatamente puede ser conservado a temperatura de refrigeración.

Para el cultivo de la cepa ER se añade en condiciones de asepsia 20 g/L de glucosa, 0,01 g/L de histidina y 0,01 g/L de metionina. Para el cultivo de la cepa AhR se añade en condiciones de asepsia 10 g/L de galactosa, 0,01 g/L de adenina, 0,04 g/L de uracilo y 1 g/L de CAS AA.

Para SD sólido se añaden, antes de su esterilización y de la adición de los suplementos, 20 g/L de Bacto Agar (Difco). A continuación, una vez atemperado se reparte en placas Petri.

3.3.3. Reactivos

Tampón Z

Las concentraciones finales de los reactivos para el tampón Z son: 60 mM de Na_2HPO_4 (Scharlau), 40 mM de NaH_2PO_4 (Scharlau), 10 mM de KCl (Scharlau), 1mM de MgSO_4 (Panreac).

En un matraz de 500 mL se añaden 300 mL de Na_2HPO_4 0,1 M, 20 mL de NaH_2PO_4 1M, 5 mL de KCl 1M, 5 mL de MgSO_4 y se completa con agua MiliQ (170 mL) hasta conseguir un volumen de 500 mL; el pH se ajusta a 7.

Sustrato MU-GAL

El MU-Gal se prepara con 100 mL Tampón Z, 1 mL de tritón x-100 (Fisher Chemical) al 10%, 1 mL de SDS (Fisher Chemical) 10%, 21 mg de MU-gal (4-metilumbeliferil b-d galactosidasa) (Sigma-Aldrich) y 70 μl de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich).

Se pesa la cantidad indicada de MU-Gal y se disuelve en el Tampón Z junto a los otros componentes excepto el β -mercaptoetanol; se deja en agitación toda la noche a una temperatura de 35-38°C, protegida de la luz. Al día siguiente, se reparte en tubos Falcon a razón de 15 mL y se añade la cantidad adecuada de β -mercaptoetanol. Los tubos se protegen de la luz y se conservan a -20 °C.

Patrones

Para los ensayos de actividad estrogénica se utiliza como patrón la hormona 17 β -estradiol (E2). Se requiere una disolución 10 μM . Para ello, se pesa 1 mg de E2 (Sigma-Aldrich) y se disuelve en 1,5 mL de metanol (grado HPLC). Esta disolución se diluye a 100 μM y a partir de esta última se prepara la de 10 μM , diluyendo de nuevo.

Para los ensayos de actividad *dioxin-like* se utiliza como patrón β -naftoflavona (BNF). Se requiere una disolución 100 μM . Para ello, se pesa 1 mg de BNF (Sigma-Aldrich) y se disuelve en 1,5 mL de metanol. De esta disolución se diluye a 100 μM .

3.3.4. Cultivo de la levadura

A partir de criocultivos (-80 °C) se siembran placas con medio YPD y se incuban a 30 °C durante 24-48 horas. Estos cultivos son considerados cultivos stock.

Para iniciar el ensayo se siembran placas con medio selectivo sólido (SD-ER y SD-AhR, según levadura y ensayo) a partir de los cultivos stock, las cuales se incuban a 30 °C durante 24 horas.

A continuación se toma una colonia de cada placa y se inocula en un tubo de ensayo con medio YPD líquido. El cultivo es incubado a 30 °C en agitación suave durante 17 horas (cultivo de una noche). Transcurrido dicho tiempo se toma el volumen adecuado del cultivo en YPD para inocular una matraz Erlenmeyer con 50 mL de medio selectivo (SD-ER y/o SD-AhR), de manera que tras la incubación (30 °C, agitación orbital a 150 rpm, 17 h) se obtenga una DO entre 0,08 y 0,15, correspondiente a la fase exponencial de crecimiento; el cultivo está listo para hacer el ensayo. Una DO, medida a 600 nm, de 0,1 equivale a 2×10^6 células/mL. Si la DO se encuentra por debajo de estos valores se debe esperar a que su valor aumente (las levaduras se duplican cada hora y media). Si por el contrario, se obtienen valores superiores a 0,15 se realizan diluciones del cultivo.

3.3.5. Procedimiento de ensayo

Llenado de las placas multipocillo

El ensayo se lleva a cabo en placa multipocillo de polipropileno (NUNCTM, Thermo Scientific). Las distintas columnas contienen:

- columna 1: cultivo + extracto de la muestra,
- columna 2-9: cultivo (5% metanol) + diluciones del extracto de la muestra,
- columna 10: Control de toxicidad: cultivo + patrón + extracto de la muestra,
- columna 11: Control positivo: cultivo + patrón,
- columna 12: Control negativo: cultivo (5% metanol).

Para ello se preparan las siguientes soluciones:

Solución A: cultivo + metanol al 5%

Solución B: 1 mL de cultivo + 1 µL de E2 ó 10 µL de BNF.

La placa se carga del siguiente modo:

1. cargar la columna 1 con 190 µL de cultivo en cada pocillo y 10 µL del extracto de la muestra, de esta manera se obtiene la dilución 1/20 de la muestra;
2. cargar las columnas 2-9 y 12 (control negativo) con 50 µL de la solución A;
3. cargar las columnas 10 (control toxicidad) y 11 (control positivo) con 50 µL de solución B;
4. mezclar mediante pipeteo el contenido de la columna 1 y pasar 50 µL a la columna 2 y otros 50 µL a la columna 10 (control de toxicidad);

5. pasar 50 μL de la columna 2 a la columna 3, mezclar mediante pipeteo y repetir esta operación hasta la columna 9; de esta manera la muestra es diluida en cada columna por una factor de 2, (diluciones ensayadas van desde 1/20 hasta 1/5120);
6. con el fin de que el volumen de todos los pocillos sea el mismo se descartan 50 μL de la columna 1, columna 9 y columna 10.

El objetivo del control de toxicidad es demostrar, en el caso de que una muestra no dé respuesta, si la falta de señal se debe a la no presencia de ligando, y por tanto, de no actividad en la muestra dada. Si la muestra es tóxica para las células, la señal de estos pocillos será menor que el control positivo. La organización de la placa se muestra en la Figura 4.

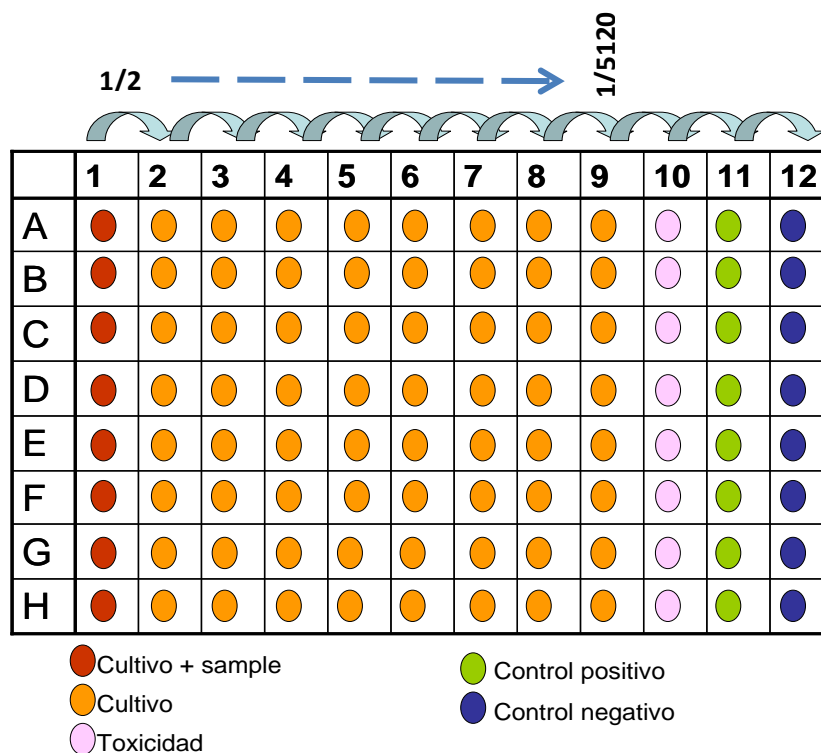


Figura 4. Disposición de las distintas diluciones de la muestra analizadas y controles en la microplaca.

Incubación de las placas

Una vez cargadas las placas se incuban 6 horas a 30 °C en agitación orbital a 120 rpm.

Pasado este período de tiempo se añade YPER (Yeast Protein Extraction Reagent) (Thermo Scientific), un tampón de lisis para levaduras basado en detergentes que permeabilizan la pared de la levadura y permite extraer las proteínas solubles.

Se añaden 50 μL de YPER a todos los pocillos. Si la lectura se lleva a cabo el mismo día de la preparación de la placa, éstas se incuban a 30 °C durante 30 min. Si por el contrario, no se pueden

leer el mismo día, se congelan inmediatamente. Una vez descongeladas se deben incubar a 30 °C durante 60 min.

Adición del sustrato de la reacción enzimática: MU-Gal

Se añaden 75 μL de MU-Gal a cada pocillo, previamente descongelado a temperatura ambiente. En este paso hay que tener en cuenta la velocidad de adición de este sustrato ya que la reacción enzimática puede saturarse si se tarda mucho en rellenar la placa.

Una vez añadido el sustrato, se deja reposar la placa durante 5 min con el fin de que los restos celulares se depositen.

Lectura de la placa

La lectura se lleva a cabo midiendo la fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 360 nm y de emisión de 460 nm, cada 42 segundos durante 20 minutos. La fluorescencia se ha medido en un lector de microplacas multifuncional TECAN Infinite M200.

3.3.6. Análisis de datos: Calculo de equivalentes

La cantidad de fluorescencia que se produce a lo largo del tiempo corresponde a la actividad del enzima. Dicha actividad es proporcional a la cantidad de enzima que a su vez es proporcional a la cantidad de complejo L-R (ligando-receptor) que se forma. En la Figura 5 se muestra un esquema orientativo del proceso.

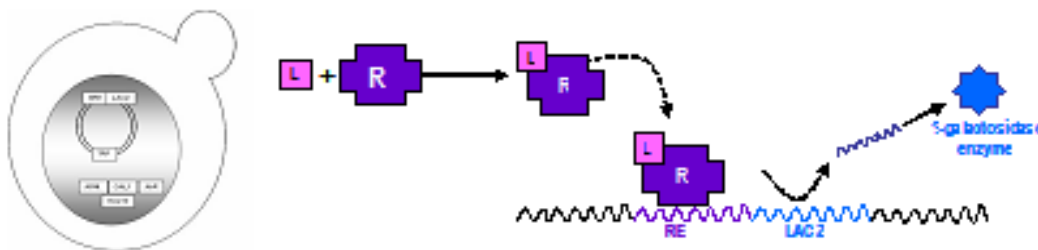


Figura 5. Síntesis de β -galactosidasa consecuencia de la unión del ligando al receptor ER.

La actividad de la β -galactosidasa se calcula a partir de la pendiente de las rectas, obtenidas por métodos de regresión lineal estándar, de valores de fluorescencia frente a tiempo. Para establecer esta relación, se asume lo siguiente:

1. se considera que la concentración de receptor libre es mucho menor que la concentración de ligando, es decir, siempre que haya ligando se formará el complejo LR;
2. todo el LR que se forma se une al DNA activando la transcripción del gen LacZ;
3. la cantidad de producto fluorescente obtenido en la reacción enzimática es proporcional a la cantidad de enzima producido por la acción de LR. Es imprescindible que la

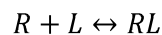
concentración de sustrato sea mucho mayor que la constante de disociación, K_d , para que la reacción no esté limitada por el sustrato.

La actividad de la β -galactosidasa se escala usando la actividad mostrada por el control positivo y el control negativo para obtener todos los valores entre 0 (sin actividad) y 1 (actividad máxima), obteniéndose una Actividad relativa (Arel) según la ecuación (1').

$$A_{rel} = \frac{A - A_{min}}{A_{max} - A_{min}} \quad (1')$$

A partir de la curva dosis-respuesta donde se representa la Arel frente a las distintas diluciones de la muestra ensayadas, se obtiene la CE50 correspondiente a aquella dilución con la que se obtiene una Arel del 50% de la Arel máxima.

Considerando R el receptor, L el compuesto o compuestos con carácter disruptor o *dioxin-like*, y RL el complejo entre ambos, la constante de disociación, K_d , se determina según la ecuación (2'):



$$R_t = R + [RL]$$

$$K_d = \frac{L \cdot R}{RL} \quad (2')$$

La respuesta del sistema, Arel, es proporcional a la cantidad de [RL] que se forma respecto de R_t .

$$A_{rel} = \frac{[RL]}{R_t}$$

$$R_t = R + RL$$

$$A_{rel} = \frac{RL}{R + RL} = \frac{RL}{R \left(\frac{RL}{R} + \frac{RL}{RL} \right)} = \frac{1}{1 + \frac{R}{RL}} = \frac{1}{1 + K_d \cdot L} \quad (3')$$

De esta forma [ecuación (3)] se relaciona la Arel con la constante de disociación, K_d .

Con estas fórmulas podríamos calcular la K_d a partir de la curva dosis-respuesta [ecuación (4')]:

$$K_d = \frac{1}{A_{rel}} - 1 \times L \quad (4')$$

Si la mitad del receptor disponible está formando el complejo RL, la respuesta obtenida por el sistema debería ser la mitad de la respuesta máxima:

$$A_{rel} = \frac{[RL]}{R_t} = 0,5$$

$$0,5 = \frac{1}{1 + \frac{K_d}{L}} \rightarrow K_d = L$$

La concentración de ligando que produce la mitad de la respuesta máxima corresponde a la CE_{50} , es decir, concentración del Ligando (L) que produce una respuesta la mitad de la respuesta máxima, y ese es el valor de K_d [ecuación (5')].

$$K_d = CE_{50} \quad (5')$$

Al desconocer la concentración de ligando en las muestras, y al trabajar con factores de dilución, se calcula una K_d aparente (K_d app), según la ecuación (6'):

$$K_d = L_{CE_{50}}$$

$$K_{dapp} = \frac{1}{L_{CE_{50}}} = \frac{1}{K_d}$$

$$L = \frac{1}{\text{factor de dilución}} = \frac{1}{f_d}$$

$$K_{dapp} = \frac{1}{f_d \times 1_{A_{rel}^{-1}}} \quad (6')$$

Dado que en la mayoría de las muestras se desconoce el o los compuestos con actividad estrogénica o, en su caso, *dioxin-like* que contiene, y dada la necesidad de comparar la actividad hallada en las diferentes muestras analizadas entre sí y con las ensayadas en otros trabajos, los resultados se expresan en equivalentes (EEQ) de E2 para el caso de actividad estrogénica y de equivalentes de BNF para actividad *dioxin-like*. Los equivalentes representan la concentración de ligando de referencia con la que se obtendría la misma respuesta que la que presenta la muestra analizada.

Estos equivalentes se calculan teniendo en cuenta la CE_{50} de los patrones utilizados (72,7308 ng/L para E2, y 12.702,4 ng/L para BNF) y la dilución en la que se obtiene la CE_{50} de la muestra [ecuación (7')].

$$EEQ = CE_{50 \text{ patrón}} \times K_{dapp} \quad (7')$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Proceso de tratamiento de resultados

A continuación se muestra un ejemplo representativo del procedimiento de obtención y tratamiento de resultados.

En cada placa multipocillo se ensayan dos muestras con cuatro réplicas (filas) cada una. A partir de la medida de la fluorescencia de las muestras y sus diluciones se obtienen las pendientes de las rectas de regresión que relacionan la señal medida frente al tiempo. En la Figura 6 se muestra el gráfico correspondiente a dichas rectas. Cada recta corresponde a las lecturas de fluorescencia medidas en un pocillo.

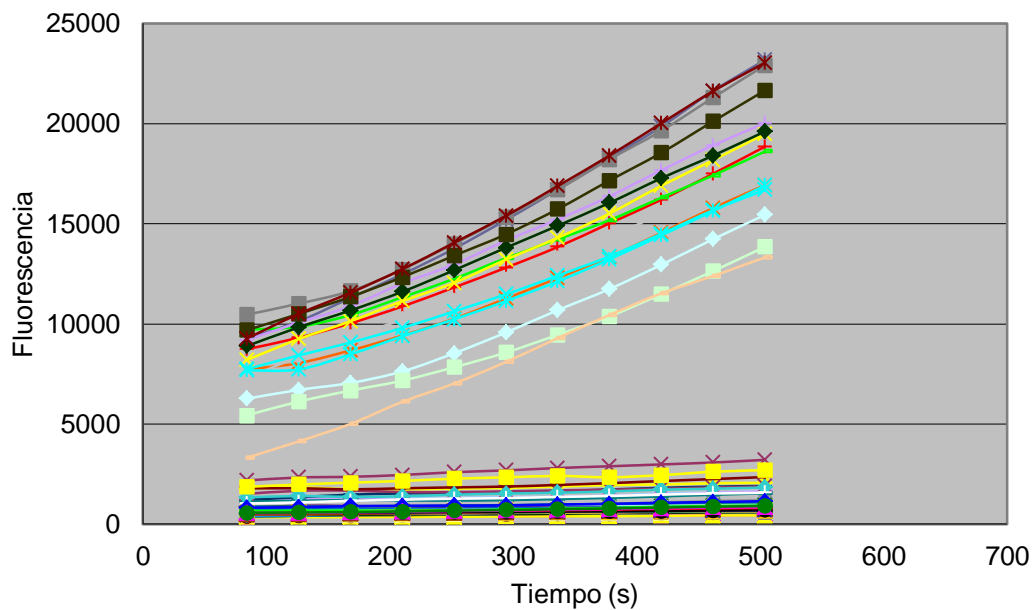


Figura 6. Rectas de regresión: Fluorescencia/Tiempo.

Los valores de las pendientes expresan directamente la actividad β -galactosidasa, a partir de los cuales se obtiene la Actividad relativa (A_{rel}) según la ecuación 1'. En la Figura 7 se representa la Actividad relativa de una muestra con sus cuatro réplicas.

Tal y como se menciona en el apartado 3.3.6. de Material y Métodos, a partir de la Actividad relativa se obtienen los equivalentes (EEQ) que representan la concentración de ligando de referencia (E2 o BNF) con la que se obtendría la misma respuesta que la que presenta la muestra analizada. Los valores de CE_{50} son 72,73 ng/L y 12702,4 ng/L para E2 y BNF, respectivamente.

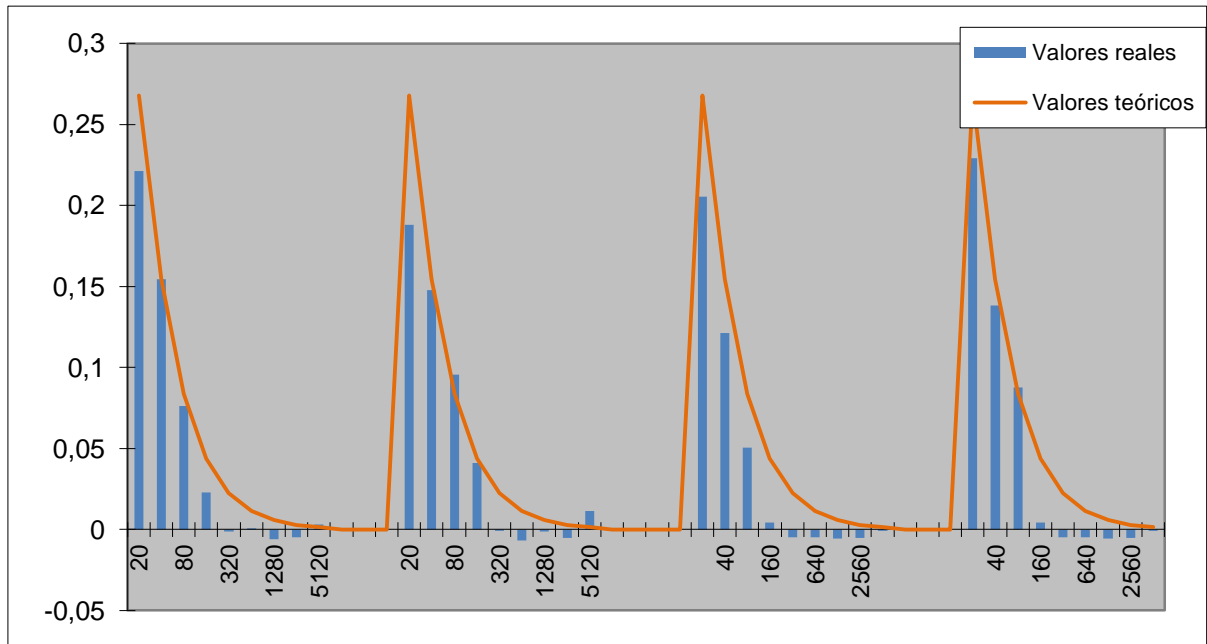


Figura 7. Actividad relativa de una muestra representativa.

4.2. Valoración de la actividad de disrupción endocrina - ensayo RYA-ER

4.2.1. Actividad de disrupción endocrina en las muestras de aguas complejas, sometidas a tratamiento

En la Tabla 12 se listan los EEQ de E2 obtenidos tras el ensayo de las muestras de agua complejas sometidas a tratamiento.

Tabla 12. Actividad estrogénica (EEQ de E2) de las muestras de agua.

Muestra	EEQ de E2 (ng/L)	Toxicidad (%)**
M-0 min	-*	99
M-5 min	7,0	91,1
M-10 min	1,2	73
M-20 min	-*	89
M-60 min	0,6	78
M-120 min	0,2	68
M-180 min	0,5	45

*: Actividad no medible;

** : Reducción (%) de la viabilidad de las levaduras respecto al control positivo

La actividad estrogénica máxima se ha detectado en la muestra tratada durante 5 minutos (M-5 min) siendo además muy tóxica con niveles de reducción de la viabilidad de las levaduras superior al 90%. En general, se observa una disminución de la actividad endocrina y de la toxicidad a lo largo del tratamiento. En la muestra M-180 minutos se observa un ligero aumento

de la actividad, no obstante, esto podría deberse a la variabilidad propia del ensayo, el cual se realiza a nivel molecular.

En las muestras M-0 min y M-20 min no pudo medirse la actividad estrogénica debido a la elevada toxicidad de las muestras, inhibiendo el crecimiento de las levaduras. Si se compara los resultados de toxicidad con los de degradación (datos cedidos por el grupo POA de Alcoy) mostrados en la Figura 8 y en la Tabla 13, la toxicidad de M-20 min puede deberse a la presencia de 2,4-dinitrofenol o a la aparición de subproductos tóxicos. Varios autores (Doménech et al., 2001; Munter, 2001; Benítez et al., 2003) plantean esta última posibilidad como uno de los principales argumentos para defender la necesidad de un método de evaluación rápido de los intermediarios de reacción en los procesos de oxidación avanzada. En cuanto a la muestra inicial (M-0 min) la elevada toxicidad puede estar relacionada con un efecto sinérgico de los compuestos que la forman.

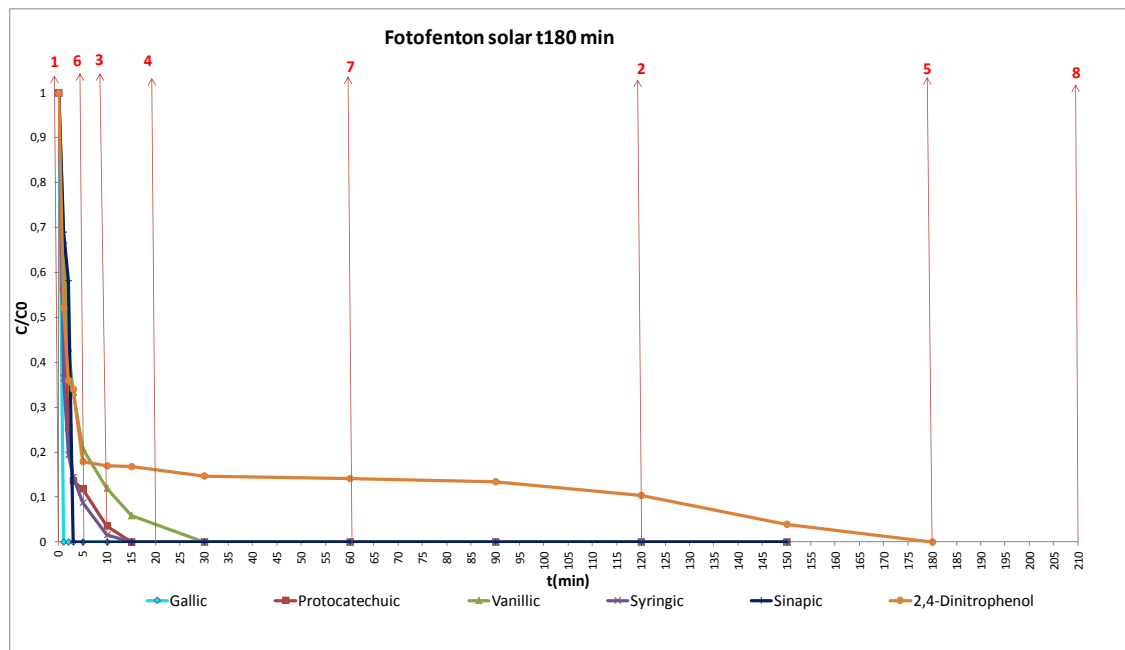


Figura 8. Degradación de los compuestos químicos que forman la muestra de agua sometida a foto-Fenton a lo largo del tiempo de tratamiento.

Tabla 13. Carbono Orgánico Total de las muestras de agua tratadas.

Muestra	COT (mg/L)	
	Tiempo inicial	% eliminado a tiempo final
M-0 min	4,8	
M-5 min	4,9	26
M-10 min	4,8	39
M-20 min	4,7	45
M-60 min	4,5	50
M-120 min	4,8	60
M-180 min	4,5	67

Entre los estudios utilizando el ensayo RYA con aguas de río y procedentes de plantas de tratamiento de aguas residuales en distintos países se encuentra el realizado en Alemania y Portugal. En Alemania, se detectaron valores de $65,96 \pm 10,40$ ng/L y $34,10 \pm 7,18$ ng/L en efluentes de dos plantas de tratamiento de aguas residuales cercanas al río Rin. Además se determinaron los valores de EEQ en cuatro puntos distintos de este río obteniéndose los siguientes valores: $11,97 \pm 0,70$ ng/L, $12,08 \pm 0,50$ ng/L, $11,81 \pm 0,70$ ng/L, $19,42 \pm 2,80$ ng/L (Pawlowski et al., 2003). También se han hecho análisis de detección de la actividad estrogénica en Portugal (Quirós et al., 2005), en el que se tomaron muestras de 10 ríos del país durante 20 meses seguidos. Los valores de EEQ variaron entre meses, por ejemplo en Ponte do Sacavém se llegó a medir valores máximos de $1,71 \pm 0,62$ ng/L y mínimos de $0,06 \pm 0,01$ ng/L.

En otro estudio de presencia de 17β -estradiol en aguas de ríos de diferentes países (Auriol et al., 2006) (Tabla 14) los valores variaron desde menos de 0,3 ng/L en ríos de Inglaterra hasta los 30,4 ng/L hallados en España.

Tabla 14. Concentraciones de 17β -Estradiol detectadas en muestras de agua.

Lugar de la muestra	17β -Estradiol (ng/L)
Paris, Francia	11,2-17,4
Inglaterra	< 0,3
Alemania	22,7
Italia	12
Roma, Italia	9,7
Roma, Italia	11
Barcelona, España	<5-30,4
Japón	5

Fuente: Auriol et al.(2006).

Como se puede observar, los valores de EEQ procedentes de efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales suelen ser mayores que los encontrados en ríos. En nuestro estudio, el valor obtenido de EEQ es comparable al registrado en ríos.

Li et al. (2011) realizan un estudio sobre la concentración de equivalentes de E2 en influentes y efluentes de una planta de tratamiento ubicada en China. Los resultados muestran que el agua entraba con una concentración de equivalentes de 11,7 ng/L y salía de la planta con unas concentraciones entre 2 y 3,2 ng/L.

Teniendo en cuenta la elevada toxicidad de alguna de las muestras ensayadas en el presente trabajo de investigación, y que ello reduce los EEQ, calculados a partir de una señal disminuida, el tratamiento al que se han sometido las muestras resulta en un buen método para la detoxificación de las muestras.

4.2.2. Actividad de disrupción endocrina de los compuestos derivados de la industria del corcho

Para el ensayo de la actividad estrogénica se han llevado a cabo disoluciones acuosas de cada compuesto cuyas concentraciones iniciales se han calculado a partir del valor NOEC (concentración sin efecto) obtenido en un ensayo de toxicidad previo realizado con el alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. El valor NOEC se divide por un factor de 100 dado que la actividad estrogénica se detecta incluso a niveles bajos. Los valores NOEC de cada compuesto y las concentraciones iniciales de ensayo se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Valores NOEC* y concentraciones iniciales de los compuestos para el ensayo.

Compuesto	Valor NOEC (mg/L)*	Concentración inicial (µg/L)
Ácido tánico	4,2	42
Ácido gálico	20,8	200
Ácido elágico	4,2	42
2,4-Dinitrofenol	0,4	4
Ácido protocatecuico	1,6	20
Ácido sinápico	20,8	200
Ácido siríngico	62,5	600
Ácido vanílico	15,6	200

*: Datos obtenidos de ensayos con *P. subcapitata*

Una vez realizado los ensayos, se decidió no tener en cuenta los valores de actividades relativas correspondientes a las cinco diluciones más bajas (factor de dilución 320/640 hasta 5120) ya que se observó mucha variabilidad en los resultados por la proximidad de las concentraciones reales ensayadas al límite de detección de la técnica (0,01 ng/L) (Céspedes et al., 2004).

En la Tabla 16 se muestran los valores de equivalentes calculados para los productos químicos puros.

Tabla 16. Actividad estrogénica (EEQ de E2) de los compuestos químicos.

Muestra	EEQ de E2 (ng/L)
Ácido tánico	1,2
Ácido gálico	0,9
Ácido elágico	-
2,4-Dinitrofenol	3,2
Ácido protocatecuico	0,6
Ácido sinápico	0,9
Ácido siríngico	0,8
Ácido vanílico	1,4

Los valores de EEQ de los compuestos varían desde 0,6 ng/L del ácido protocatecuico al 3,2 ng/L del 2,4-dinitrofenol. Destaca la actividad estrogénica del 2,4-dinitrofenol ya que además se trata de una sustancia tóxica para las levaduras, lo cual redujo la viabilidad de las mismas. Este compuesto ha sido anteriormente clasificado como disruptor endocrino (Bevan et al., 2012).

En general los compuestos estudiados muestran actividad endocrina. No obstante, se ha de tener en cuenta que las concentraciones de partida de las disoluciones son mucho más altas a las concentraciones de estos contaminantes que podrían encontrarse en el medio.

4.3. Valoración de la actividad *dioxin-like* - ensayo RYA-AhR

4.3.1. Actividad *dioxin-like* en las muestras de aguas complejas, sometidas a tratamiento

Como ya se ha mencionado en el capítulo de objetivos, se decidió medir la actividad *dioxin-like* de las muestras con el fin de aumentar la información toxicológica de las mismas.

En la Tabla 17 se muestran los EEQ de BNF obtenidos de las muestras de agua complejas sometidas a tratamiento.

Tabla 17. Actividad *dioxin-like* de las muestras de agua tratadas.

Muestra	EEQ de BNF (ng/L)
M-0 min	87,7
M-5 min	66,6
M-10 min	23,8
M-20 min	103
M-60 min	66,8
M-120 min	81,6
M-180 min	69,9

Los resultados muestran que se ha detectado mayor actividad *dioxin-like* en las muestras con tiempos de tratamiento intermedios (M-20 min), para, en general, disminuir a medida que se alarga el tiempo de tratamiento. La actividad medida para la muestra inicial (M-0min) y para M-5 min se ha visto disminuida por la toxicidad mostrada por ambas muestras, lo que redujo la viabilidad de las levaduras.

Si comparamos los EEQ *dioxin-like* con los EEQ de actividad estrogénica, observamos que las muestras poseen mayor actividad *dioxin-like*, dado que existe una mayor número de compuestos químicos que poseen esta actividad (White et al., 2008). Además, muchos compuestos *dioxin-like* son disruptores endocrinos.

La mayoría de los estudios sobre medición de actividad *dioxin-like* se han realizado sobre muestras de aire, ya que una gran parte de estos compuestos se encuentran en este ambiente, procedentes de procesos de incineración. Entre éstos destacan los hidrocarburos aromáticos

policíclicos (PAHs). Los resultados de equivalentes de BaP (benzo[a]pyreno) medidos en aire obtenidos por Olivares et al. (2011), correspondientes a muestras del Norte de Italia muestran que el orden se encuentra sobre los 1000 y 10.000 ng/L de BaP. Se ha de tener en cuenta que las concentraciones en aire van a ser superiores que las disueltas en agua debido al origen y las características químicas de este tipo de sustancias.

4.3.2. Actividad *dioxin-like* de los compuestos derivados de la industria del corcho

Para realizar el ensayo de actividad *dioxin-like* de los compuestos se tomaron las disoluciones utilizadas para el ensayo de actividad estrogénica (Tabla 15).

Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 18 expresados como EEQ de BNF. Destaca la elevada actividad registrada para el 2,4-dinitrofenol, la mayor de los ocho compuestos estudiados. El ácido gálico no mostró actividad. Y, por último mencionar que el ácido vanílico mostró una elevada toxicidad, por lo que no se pudo medir la posible actividad *dioxin-like*.

Tabla 18. Actividad *dioxin-like* de los compuestos químicos.

Muestra	EEQ de BNF(ng/L)
Ácido tánico	14,3
Ácido gálico	-*
Ácido elágico	7,7
2,4-Dinitrofenol	142,1
Ácido protocatecuico	1,4
Ácido sinápico	9,7
Ácido siríngico	11,6
Ácido vanílico	-*

*: Actividad no medible

No hemos encontrado en la bibliografía trabajos que hagan referencia a análisis de este tipo de actividad en los compuestos estudiados.

CONCLUSIONES

1. El tratamiento foto-Fenton reduce los niveles de toxicidad endocrina, desde niveles medidos de 7 ng/L en muestras iniciales hasta 0,5 ng/L al final del tratamiento.
2. La reducción de actividad *dioxin-like* observada a lo largo del tratamiento foto-Fenton, no es tan significativa, debido al mayor número y clase de compuestos que registran esta actividad.
3. Durante el proceso se observa un aumento de actividad *dioxin-like* y toxicidad a los 20 minutos de tratamiento. Es necesario llevar una monitorización del proceso para poder evaluar la toxicidad y actividad de los productos intermedios que se forman en la degradación de los contaminantes durante el proceso.
4. Se ha demostrado la eficacia del proceso foto-Fenton, por lo que este sistema es una opción aconsejable a la hora de la elección de tratamientos para aguas contaminadas ya que reducen las actividades tóxicas medidas.
5. Los ensayos de disrupción endocrina muestran que los productos derivados de la industria corchera poseen actividad endocrina y *dioxin-like*, excepto el ácido gálico y el ácido vanílico.
6. El 2,4-dinitrofenol es el compuesto más tóxico, registrando los mayores niveles de actividad estrogénica y *dioxin-like* de los compuestos ensayados. Se comprueba la peligrosidad de dicho compuesto el cual se encuentra en las listas europeas de compuestos estrogénicos.
7. Sobre el resto de compuestos que han mostrado actividad endocrina y/o *dioxin-like* deberían realizarse más estudios que aporten más información sobre las actividades aquí detectadas.
8. Los bioensayos con las levaduras recombinantes son herramientas útiles y novedosas para determinar la eficacia de los tratamientos de detoxificación y el impacto ambiental que pudiera tener un vertido de aguas en el medio ambiente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARSLAN ALATON, I.; TEKSOY, S. (2007). Acid dye bath effluent pretreatment using Fenton's reagent: process optimization, reaction kinetics and effects on acute toxicity. *Dyes and Pigments* 73, 31-39.
- AURIOL, M.; FILALI-MEKNASSI, Y.; TYAGI, R. D.; ADAMS, C. D. & SURAMPALLI, R. Y. (2006). Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge. *Process Biochemistry*, 41(3), 525-539.
- BARROSO, V. & LAMAS, O. (1998). El corcho: un producto con posibilidades en Extremadura. Cámara Oficial de Comercio e Industria de Cáceres. Cáceres.
- BAUMGARTEN, S.; SCHRODER, H. F.; CHARWATH, C.; LANGE, M., BEIER, S.; PINNEKAMP J. (2007). Evaluation of advanced treatment technologies for the elimination of pharmaceutical compounds. *Water Science and Technology* 56 (5), 1-8.
- BECERRIL, J.E. (2009). Contaminantes emergentes en el agua, *Revista Digital Universitaria, UNAM, 10(8)*.
- BELGIORNO, V.; RIZZO, L.; FATTA, D.; DELLA ROCCA, C.; LOFRANO, G.; NIKOLAOU, A. & MERIC, S. (2007). Review on endocrine disrupting-emerging compounds in urban wastewater: occurrence and removal by photocatalysis and ultrasonic irradiation for wastewater reuse. *Desalination*, 215(1-3), 166-176.
- BELTRÁN DE HEREDIA, J.; DOMÍNGUEZ, J.R. & LÓPEZ, R. (2004). Treatment of cork process wastewater successive chemical-physical method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (14), 4501-4507.
- BENÍTEZ, F. J.; ACERO, J. L.; GARCIA, J. & LEAL, A. I. (2003). Purification of cork processing wastewaters by ozone, by activated sludge, and by their two sequential applications. *Water Research*, 37(17), 4081-4090.
- BERNARDO, M.; SANTOS, A.; CANTINHO, P. & MINHALMA, M. (2011). Cork industry wastewater partition by ultra/nanofiltration: a biodegradation and valorisation study. *Water Research*, 45(2), 904-912.
- BEVAN, R.; HARRISON, P.; YOUNGS, L.; WHELAN, M.; GOSLAN, E.; MACADAM, J.; HOLMES, P & PERSICH, T. (2012). A review of latest endocrine disrupting chemicals research implications for drinking water. Ed. Institut of Environmetnal and Health.
- BISTAN, M.; PODGORELEC, M.; LOGAR, RM; TIŠLER T. (2011). Yeast estrogen screen assay as a tool for detecting estrogenic activity of waters. *Food Technology and Biotechnology*, 50(4), 427-434.
- BRIX R.; NOGUEROL T.; PIÑA B.; BALAAM J.; NILSEN A.J.; TOLLEFSEN K.; LEVY W.; SCHRAMM K. & BARCELÓ D. (2010). Evaluation of the suitability of recombinant yeast-based estrogenicity assays as a pre-screening tool in environmental samples. *Environment International*, 36, 361-367.
- BROSÉUS, R.; VINCENT, S.; ABOILFADL, K.; DANESHVAR, A.; SAUVÉ, S.; BARBEAU, B. & PRÉVOST, M. (2009). Ozone oxidation of pharmaceuticals, endocrine disruptors and pesticides during drinking water treatment. *Water Research* 43(18), 4707-4717.
- CÉSPEDES, R.; PETROVIC, M.; RALDÚA, D.; SAURA, U.; PIÑA, B., LACORTE, S.; BARCELÓ, D. (2004). Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378(3), 697-708.
- CÉSPEDES, M.A; GALINDO, M.I. & COUSO, J.P., (2010). Dioxin toxicity *in vivo* results from an increase in the dioxin-independent transcriptional activity of the aryl hydrocarbon receptor. *PLoS one*, 5(11).
- DIAS-MACHADO, M.; MADEIRA, L. M.; NOGALES, B.; NUNES, O. C., & MANAIA, C. M. (2006). Treatment of cork boiling wastewater using chemical oxidation and biodegradation. *Chemosphere*, 64(3), 455-461.
- DOMÉNECH, X.; JARDIM, W.F. & LITTER, M.I. (2001). Procesos Avanzados de Oxidación para la eliminación de contaminantes. M. A. Blesa (ed.), Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Digital Grafic, La Plata, Argentina. Capítulo 1, 3-26.
- FERNÁNDEZ, M.P.; NOGUEROL, T.; LACORTE, S.; BUCHANAN, I. & PIÑA, B. (2009). Toxicity identification fractionation of environmental estrogens in waste water and sludge using gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry and recombinant yeast assay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393, 957-968.
- FERNÁNDEZ-ALBA, A R.; HERNANDO, D.; AGÜERA, A; CÁCERES, J. & MALATO, S. (2002). Toxicity assays: a way for evaluating AOPs efficiency. *Water Research*, 36(17), 4255-4262.
- GAIDO, K. W.; LEONARD, L. S.; LOVELL, S.; GOULD, J. C.; BABAÍ, D.; PORTIER, C. J., & MCDONNELL, D. P. (1997). Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 143(1), 205-212.
- GEMINI, E.; CORREA, A.; GALLEGO, S. & KOROL, V. (2008). Degradación microbiana de 2,4-dinitrofenol en efluentes líquidos: efecto de factores bióticos y abióticos. *Hig. Sanid. Ambient.* 8: 320-324.
- GERALDES, V.; MINHALMA, M.; PINHO, M. N. DE, & ANIL, A. (2009). Nanofiltration of cork wastewaters and their

possible use in leather industry as tanning agents, *Journal of Environmental Studies*, 18(3), 353–357.

GOVEA SALAS, M. & SILVIA BELMARES, S. Y. (2013). “Actividad anticancerígena del ácido gálico en modelos biológicos *in vitro*”. Revista científica de la Comunidad Autónoma de Coahuila. Volumen 5, nº 9.

GUEDES, A. M.; MADEIRA, L. M.; BOAVENTURA, R. A. & COSTA, C. A. (2003). Fenton oxidation of cork cooking wastewater--overall kinetic analysis. *Water Research*, 37(13), 3061–3069.

JANEX-HABIBI, M.-L.; HUYARD, A.; ESPERANZA, M., & BRUCHET, A. (2009). Reduction of endocrine disruptor emissions in the environment: the benefit of wastewater treatment. *Water Research*, 43(6), 1565–1576.

KLAMERTH, N.; RIZZO, L.; MALATO, S.; MALDONADO, M.I.; AGÜERA, A. & FERNANDEZ-ALBA, A.R. (2010) Degradation of fifteen emerging contaminants at mg L⁻¹ initial concentrations by mild solar photo-Fenton in MWTP effluents. *Water Research* 44, 545–554.

LI, J.; CHEN, M.; WANG, Z.; MA, M. & PENG, X. (2011). Analysis of environmental endocrine disrupting activities in wastewater treatment plant effluents using recombinant yeast assays incorporated with exogenous metabolic activation system. *Biomedical and Environmental Sciences : BES*, 24(2), 132–139.

LIU, Z.-H.; KANJO, Y. & MIZUTANI, S. (2009). Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment - physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: a review. *The Science of the Total Environment*, 407(2), 731–748.

MARUGÁN, J.; BRU, D.; PABLOS, C. & CATALÁ, M. (2012). Comparative evaluation of acute toxicity by *Vibrio fischeri* and fern spore based bioassays in the follow-up of toxic chemicals degradation by photocatalysis. *Journal of Hazardous Materials*, 213-214, 117–122.

MENDONÇA, E.; PICADO, A; SILVA, L. & ANSELMO, A M. (2007). Ecotoxicological evaluation of cork-boiling wastewaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66(3), 384–390.

MILLER III, C.A. (1999). A human aryl hydrocarbon receptor signaling pathway constructed in yeast display additive responses to ligand mixtures. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 160,297-303.

MUNTER, R. (2001). *Advanced Oxidation Processes – Current*, 59–80.

MURILLO ACEVEDO, Y. S. (2011). Estudio de adsorción de fenol y 2,4-dinitrofenol desde solución acuosa sobre materiales porosos obtenidos a partir de huesos de bovino, porcino y pollo. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Bogotá.

MURK A.J.; LEGLER J.; VAN LIPZIG M.M.H.; MEERMAN J.H.N.; BELFROID A.C.; SPENKELINK A.; VAN DER BURG B.; RIJS G.B.J. & VETHAAK D. (2002). Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three *in vitro* bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(1), 16–23

NADDEO, V.; MERIÇ, S.; KASSINOS, D.; BELGIORNO, V. & GUIDA, M. (2009). Fate of pharmaceuticals in contaminated urban wastewater effluent under ultrasonic irradiation. *Water Research*, 43, 4019-4027.

NGUYEN M.T.; VAN DER OOST R. & BOVEE T.F.H. (2011). Validation of the REA bioassay to detect estrogenic activity in the water cycle. *Toxicology in Vitro*, 25, 2003–2009.

NOGUEROL, T.N.; BORONAT, S.; CASADO, M.; RALDÚA, D.; BARCELÓ, D. & PIÑA, B. (2006). Evaluating the interactions of vertebrate receptors with persistent pollutants and antifouling pesticides using recombinant yeast assays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385, 1012–1019.

NOGUEROL, T.N.; BORONAT, S.; JARQUE, S.; BARCELÓ, D. & PIÑA, B. (2006). Detection of hormone receptor ligands in yeast by fluorogenic methods. *Talanta*, 69, 351–358.

NOGUEROL, T.N. (2007). Desenvolupament i aplicació de bioassaigs per a la detecció i quantificació de xenobiòtics amb llevats recombinants, Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona.

OLIVARES, A.; VAN DROOGE, B.L.; PEREZ BALLESTA, P.; GRIMALT, J.O; PIÑA, B. 2011. Assessment of dioxin-like activity in ambient air particulate matter using recombinant yeast assays. *Atmospheric Environment*, 45. 271-274

OLLER, I.; MALATO, S. & SÁNCHEZ-PÉREZ, J. A. (2011). Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination--a review. *The Science of the Total Environment*, 409(20), 4141–4166.

PAWLOWSKI, S.; TERNES, T.; BONERZ, M.; KLUCZKA, T.; VAN DER BURG, B.; NAU, H.; ERDINGER, L. & BRAUNBECK, T. (2003). Combined *in situ* and *in vitro* assessment of the estrogenic activity of sewage and surface water samples. *Toxicological Sciences*, 75(1), 57–65.

PERES, J. A; BELTRÁN DE HEREDIA, J. & DOMÍNGUEZ, J. R. (2004). Integrated Fenton’s reagent-coagulation/flocculation process for the treatment of cork processing wastewaters. *Journal of Hazardous Materials*, 107(3), 115–121.

QUIRÓS, L.; CÉSPEDES, R.; LACORTE, S.; VIANA, P.; RALDUÁ, D.; BARCELÓ, D. & PIÑA, B. (2005). Detection and evaluation of endocrine-disruption activity in water

samples from Portuguese rivers. *Environ Toxicol Chem* 24,389–395

REDDY S. & BROWNAWELL B.J. (2005). Analysis of estrogens in sediment from a sewage-impacted urban estuary using high-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(5), 1041–1047.

RIZZO, L.; LOFRANO, G.; GRASSI, M.; BELGIORNO, V. (2008). Pre-treatment of olive mill wastewater by chitosan coagulation and advanced oxidation processes. *Separation and Purification Technology* 63, 648–653.

RIZZO, L.; MERIC, S.; KASSINOS, D.; GUIDA, M.; RUSSO, F. & BELGIORNO, V. (2009). Degradation of diclofenac by TiO₂ photocatalysis: UV absorbance kinetics and process evaluation through a set of toxicity bioassays. *Water Research* 43, 979–988.

RIZZO L. (2011). Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. *Water Research* 45, 4311–4340.

ROMANO-MOZO, D. (2012). Disruptores endocrinos. Nuevas respuestas para nuevos retos. Ed. Instituto Sindical de Trabajo, Ambiente y Salud (ISTAS).

ROUTLEDGE E.J. & SUMPTER J.P. (1996). Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(3), 241–248.

SANCHES S.; BARRETO CRESPO MT. & PEREIRA VJ (2010) Drinking water treatment of priority pesticides using low pressure UV photolysis and advanced oxidation processes. *Water Research*, 44, 1809–1818

SÁNCHEZ-PRADO, L.; GARCIA-JARES, C.; LLOMPART, M. (2010). Microwave-assisted extraction: Application to the determination of emerging pollutants in solid samples. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2390–2414.

SCHMITT M.; GELLERTB G. & LICHTENBERG-FRATÉ H. (2005). The toxic potential of an industrial effluent determined with the *Saccharomyces cerevisiae*-based assay. *Water Research*, 39, 3211–3218.

SCHWARTZ P.; THORPE K.L.; BUCHELI T.D.; WETTSTEIN F.E. & BURKHARDT-HOLM P. (2010). Short-term exposure to the environmentally relevant estrogenic mycotoxin

zearalenone impairs reproduction in fish. *Science of the Total Environment*, 409, 326–333.

SEGNEANU, A.E.; LAZAU, C.; SFIRLOAGA, P.; LAZAN, P.; BANDAS, C.; GROZESCU, I. & ORBECI, C. (2013). Waste Water Treatment Methods, en: "Water Treatment". Ediciones Walid Elshorbagy and Rezaul Kabir Chowdhury.

SILVA CA.; MADEIRA LM.; BOAVENTURA RA & COSTA CA. (2004). Photooxidation of cork manufacturing wastewater. *Chemosphere*, 55, 19–26.

TINWELL H.; JOINER R.; PATE I.; SOAMES A.; FOSTER J. & ASHBY J. (2000). Uterotrophic activity of bisphenol A in the immature mouse. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32, 118–126.

TOLLEFSEN K.E.; HARMAN C.; SMITH A. & THOMAS K.V. (2007). Estrogen receptor (ER) agonists and androgen receptor (AR) antagonists in effluents from Norwegian North Sea oil production platforms. *Marine Pollution Bulletin*, 54(3), 277–283.

U.S. EPA. (2002). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms, fifth ed. U.S. Environmental Protection Agency Office of Water (4303T), 1200 Pennsylvania Avenue, NW Washington, DC 20460. EPA-821-R-02-012.

VILAR, V.J.P., MALDONADO, M.I., OLLER, I., MALATO, S., & BOAVENTURA, R.A.R. (2009). Treatment of cork boiling and bleaching wastewaters in a pilot plant. *Water Research*. 43 (16), 4050-4062.

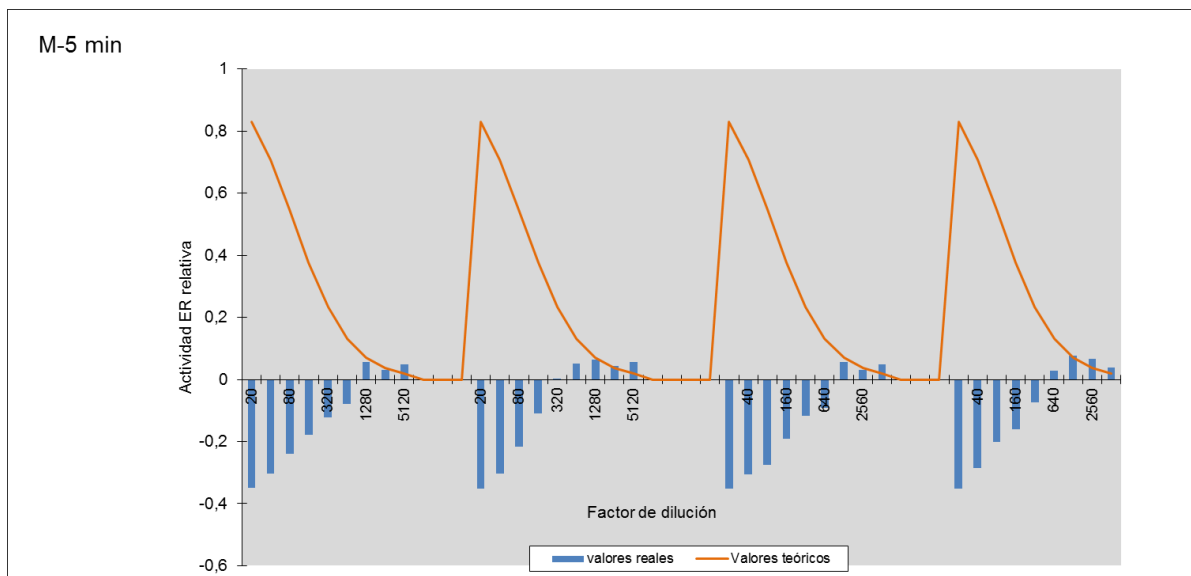
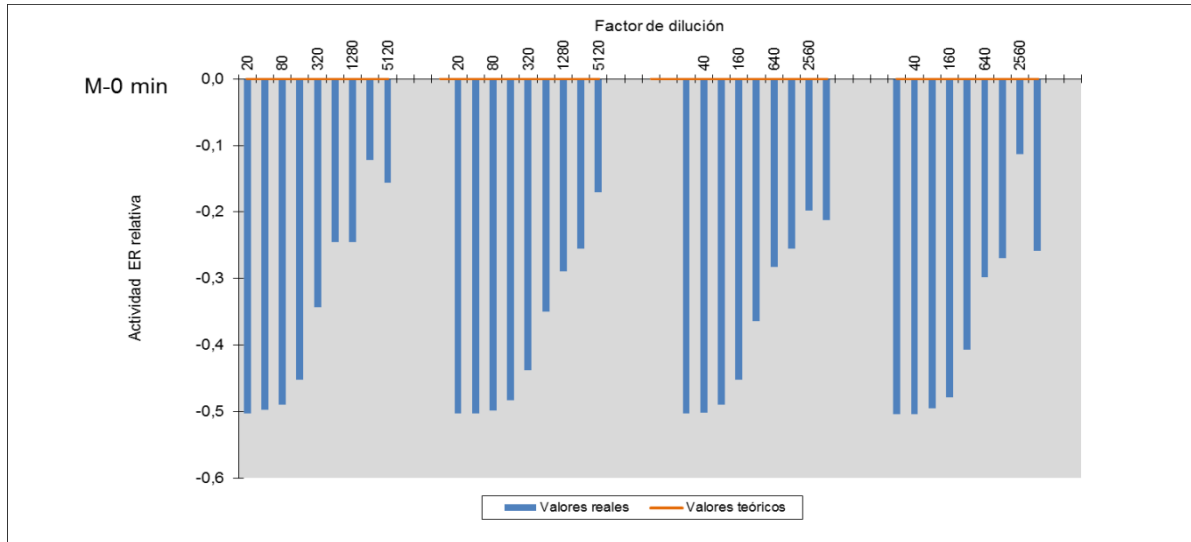
ZAPATA A.; OLLER I.; RIZZO L.; HILGERT S.; MALDONADO M.I.; SÁNCHEZ-PÉREZ J.A. & MALATO, S. (2010). Evaluation of operating parameters involved in solar photo-Fenton treatment of wastewater: interdependence of initial pollutant concentration, temperature and iron concentratio. *Applied Catalysis B: Environmental*, 97, 292–298.

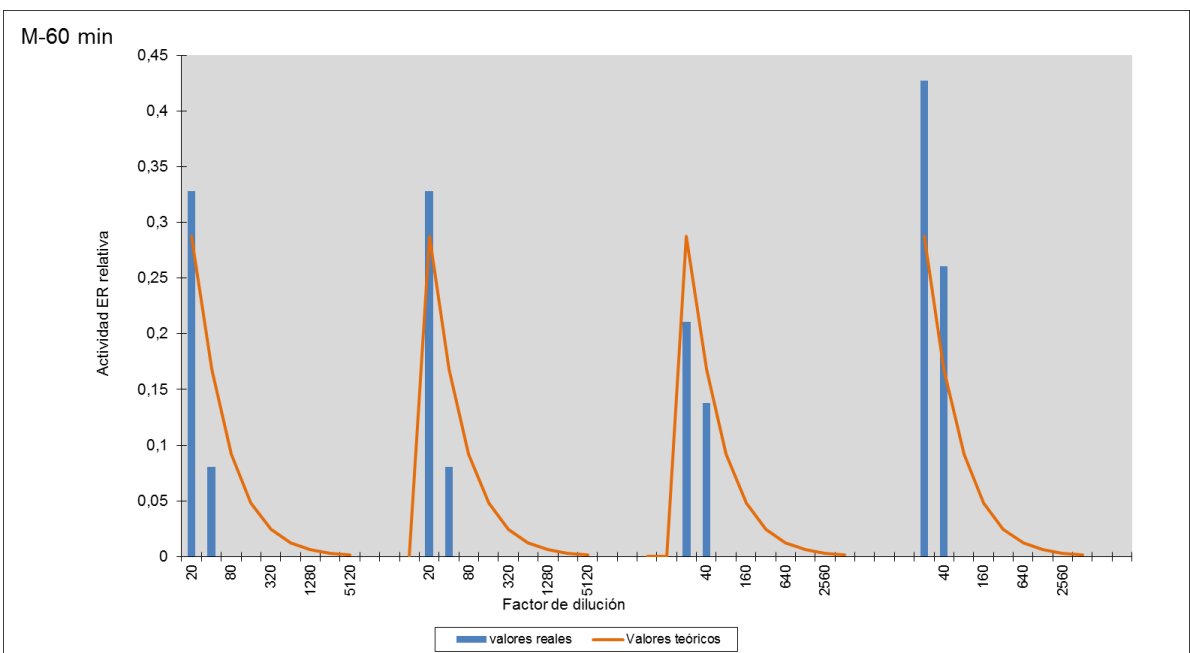
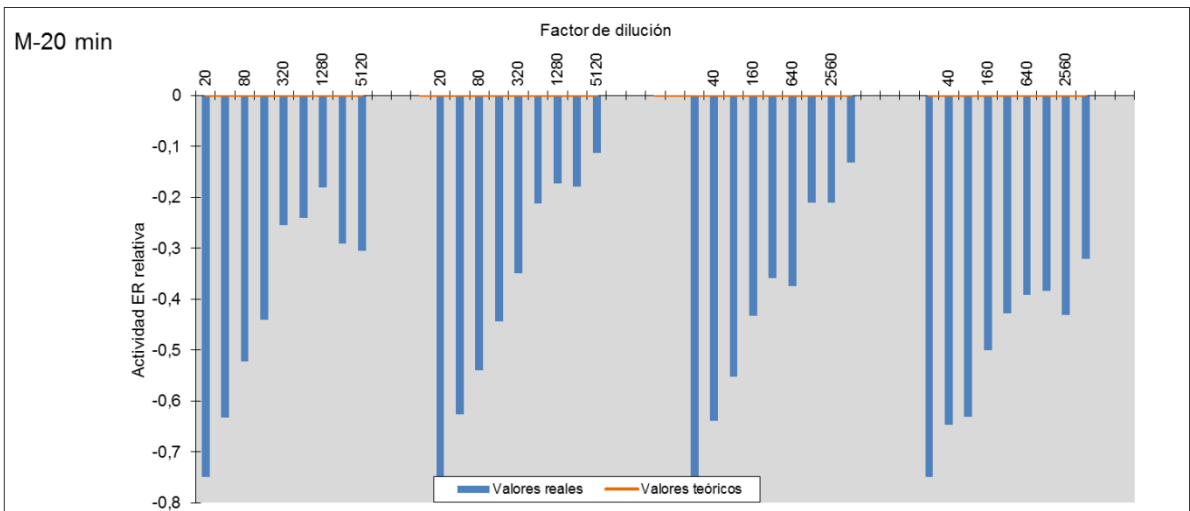
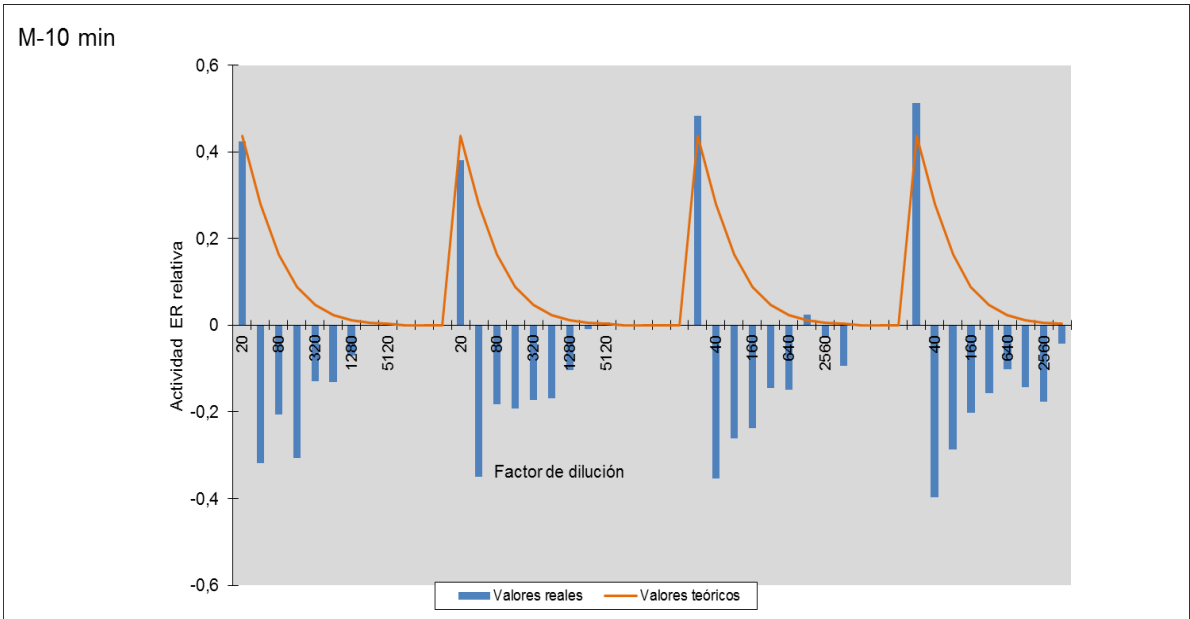
ZHANG SF.; ZHANG RF.; LI WK.; LI MS. & YANG GL. (2012). Effects of tannic acid on properties of anodic coatings obtained by micro arc oxidation on AZ91 magnesium alloy. *Surface & Coatings Technology* 207, 170–176.

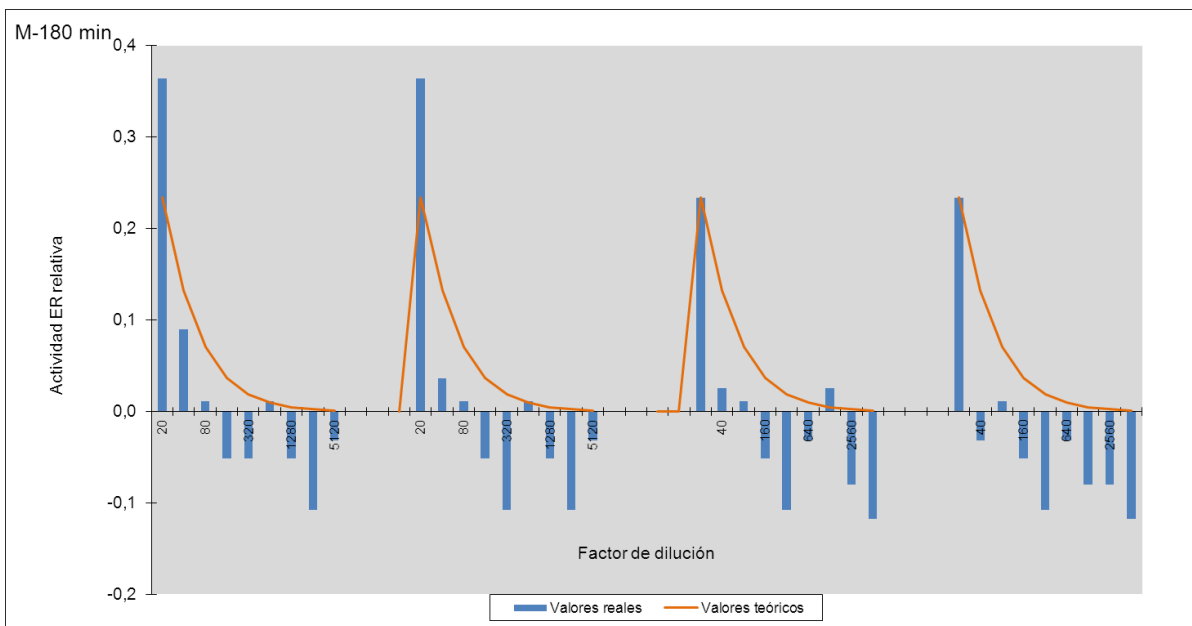
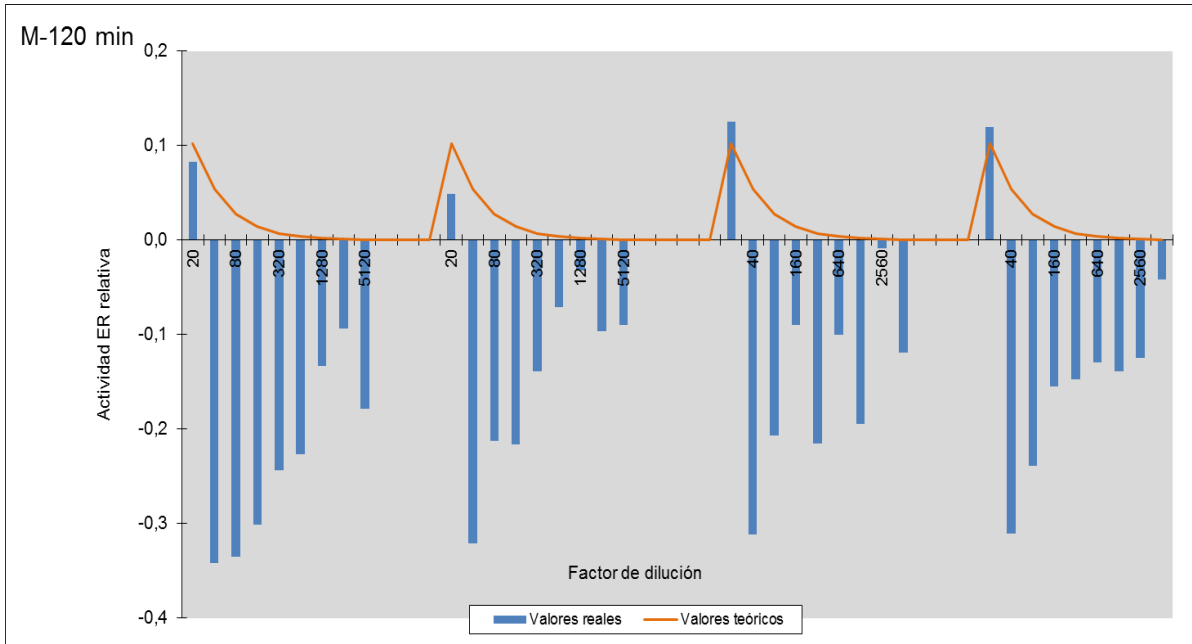
ANEXOS

Anexo 1. Actividad de disrupción endocrina - ensayo RYA-ER

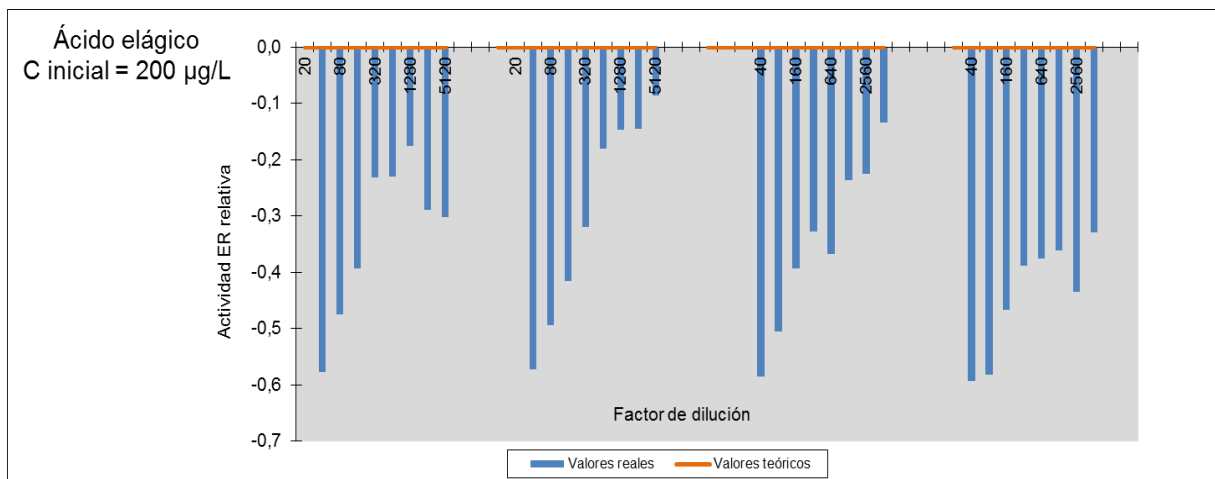
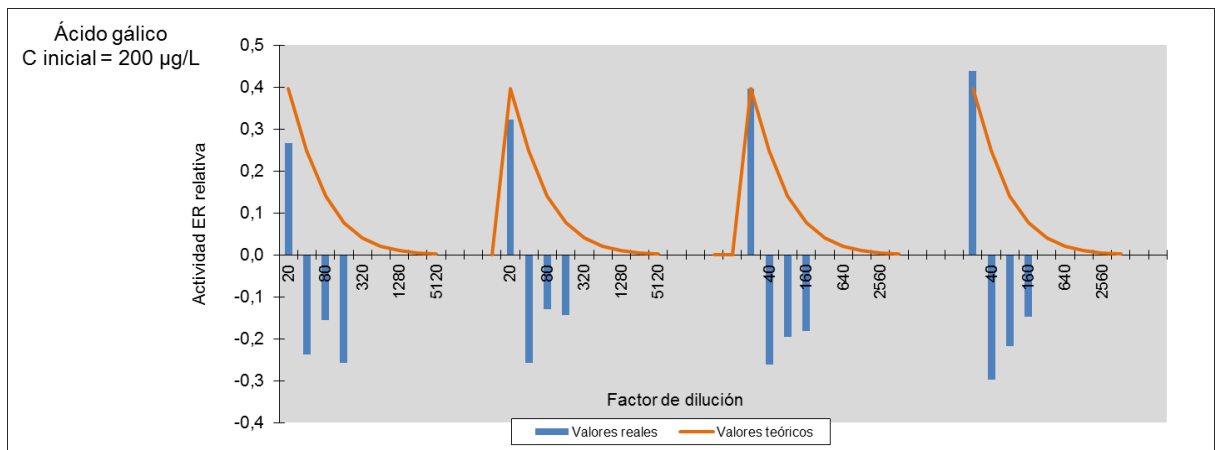
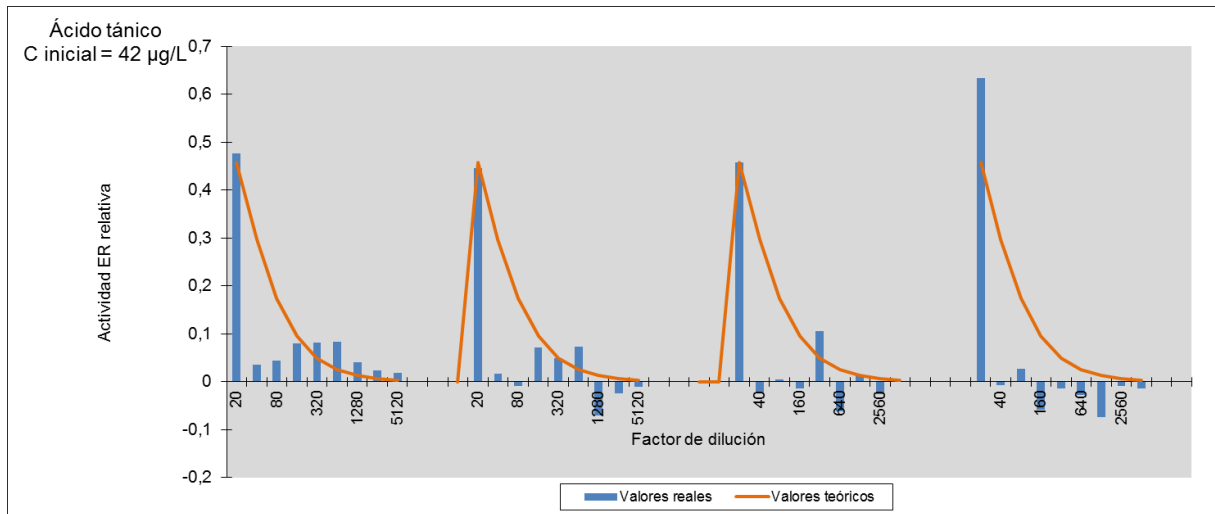
1.1. Actividad relativa ER de las muestras de agua complejas sometidas a tratamiento

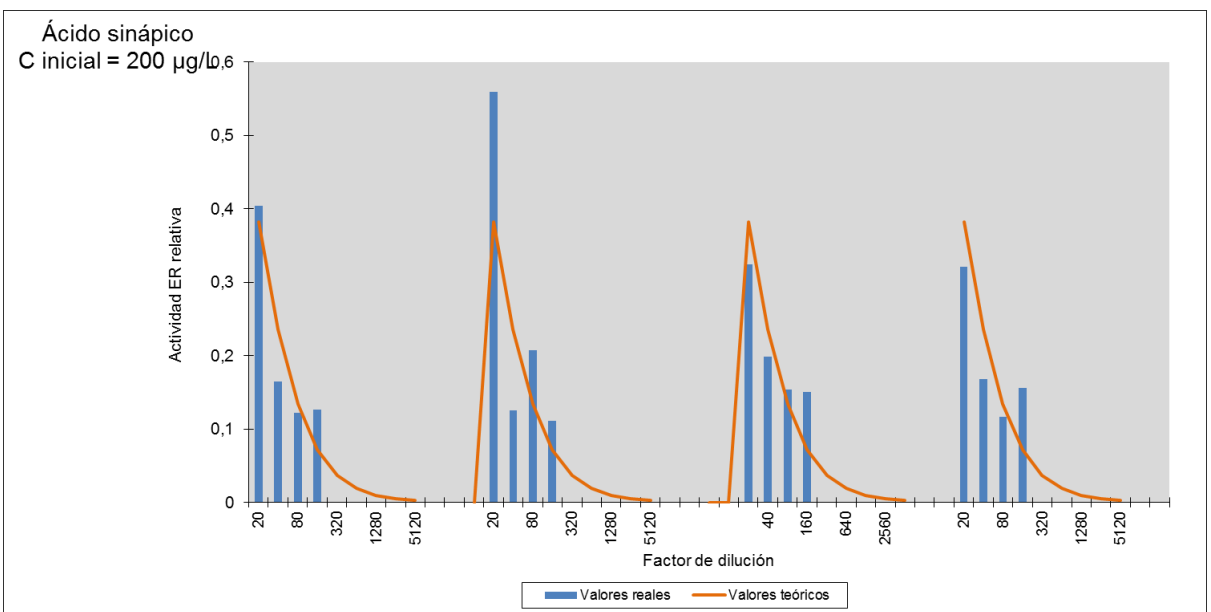
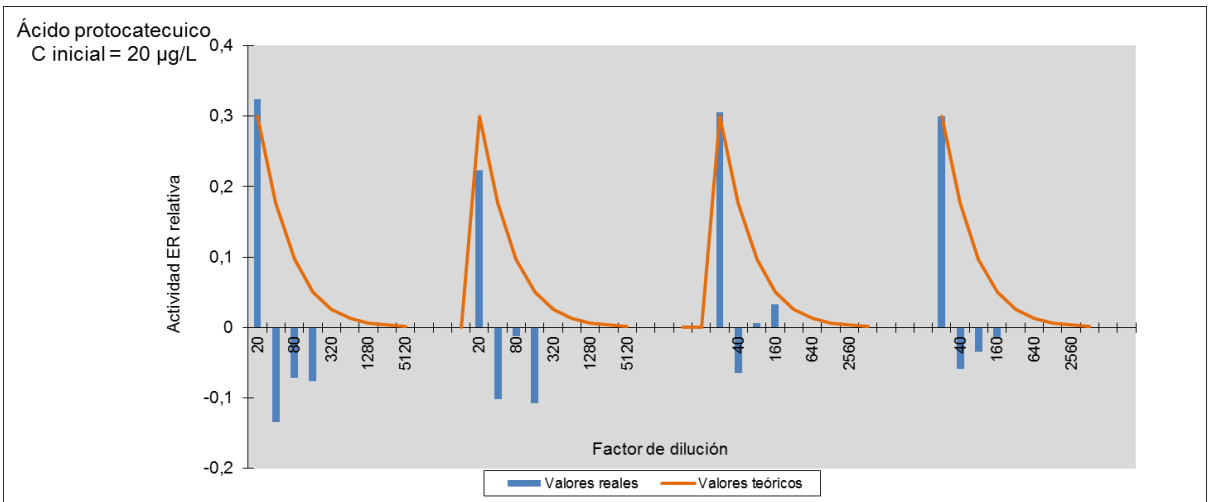
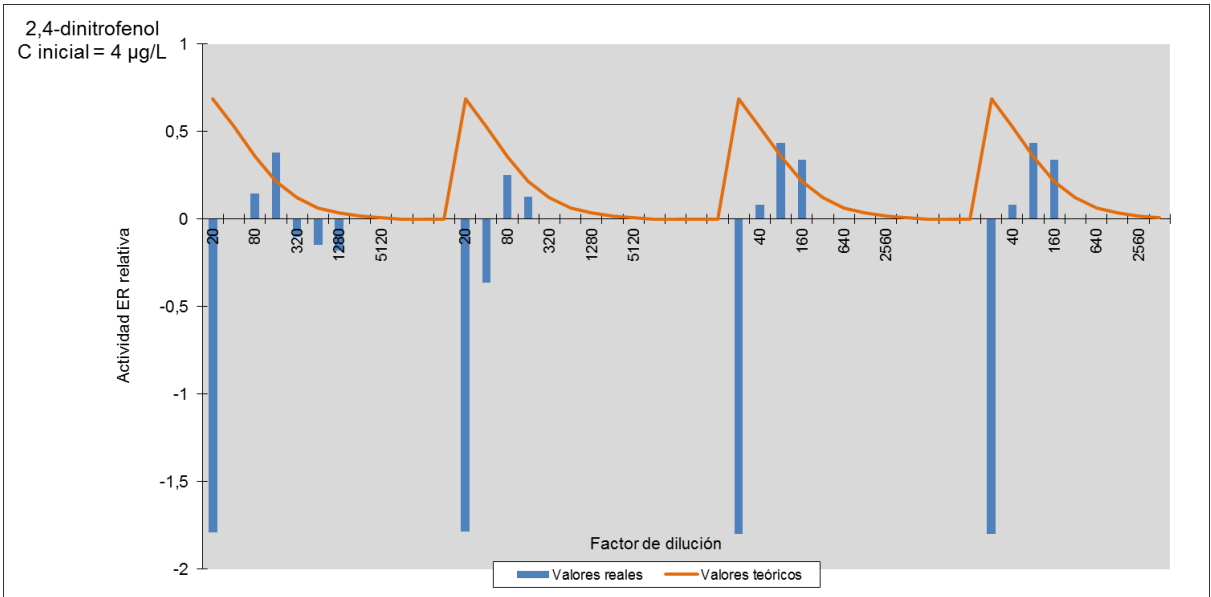




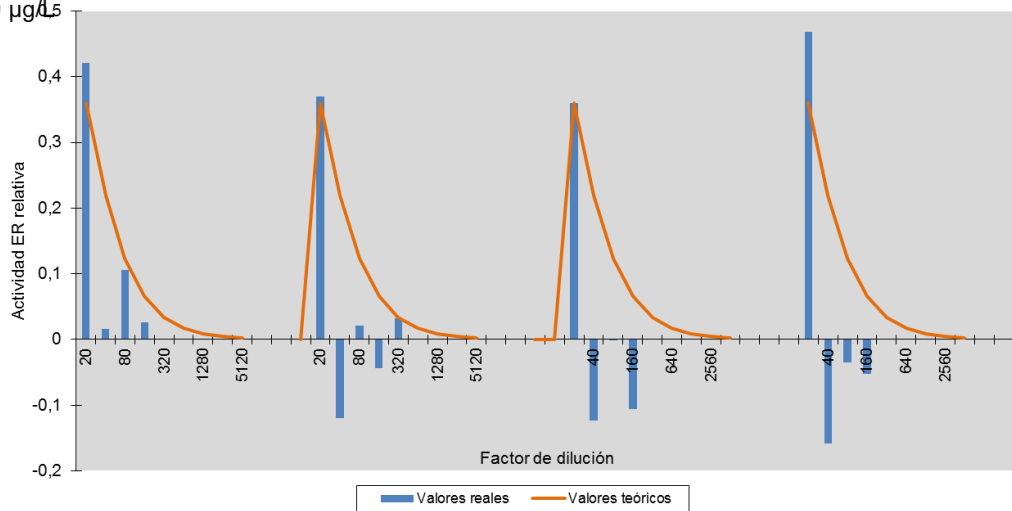


1.2. Actividad relativa ER de los compuestos derivados de la industria del corcho

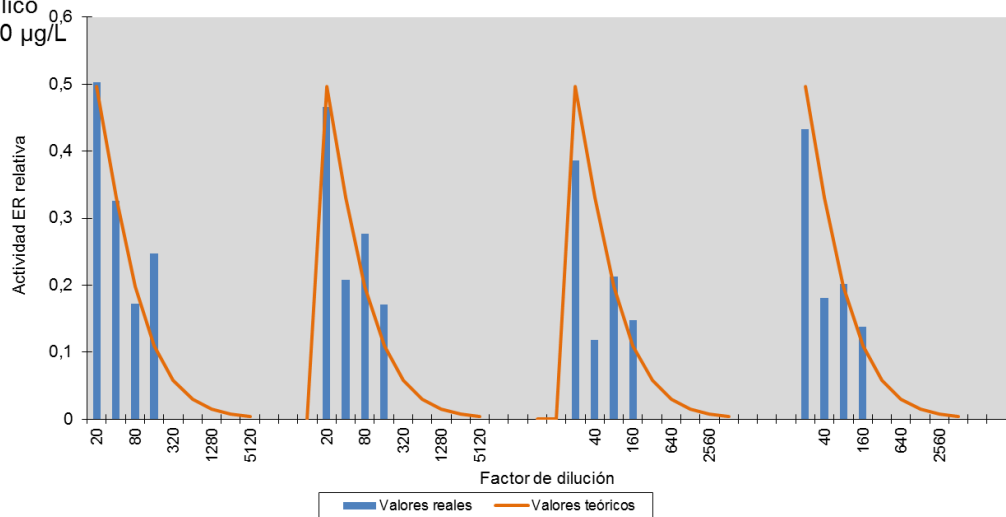




Ácido siríngico
C inicial = 600 $\mu\text{g/L}$

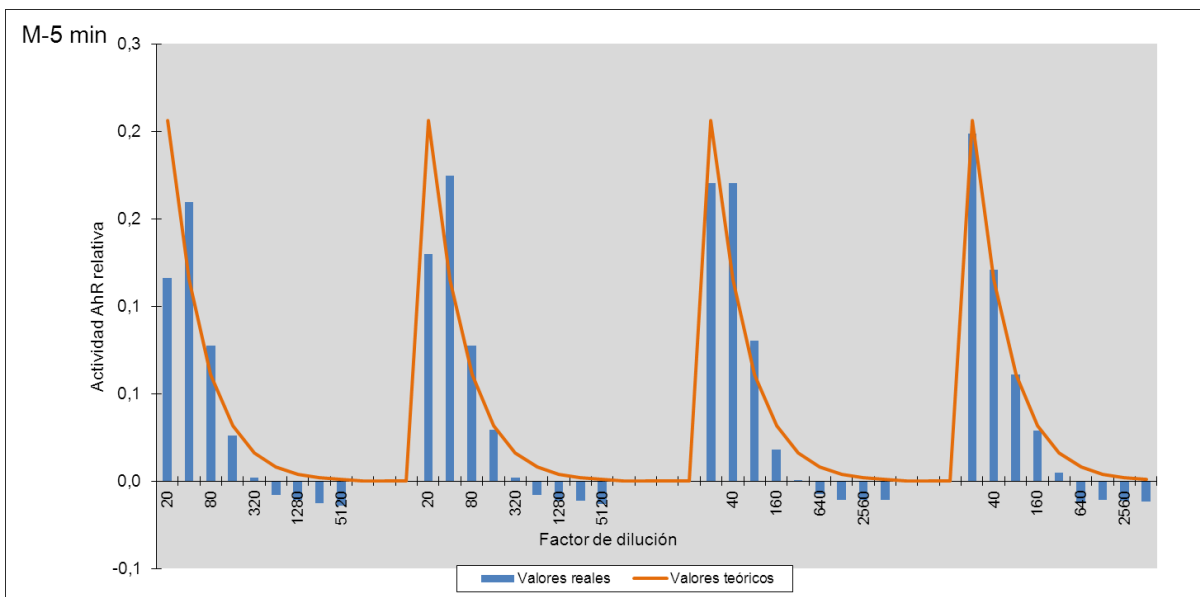
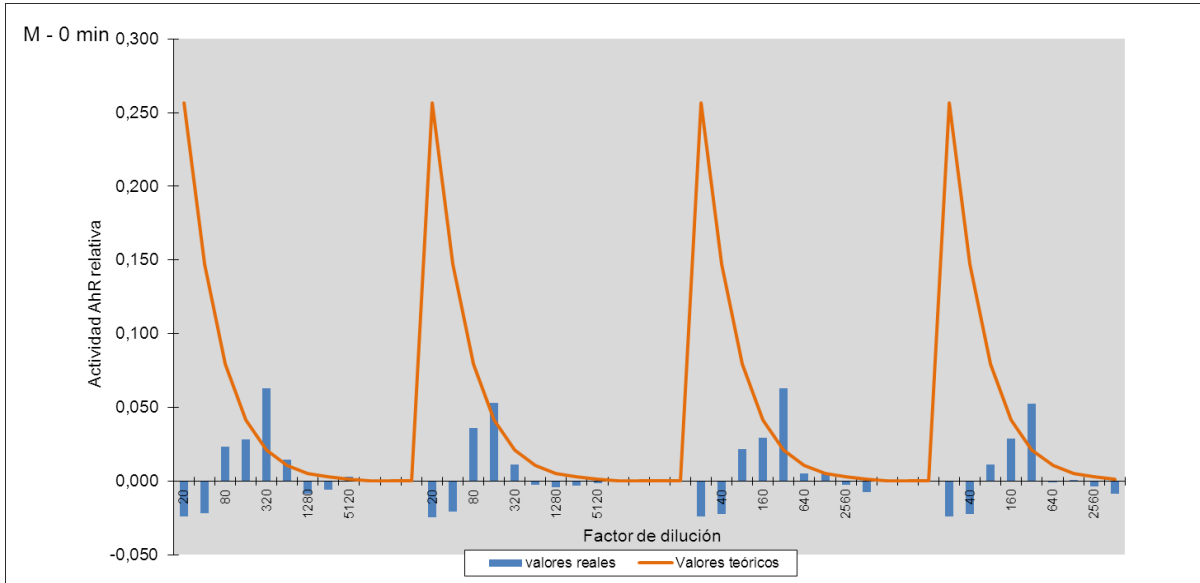


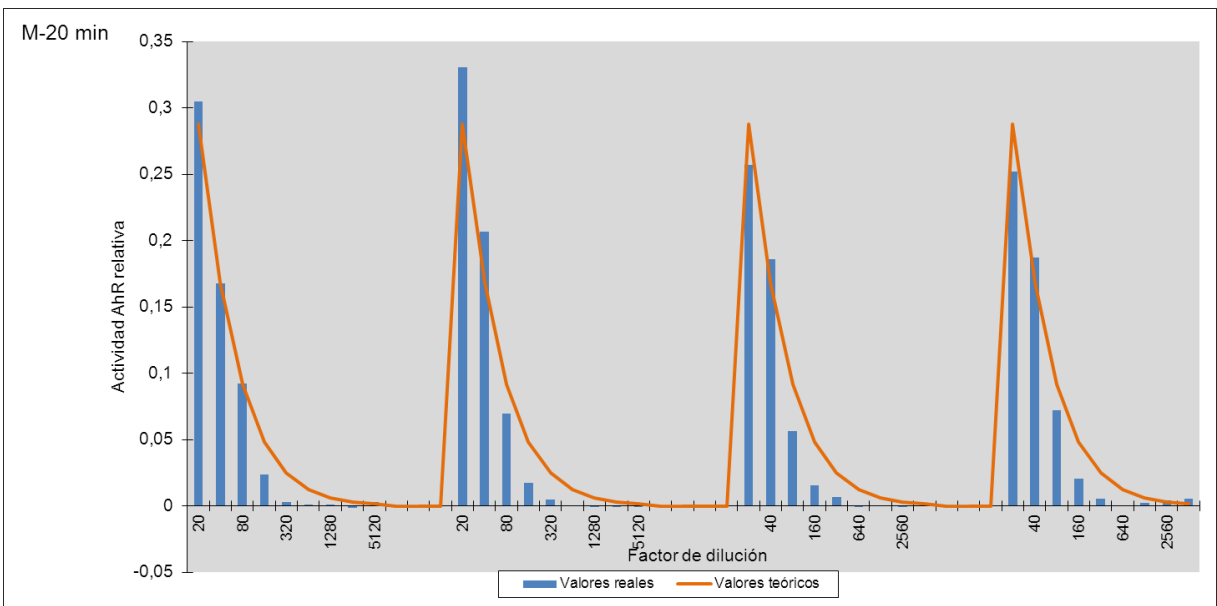
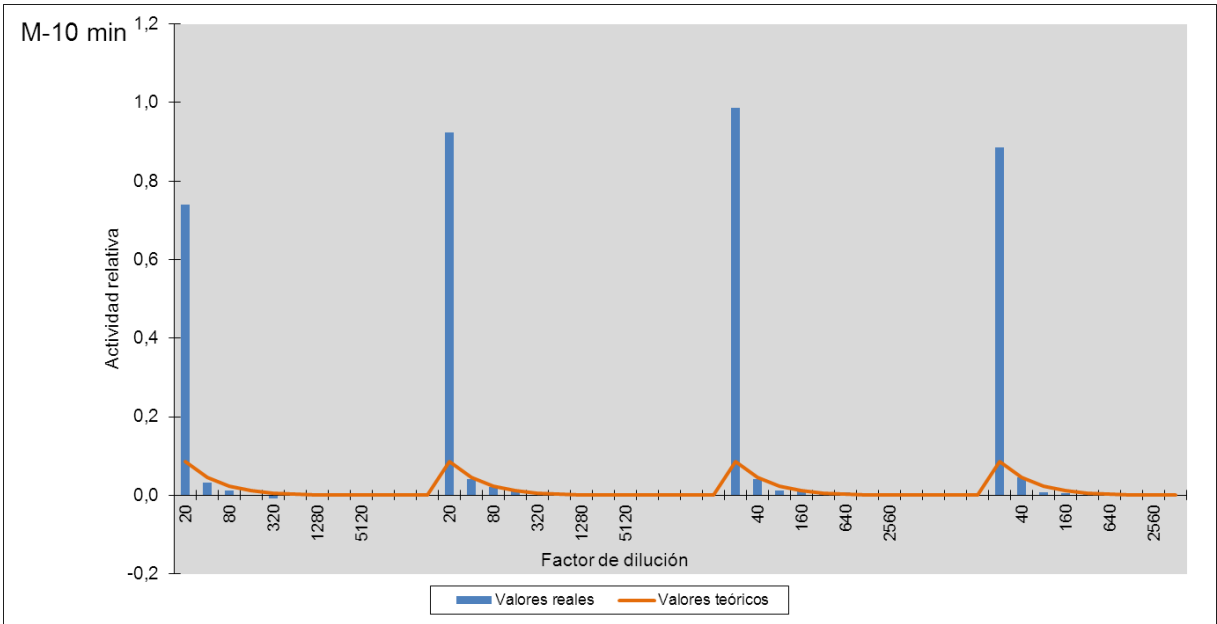
Ácido vanílico
C inicial = 200 $\mu\text{g/L}$

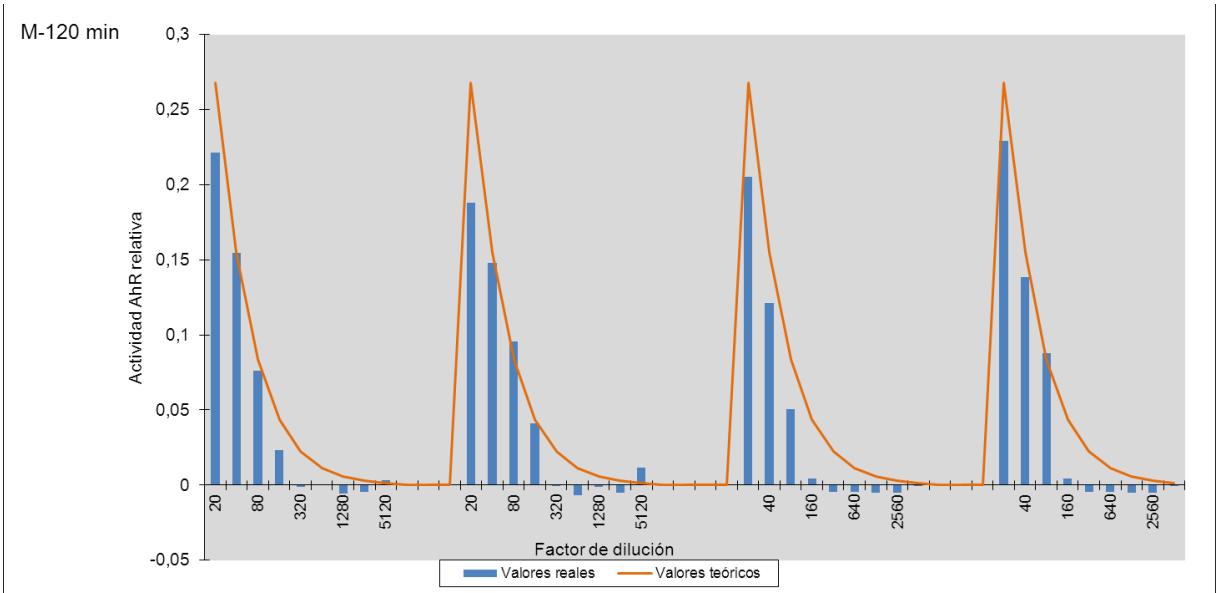
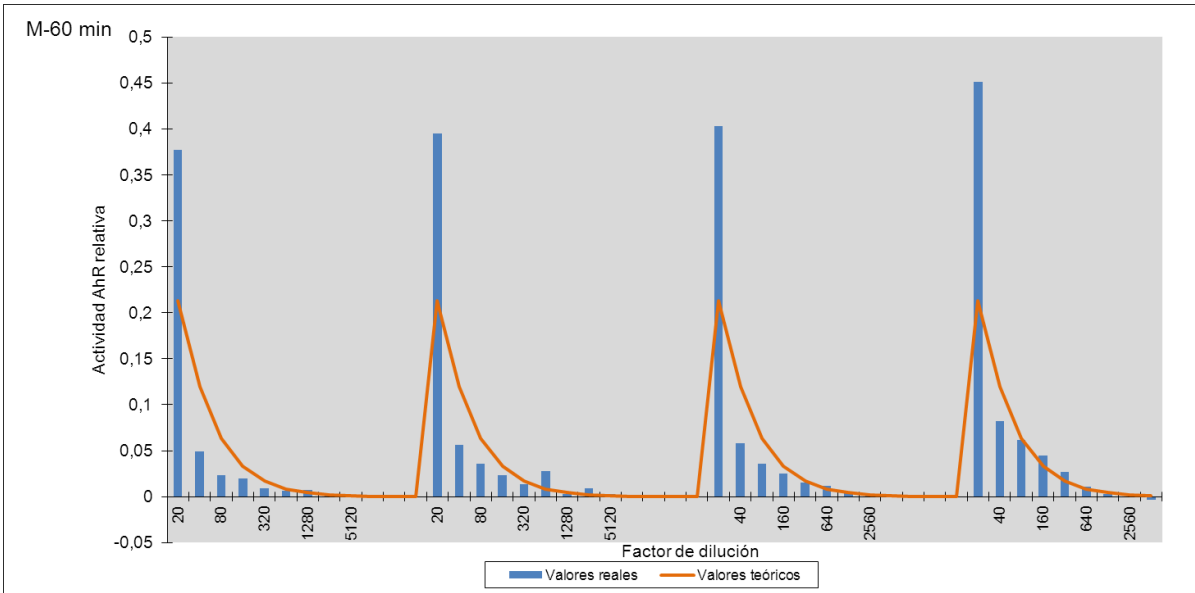


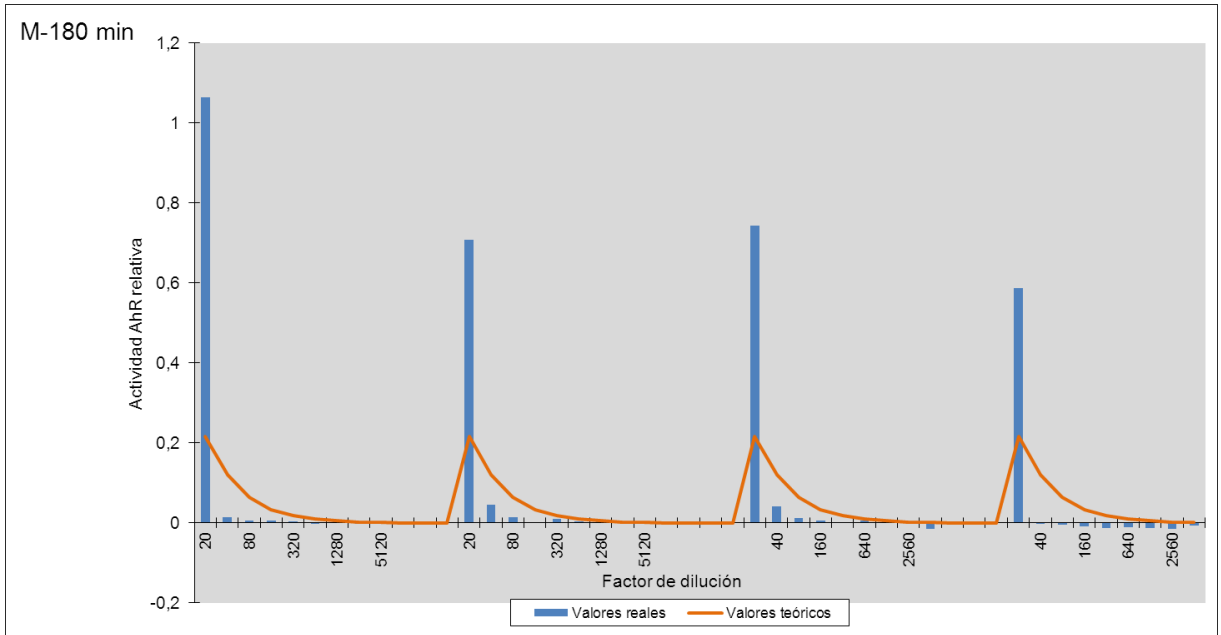
2. Actividad *dioxin-like* - ensayo RYA-AhR

2.1. Actividad relativa AhR de las muestras de agua complejas sometidas a tratamiento









2.2. Actividad relativa AhR de los compuestos derivados de la industria del corcho

