

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Universidad Politécnica de Valencia (UPV)



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

# ***Evaluación de los riesgos ambientales de contaminantes de preocupación emergente en la Unión Europea***

TRABAJO FIN DE GRADO  
TITULACIÓN: GRADO EN BIOTECNOLOGÍA  
ALUMNO/A: CELIA ÁLVAREZ NAVARRO  
TUTOR/A: CONSUELO SABATER MARCO  
COTUTOR/A: M<sup>a</sup> ÁNGELES CASTILLO LÓPEZ

Curso académico: 2016-2017  
Valencia, Junio 2017



UNIVERSIDAD  
POLITÉCNICA  
DE VALENCIA

**ESCUELA TÉCNICA  
SUPERIOR DE INGENIERÍA  
AGRONÓMICA Y DEL  
MEDIO NATURAL**

Ficha resumen del Trabajo Fin de  
Carrera

### Datos personales

Nombre y apellidos: Celia Álvarez Navarro

### Datos del trabajo de fin de carrera

Título del TFC: Evaluación de los riesgos ambientales de contaminantes de preocupación emergente en la Unión Europea.

Lugar de realización: Departamento Biotecnología ETSIAMN

Fecha de lectura:

Titulación: Grado en biotecnología

Especialidad: Toxicología ambiental

Tutor/a: Consuelo Sabater Marco

Cotutor/a: M<sup>a</sup> Ángeles Castillo López

### Resumen

La presión creciente de los procesos de urbanización, desarrollo industrial y la utilización indiscriminada del agua, han provocado el deterioro de la calidad de las mismas perdiendo su capacidad como recurso apto para usos posteriores.

Las aguas residuales urbanas e industriales cuando se vierten a cauces públicos pueden llevar unos niveles de contaminación orgánica e inorgánica muy altos y superiores a los que los ecosistemas pueden asimilar y autodepurar, dando lugar a una contaminación de las aguas superficiales y subterráneas. En este sentido, la limitada eficiencia de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) convencionales para eliminar microcontaminantes orgánicos ha sido ampliamente demostrada, ya que estas sustancias son sólo eliminadas o adsorbidas en parte por los procesos biológicos. Por ello, una amplia gama de estos compuestos (productos farmacéuticos o productos de cuidado personal, disruptores endocrinos, plaguicidas, plastificantes, compuestos organoclorados y organohalogenados persistentes, fenoles de alquilo, y metales pesados, etc.), escapan a los tratamientos convencionales, convirtiéndose en ubicuos en el medio ambiente a bajas concentraciones y causando múltiples efectos en los organismos acuáticos.

Por lo tanto, se hace necesario evaluar los riesgos de los microcontaminantes en los ecosistemas acuáticos; para ello, se dispone de potentes sistemas de predicción como son los bioensayos. En este trabajo se estudian los efectos tóxicos de cinco microcontaminantes (clorfenvinfos, diclofenaco, pentaclorofenol, PFO y terbutrina) sobre organismos pertenecientes a diferentes niveles tróficos como son la bacteria marina *Vibrio fischeri*, el alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, embriones del pez *Oryzias latipes* y dos líneas celulares de mamíferos, con el fin de realizar una evaluación de riesgos ambientales debidos a estos cinco compuestos.

### Palabras clave

Contaminantes emergentes, evaluación de riesgos ambientales, *Vibrio fischeri*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Oryzias latipes*, citotoxicidad, ecotoxicidad.

## Abstract

The increasing pressure of the processes of urbanization, industrial development and the indiscriminate use of water, have caused the deterioration of the quality of the water, which has lost its capacity for being used in later uses.

Urban and industrial wastewater are discharged into public waterways, which may lead to the increasing of organic and inorganic pollution levels, that can not be assimilated by the ecosystems, resulting in surface and groundwater contamination. In this sense, the limited efficiency of wastewater treatment plants (WWTP), which are responsible for the elimination of microcontaminants, has been widely demonstrated, since these substances are not completely removed or absorbed by biological processes. Therefore, a wide range of these compounds, coming from pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors, pesticides, plasticizers, organochloride and persistent organohalogen compounds, among others, escape from conventional treatments, causing multiple and undesirable effects on aquatic organisms.

For the reasons explained before, it is necessary to assess the risks of micropollutants in aquatic ecosystems. In order to do this, different bioassays are available to predict the effects in different organisms.

In the present work, the toxic effects of five microcontaminants (chlorfenvinphos, diclofenac, pentachlorophenol, PFO and terbutrin) are studied on the organisms belonging to different trophic levels, such as the marine bacterium *Vibrio fischeri*, the alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, embryos of the fish *Oryzias latipes* and two mammalian cell lines, in order to carry out an environmental risk assessment due to these five compounds.

## Key words

Emerging pollutants, environmental risk assessment, *Vibrio fischeri*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Oryzias latipes*, cytotoxicity, ecotoxicity.

## Resum

La creixent pressió dels processos d'urbanització, desenvolupament industrial i la utilització indiscriminada de l'aigua, han provocat el deteriorament de la qualitat d'aquests, que han perdut la seva capacitat com recurs apte per a diferents usos.

Les aigües residuals urbanes i industrials quan s'aboquen a les lleres públiques poden portar uns nivells de contaminació orgànica i inorgànica molt alts, i superiors als que els ecosistemes poden assimilar i depurar, donant lloc a la contaminació de les aigües superficials i subterrànies. En aquest sentit, la limitada eficiència de les estacions depuradores d'aigües residuals convencionals (EDAR) per a eliminar microcontaminants ha estat àmpliament demostrada, ja que aquestes substàncies només són eliminades en part durant el fill processos biològics de depuració. Per això, una àmplia gamma de aquests compostos (productes farmacèutics o de cura personal, disruptors endocrins, plaguicides, plastificants, compostos organoclorats persistents i organohalogenats, fenols, metalls pesats, etc.), escapen dels tractaments convencionals, convertint-se en ubics a l'ambient a concentracions baixes, però que causen diversos efectes no desitjats en els organismes aquàtics.

Per tant, es fa necessari avaluar els riscos dels microcontaminants en els ecosistemes aquàtics, i per això es disposa de potents sistemes de predicció com són els bioassaigs. En aquest treball s'estudien els efectes tòxics de cinc microcontaminants (clorfenvinfos, diclofenac, pentaclorofenol, PFO i terbutrina) sobre organismes que pertanyen a diferents nivells tròfics com són la bacteria marina *Vibrio fischeri*, l'alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, embrions del peix *Oryzias latipes* i dues línies cel·lulars de mamífers, per tal de realitzar una avaluació des riscos ambientals deguts a aquests cinc compostos.

## Paraules clau

Contaminants emergents, avaluació de risc ambiental, *Vibrio fischeri*, *Subcapitata Pseudokirchneriella*, *Oryzias atipes*, citotoxicitat, ecotoxicitat.

**AGRADECIMIENTOS:**

*A Consuelo, por enseñarme tantas cosas en estos meses.*

*Y en especial a mis padres, a quienes debo todo, y a mi hermana, quien hace de este mundo un lugar mejor.*

*Ojalá algún día llegue a merecerlos.*

## Índice de Contenidos

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. PROBLEMÁTICA GENERAL DE LOS MICROCONTAMINANTES .....	1
1.2. EMPLEO DE BIOENSAYOS DE TOXICIDAD PARA LA EVALUACIÓN DE RIESGOS MEDIAMBIENTALES .....	2
1.3. MICROCONTAMINANTES DE ESTUDIO.....	3
1.3.1. CLORFENVINFOS.....	3
1.3.2. DICLOFENACO .....	4
1.3.3. PENTACLOROFENOL .....	5
1.3.4. PFO (HEPTADECALFLUOROCTANESULFONIC ACID POTASSIUM SALT) .....	6
1.3.5. TERBUTRINA.....	7
1.4. UTILIZACIÓN DE BIOENSAYOS .....	8
1.5. UTILIZACIÓN DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS.....	9
1.6. EVALUACIÓN DEL RIESGO AMBIENTAL DEBIDO AL USO DE MICROCONTAMINANTES .....	10
1.6.1. LEGISLACIÓN PARA LOS 5 MICROCONTAMINANTES.....	10
1.6.2. EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL RIESGO POR EL COCIENTE PEC/PNEC SEGÚN LA DIRECTRIZ DOCE Nº 161/9 (1994).....	11
1.6.3. ÍNDICES DE RIESGO PARA UNA EMISIÓN DIRECTA Y ESCALA LOCAL SEGÚN EL MODELO DE VIGHI Y CALAMARI (1996).....	12
1.6.4. MODELO INFORMÁTICO DE PREDICCIÓN Y EVALUACIÓN DE NIVELES DE RIESGO MEDIAMBIENTALES EN ORGANISMOS ACUÁTICOS: MODELO PERPEST 3.0 .....	13
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
3.1. COMPUESTOS DE ENSAYO .....	15
3.2. ORGANISMOS DE ENSAYO .....	15
3.3. EQUIPOS EMPLEADOS. ....	15
3.4. ENSAYOS DE TOXICIDAD.....	16
3.4.1. ENSAYO DE TOXICIDAD CON LA BACTERIA <i>VIBRIO FISCHERI</i> .....	16
3.4.2. ENSAYO DE TOXICIDAD CON EL ALGA <i>PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA</i> .....	16
3.4.3. ENSAYO DE TOXICIDAD CON EL PEZ <i>ORYZIAS LATIPES</i> .....	17
3.4.4. ENSAYO DE TOXICIDAD CON LAS LÍNEAS CELULARES HEK Y N2A. ....	18
3.4.5. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS. ....	19
3.5. ANÁLISIS DE BIOMARCADORES EN EMBRIONES DE <i>ORYZIAS LATIPES</i> EXPUESTOS A LOS CINCO MICROCONTAMINANTES. ....	19
3.5.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS. ....	19
3.5.2. PROTEÍNAS TOTALES. ....	19
3.5.3. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	20
3.6. EVALUACIÓN DEL RIESGO AMBIENTAL: CÁLCULO DEL COCIENTE PEC/PNEC SEGÚN LA DIRECTRIZ DOCE Nº 161/9 (1994).....	20
3.7. EVALUACIÓN DEL RIESGO AMBIENTAL: CÁLCULO DEL COCIENTE PEC/PNEC SEGÚN LA DIRECTRIZ DOCE Nº 161/9 (1994).....	21
3.8. EVALUACIÓN DEL RIESGO AMBIENTAL: MODELO PESPEST 3.0 .....	22
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>23</b>
4.1. EFECTO DE LOS MICROCONTAMINANTES SOBRE <i>VIBRIO FISCHERI</i> .....	23

4.2.	EFFECTO DE LOS MICROCONTAMINANTES SOBRE <i>P. SUBCAPITATA</i> .....	26
4.3.	EFFECTO DE SOLUCIONES ACUOSAS FORTIFICADAS CON LOS CINCO MICROCONTAMINANTES, TRATADAS MEDIANTE FOTO-FENTON A DIFERENTES TIEMPOS, SOBRE <i>P. SUBCAPITATA</i> .....	29
4.4.	EFFECTO DE LOS MICROCONTAMINANTES SOBRE <i>ORYZIAS LATIPES</i> .....	30
4.5.	EFFECTO DE LOS MICROCONTAMINANTES SOBRE LAS LÍNEAS CELULARES HEK Y N2A.....	33
4.6.	ANÁLISIS DE BIOMARCADORES .....	37
4.7.	RESULTADO DE LA EVALUACIÓN DEL RIESGO AMBIENTAL: CÁLCULO DEL COCIENTE PEC/PNEC SEGÚN LA DIRECTRIZ DOCE NºL 161/9 (1994).....	38
4.8.	RESULTADO DE LA EVALUACIÓN DEL RIESGO AMBIENTAL: CÁLCULO DE LOS ÍNDICES DE RIESGO PARA DESCARGA DIRECTA A ESCALA LOCAL Y GLOBAL SEGÚN EL MODELO DE VIGHI Y CALAMARI (1996) .....	38
4.9.	RESULTADO DE LA EVALUACIÓN DEL RIESGO AMBIENTAL: RIESGO PREDECIBLE EN ORGANISMOS ACUÁTICOS SEGÚN EL MODELO PERPEST.....	39
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>41</b>
<b>6.</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>42</b>
<b>7.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>44</b>

## Índice de Figuras

Figura 1. Estructura química de clorfenvinfos. a: Estructura 2D. b: Conformación 3D. (PUBCHEM, 2017).....	3
Figura 2 Estructura química de diclofenaco. a: Estructura 2D. b: Conformación 3D. (PUBCHEM, 2017).....	5
Figura 3 Estructura química de pentaclorofenol. a: Estructura 2D. b: Conformación 3D. (PUBCHEM, 2017).....	6
Figura 4 Estructura química de PFO. a: Estructura 2D. b: Conformación 3D. (PUBCHEM, 2017).....	7
Figura 5 Estructura química de terbutrina. a: Estructura 2D. b: Conformación 3D. (PUBCHEM, 2017).....	8
Figura 6 Esquema del ensayo de toxicidad con embriones de <i>O.latipes</i> . Adaptado de "OECD Guidelines for the testing of chemicals. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) test" (2013).....	18
Figura 7 Gráficos de cajas y bigotes de la inhibición de la bioluminiscencia de la bacteria <i>V. fischeri</i> frente a los diferentes niveles de concentración de los cinco microcontaminantes y de la mezcla. a. CVF (mg/L). b. DCF (mg/L). c. PCP (µg/L). d. PFO (mg/L). e. TBT (µg/L). f. MZ (µg/L). .....	24
Figura 8 Valores NOEC (mg/L) de cada uno de los microcontaminantes para la bacteria <i>V. fischeri</i> . .....	25
Figura 9 Gráficos de cajas y bigotes de la inhibición del crecimiento del alga <i>P.subcapitata</i> frente a los diferentes niveles de concentración de los cinco microcontaminantes y de la mezcla. a. CVF (mg/L). b. DCF (mg/L). c. PCP (µg/L). d. PFO (mg/L). e. TBT (µg/L). f. M (µg/L). .....	27
Figura 10 Valores NOEC (mg/L) de cada uno de los microcontaminantes para el alga <i>P. subcapitata</i> . .....	28
Figura 11 Diagrama de barras de Efecto frente a Concentración para <i>O.latipes</i> . a. CVF (mg/L). b. DCF (mg/L). .....	31
Figura 12 Gráficos de cajas y bigotes de la viabilidad celular de HEK frente a los diferentes niveles de concentración de los cinco microcontaminantes y de la mezcla. a. CVF (mg/L). b. DCF (mg/L). c. PCP (µg/L). d. PFO (mg/L). e. TBT (µg/L). f. MZ (µg/L). .....	35
Figura 13 Gráficos de cajas y bigotes de la viabilidad celular de N2a frente a los diferentes niveles de concentración de los cinco microcontaminantes y de la mezcla. a. CVF (mg/L). b. DCF (mg/L). c. PCP (µg/L). d. PFO (mg/L). e. TBT (µg/L). f. MZ (µg/L). .....	35
Figura 14 Valores NOEC (mg/L) de los microcontaminantes para las líneas celulares HEK (a) y N2a (b).....	36

## Índice de Tablas

Tabla 1 Principales características físico-químicas de clorfenvinfos (PUBCHEM, 2017). .....	4
Tabla 2 Principales características físico-químicas de diclofenaco (PUBCHEM, 2017).....	5
Tabla 3 Principales características físico-químicas de pentaclorofenol (PUBCHEM, 2017).....	6
Tabla 4 Principales características físico-químicas de PFO (PUBCHEM, 2017., EFSA, 2017). ....	7
Tabla 5 Principales características físico-químicas de terbutrina (PUBCHEM, 2017). .....	8
Tabla 6 Normas de calidad ambiental para sustancias prioritarias y otros contaminantes (Real Decreto 817/2015, de 11 de septiembre, ANEXO IV).....	10
Tabla 7 Concentraciones de los microcontaminantes utilizadas en el ensayo de toxicidad con <i>O. latipes</i> .....	18
Tabla 8 Parámetros utilizados en el cálculo del índice de riesgo de una emisión directa. ....	21
Tabla 9 Parámetros utilizados en el cálculo del índice de riesgo a escala local para un ambiente acuático ( $I_2$ ).....	21
Tabla 10 Parámetros relacionados con las propiedades físico-químicas necesarios para la ejecución del modelo predictivo PERPEST 3.0 [AMI databases (2017); Pesticides Properties DataBase (2017)]. .....	22
Tabla 11 Parámetros relacionados con la exposición ambiental necesarios para la ejecución del modelo predictivo PERPEST 3.0 [AMI databases (2017); Pesticides Properties DataBase (2017)]......	22
Tabla 12 Inhibición de la bioluminiscencia (%) de <i>V. fischeri</i> , expuesta a clorfenvinfos (mg/L). .....	23
Tabla 13 Inhibición de la bioluminiscencia (%) de <i>V. fischeri</i> , expuesta a diclofenaco (mg/L). .....	23
Tabla 14 Inhibición de la bioluminiscencia (%) de <i>V. fischeri</i> , expuesta a pentaclorofenol (mg/L). .....	23
Tabla 15 Inhibición de la bioluminiscencia (%) de <i>V. fischeri</i> , expuesta a perfluoroalquilo (mg/L). .....	24
Tabla 16 Inhibición de la bioluminiscencia (%) de <i>V. fischeri</i> , expuesta a terbutrina (mg/L)..	24
Tabla 17 Inhibición de la bioluminiscencia (%) de <i>V. fischeri</i> , expuesta a clorfenvinfos (mg/L). .....	24
Tabla 18 Valores $EC_{50}$ (mg/L) de cada uno de los microcontaminantes para la bacteria <i>V.</i> <i>Fischeri</i> , con sus intervalos de confianza al 95%. .....	25
Tabla 19 Inhibición del crecimiento (%) de <i>P. subcapitata</i> , expuesta a clorfenvinfos (mg/L).	26
Tabla 20 Inhibición del crecimiento (%) de <i>P. subcapitata</i> , expuesta a diclofenaco (mg/L) ..	26
Tabla 21 Inhibición del crecimiento (%) de <i>P. subcapitata</i> , expuesta a pentaclorofenol ( $\mu$ g/L). .....	26
Tabla 22 Inhibición del crecimiento (%) de <i>P. subcapitata</i> , expuesta a perfluoroalquilo (mg/L). .....	27
Tabla 23 Inhibición del crecimiento (%) de <i>P. subcapitata</i> , expuesta a TBT ( $\mu$ g/L).....	27
Tabla 24 Inhibición del crecimiento (%) de <i>P. subcapitata</i> , expuesta a mezcla ( $\mu$ g/L). .....	27
Tabla 25 Valores $EC_{50}$ (mg/L) de cada uno de los microcontaminantes para el alga <i>P.</i> <i>subcapitata</i> , con sus intervalos de confianza al 95%. .....	28

Tabla 26 Inhibición del crecimiento (%) de <i>P. subcapitata</i> expuesta a diferentes diluciones de las soluciones de ensayo.....	29
Tabla 27 Valores LID y MID para <i>P.subcapitata</i> expuesta a las muestras de ensayo. ....	30
Tabla 28 Efectos subletales observados en <i>O. latipes</i> , para diferentes concentraciones de los cinco microcontaminantes de estudio.....	32
Tabla 29 Valores LC <sub>50</sub> (mg/L) de cada uno de los microcontaminantes sobre el pez <i>O. latipes</i> . .....	33
Tabla 30 Viabilidad de la línea celular HEK (%) expuesta a clorfenvinfos, pentaclorofenol y terbutrina.....	33
Tabla 31 Viabilidad de la línea celular HEK (%) expuesta a diclofenaco, perfluoroalquilo y la mezcla. ....	34
Tabla 32 Viabilidad de la línea celular N2a (%) expuesta a clorfenvinfos, pentaclorofenol y terbutrina.....	34
Tabla 33 Viabilidad de la línea celular N2a (%) expuesta a diclofenaco, PFO y la mezcla.....	34
Tabla 34 Valores EC <sub>50</sub> (mg/L) de cada uno de los microcontaminantes para la línea HEK, con sus intervalos de confianza al 95%.....	36
Tabla 35 Valores EC <sub>50</sub> (mg/L) de cada uno de los microcontaminantes para la línea N2a, con sus intervalos de confianza al 95%.....	37

## 1. INTRODUCCI3N

### 1.1. PROBLEMÀTICA GENERAL DE LOS MICROCONTAMINANTES

Como bien es sabido, el agua salubre y fàcilmente accesible es indispensable para la salud pùblica, bien sea para su consumo, uso domèstico, producci3n de alimentos o fines recreativos. Sin embargo, se trata de un recurso natural limitado y cada vez màs deteriorado, resultado de la industrializaci3n. Este desarrollo industrial ha permitido el aumento de la producci3n de productos quìmicos, y por consiguiente, el incremento tambièn del nùmero de compuestos potencialmente peligrosos para el ambiente y la salud humana (Bolong *et al.*, 2009).

Durante los ùltimos aõos, los llamados contaminantes emergentes (o microcontaminantes), han ido despertando un considerable interès. Se trata de compuestos de origen y naturaleza quìmica diversa, cuya presencia y consecuencias, dadas las bajas concentraciones en las que se encuentran ( $\text{ngL}^{-1}$  a  $\mu\text{gL}^{-1}$ ), han pasado inadvertidos. Sin embargo, son considerados muy perjudiciales tanto para la salud humana, como para el medio ambiente, principalmente por causar efectos t3xicos a largo plazo, disrupci3n endocrina o bioacumulaci3n, entre otros (Virkutyte *et al.*, 2010).

Son considerados emergentes ya que muchos de ellos no se encuentran aùn regulados o estàn siendo actualmente sometidos a un proceso de regulaci3n (Barcel3, & L3pez de Alda, 2008). Los estudios acerca de los mismos son relativamente escasos y recientes, por lo que el conocimiento acerca del impacto que tiene su presencia sobre el medio ambiente y la salud humana, se encuentra todavìa en fase de desarrollo. Dichos compuestos pueden ser clasificados en seis grupos: compuestos bromados, parafinas cloradas, pesticidas polares, compuestos perfluorados, fàrmacos y productos de higiene personal y surfactantes (Virkutyte *et al.*, 2010).

El principal problema de estos microcontaminantes radica en la incapacidad que tenemos para eliminarlos a travès de las plantas de tratamiento de aguas residuales. Ello es debido a que éstas estàn diseõadas para eliminar materia a concentraciones superiores, del orden de  $\text{gL}^{-1}$ . Es por ello que estos compuestos, capaces de evadir su eliminaci3n con los tratamientos convencionales, consiguen encontrarse presentes en aguas superficiales, aguas subterràneas e incluso de consumo humano. A este problema ya constatado debe sumarse el hecho de que, la degradaci3n primaria de algunos de estos compuestos en plantas de tratamiento de aguas residuales, o incluso en el propio ambiente, genera a menudo productos, no solo màs persistentes, sino tambièn de mayor peligrosidad, pudiendo incluso producirse efectos sinèrgicos si los compuestos comparten mecanismos de actuaci3n similares, lo que aumenta aùn màs la alarma generada por los mismos (Giger *et al.*, 1984).

A esta alarma, ya constatada, hay que sumarle el cambio climàtico, ya que la escasez del agua, sumado a un crecimiento de la poblaci3n y a la urbanizaci3n, obliga a la poblaci3n a tener que reutilizar las aguas residuales con el fin de aumentar la vida ùtil de la misma. Pese al gran esfuerzo de desarrollar tratamientos de depuraci3n de aguas efectivos, son muchos los compuestos que

pueden evadir estos procesos. Por todo ello se constata la necesidad, no solo de establecer un reglamento de calidad del agua cada vez más exigente, que garanticen la salubridad del agua, sino también el desarrollo de líneas de investigación que dediquen sus esfuerzos en un intento de solventar la problemática actual. Todo ello resulta posible a través del estudio y la evaluación de los efectos, a corto y a largo plazo, en los ecosistemas expuestos a estos riesgos y con el firme objetivo de conseguir eliminar estos microcontaminantes del ambiente. Por ello, y de forma paralela, se están estudiando y desarrollando diversos tratamientos físico-químicos, tratamientos biológicos y procesos híbridos, que puedan implementarse en las plantas de tratamiento de aguas residuales (EDAR), para erradicar así su presencia y efectos no deseados sobre el ambiente y la salud humana. Un ejemplo de ello es el proceso foto-Fenton.

### **Proceso Foto-Fenton**

El reactivo de Fenton es una disolución acuosa de peróxido de hidrógeno e iones ferrosos que generan radicales hidroxilo, a partir de una reacción en cadena entre el ión de hierro y el peróxido. En la actualidad, se ha demostrado que empleando radiación UV o UV/visible, se consigue aumentar el poder oxidativo de esta reacción y con ello, la velocidad de degradación de compuestos orgánicos aumenta sustancialmente. Este proceso fotoquímico, pese a su elevado coste asociado al gran consumo de energía eléctrica que requiere, puede ser empleado de forma útil en el pretratamiento de aguas, ya que consigue aumentar la biodegradabilidad de las aguas contaminadas, y los intermediarios de la reacción generados pueden ser degradados mediante otros tratamientos. Por ello, este proceso de oxidación avanzada conocido como foto-Fenton, es considerado uno de los más prometedores para la depuración de aguas residuales, ya que son capaces de conseguir la degradación completa de contaminantes, con una efectividad superior a otros procesos (Neyens & Baeyens, 2003).

## **1.2. EMPLEO DE BIOENSAYOS DE TOXICIDAD PARA LA EVALUACIÓN DE RIESGOS MEDIOAMBIENTALES**

A partir de lo comentado anteriormente, se hace evidente la necesidad de estimar los riesgos derivados de un gran número de sustancias nocivas orgánicas e inorgánicas, tanto de origen natural como liberadas al ambiente producto de la actividad humana. Ello conduce al desarrollo de métodos de detección de dichas sustancias cada vez más sensibles y avanzados (Girotti, 2008). Así pues, en un intento de analizar los peligros ecotoxicológicos debido a la presencia de microcontaminantes en entornos acuáticos, los bioensayos se han convertido en una herramienta clave para este análisis. Los bioensayos (test ecotoxicológicos o biotests), se definen como métodos que emplean células vivas, tejidos, organismos o comunidades, para evaluar los efectos producidos por productos químicos, como consecuencia de la exposición de estos organismos a los mismos (Fent, 2013). Estos bioensayos, a su vez, pueden clasificarse en función de su campo de aplicación (condiciones de laboratorio o de campo), niveles de organización biológicas o duración de la exposición (Ratola *et al.*, 2012; Forbes & Forbes, 1993 ).

Años atrás, el impacto que tenían los compuestos liberados al entorno, derivados de la actividad humana, se evaluaban a partir de ensayos químicos y parámetros físicos (Tortorelli & Hernández, 1995). Algunas de las técnicas más comúnmente empleadas eran HPLC o gases-masas.

Sin embargo, estos métodos conllevaban una serie de costes de tiempo y dinero asociados, y además, la información que aportaban estos métodos se limitaba a determinar la concentración en la que se encontraban los compuestos pero no la toxicidad que producían. En cambio, los bioensayos son capaces de evaluar de forma integrada los potenciales efectos tóxicos de estas sustancias químicas, y el efecto que producen a corto o largo plazo en diferentes organismos, superando las limitaciones otros métodos de análisis, e indicando a tiempo real el impacto que tienen estos compuestos sobre un ecosistema determinado (Girotti, 2008).

Es importante destacar que los efectos pueden manifestarse a diferentes niveles, desde estructuras subcelulares o sistemas de enzimas, hasta organismos completos o poblaciones. Además, la toxicidad, entendida como la capacidad de una sustancia para ejercer un efecto nocivo sobre un organismo, depende no solo de sus propiedades químicas y su concentración, sino también de la duración y frecuencia de la exposición al tóxico y la relación con el organismo sobre el que causa el efecto. Por ello, los bioensayos son herramientas de diagnóstico capaces de medir y determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos, bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Con ello, se pueden determinar cambios en la fisiología, morfología o histología de los organismos, o efectos de inhibición, muerte, crecimiento, proliferación o multiplicación de los mismos. Todo ello resultado de las tensiones generadas por los compuestos tóxicos biológicos o químicos al entorno ((Pica Granados, 2004; Girotti, 2008). Por todo ello, en los últimos años se han realizado importantes esfuerzos en el desarrollo de procedimientos y protocolos para llevar a cabo estos bioensayos con diferentes especies, pertenecientes a distintos niveles tróficos, con el objetivo de dar información de estos contaminantes emergentes, de una forma reproducible, que permitan además realizar posteriores valoraciones del riesgo ambiental.

### 1.3. MICROCONTAMINANTES DE ESTUDIO

#### 1.3.1. Clorfenvinfos

El clorfenvinfos (CVF) es un compuesto organofosforado empleado comúnmente como insecticida y acaricida, cuya estructura queda detallada en la Figura 1. Es un producto obtenido por síntesis química que no se encuentra de forma natural en el medio ambiente. Desde su primer uso en 1963, este compuesto fue incluido en numerosos productos para el control de plagas domésticas como moscas o pulgas. Su efecto tóxico yace en ser un inhibidor de la colinesterasa organofosforado que afecta al sistema nervioso central, provocando daños en el mismo (EPA, 1998). Por ello, años más tarde, fue prohibido en varios países, incluyendo los Estados Unidos y la Unión Europea.

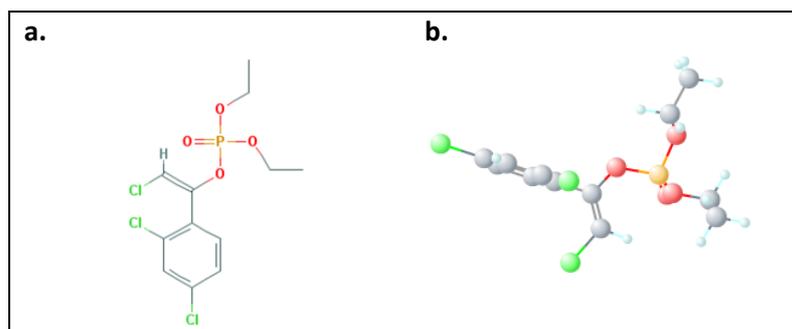


Figura 1. Estructura química de clorfenvinfos. a: Estructura 2D. b: Conformación 3D. (PUBCHEM, 2017)

El compuesto químico puro es un sólido incoloro, pero comercialmente se presenta como un líquido ámbar de leve aroma. Sus características físico-químicas principales quedan recogidas en la Tabla 1. Estas preparaciones comerciales contenían hasta un 90% de clorfenvinfos en su composición.

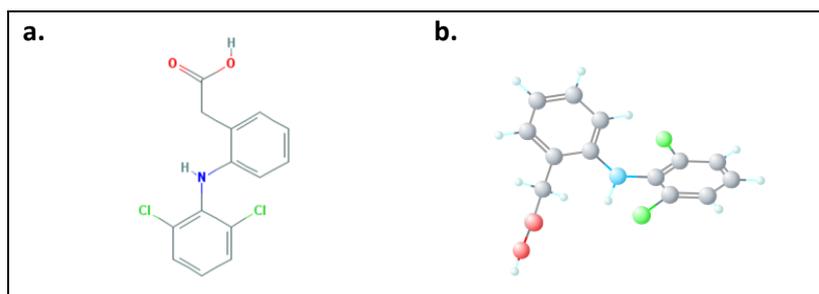
**Tabla 1** Principales características físico-químicas de clorfenvinfos (PUBCHEM, 2017).

<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P
<b>Peso molecular</b>	359.564 g/mol
<b>Nombre según la IUPAC</b>	[(E)-2-chloro-1-(2,4-dichlorophenyl)ethenyl] diethyl phosphate
<b>Punto de fusión</b>	De -19 a -23°C
<b>Punto de ebullición</b>	A 0.07kPa: 167-170°C
<b>Solubilidad</b>	Miscible en disolventes orgánicos comunes (ej: acetona, etanol, hexano). En agua, 124 mg/L a 20°C (PubMed)
<b>Densidad</b>	1.36 g/mL a 20°C (EPA, 1998)

El Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos GHS, por su acrónimo en inglés, lo cataloga como peligroso debido a su toxicidad aguda (GHS06) y a ser dañino para el medio ambiente (GHS09). Aunque su peligrosidad varía en función de las impurezas, aditivos u otros factores, estos efectos son constatados para compuestos que presentan valores porcentuales de clorfenvinfos superiores al 10%. Estos peligros se dan por diferentes vías de contacto como lo son su ingesta, el contacto con la piel o la inhalación. Además, el efecto tóxico para la vida acuática resulta fatal, con unos efectos nocivos y duraderos para los organismos que habitan en contacto con él (TOXNET, 2017). Además, la *Pesticide Properties Database* (2017), tiene registrados unos umbrales de importancia ecotoxicológicos calificados como moderado-alto, resultado de ensayos llevados a cabo en mamíferos, peces, invertebrados acuáticos, algas y lombrices.

### 1.3.2. Diclofenaco

El diclofenaco (DCF) es un derivado del ácido bencenoacético no esteroideo con actividad antiinflamatoria. Como fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), éste se une a las dos isoformas de ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2), bloqueando la conversión del ácido araquidónico en prostaglandinas pro-inflamatorias. Su estructura química queda detallada en la Figura 2. Este agente también puede inhibir la angiogénesis tumoral mediada por COX-2. Al inhibir la COX-2, el diclofenaco puede ser eficaz aliviando el dolor y la inflamación. Sin embargo, cuando inhibe la COX-1 puede producir efectos secundarios no deseados (PUBCHEM, 2017).



**Figura 2** Estructura química de diclofenaco. a: Estructura 2D. b: Conformación 3D. (PUBCHEM, 2017)

Su descripción física revela que es un sólido formado por cristales de éter. En lo referente a sus características físico-químicas, éstas aparecen resumidas en la Tabla 2.

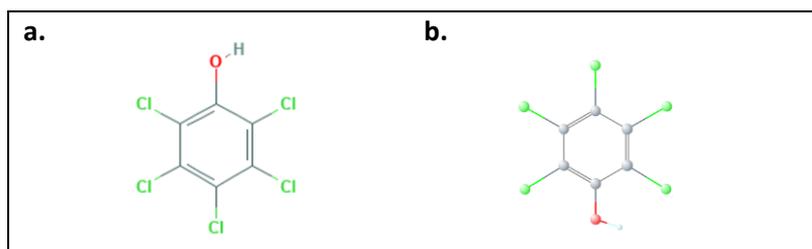
**Tabla 2** Principales características físico-químicas de diclofenaco (PUBCHEM, 2017).

<b>Fórmula molecular</b>	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$
<b>Peso molecular</b>	296.147 g/mol
<b>Nombre según la IUPAC</b>	2-[2-(2,6-dichloroanilino)phenyl]-acetic acid
<b>Punto de fusión</b>	De 283 a 285°C
<b>Constante de disociación ácida (pka)</b>	4.15
<b>Solubilidad</b>	En agua, 2.37 mg/L a 25°C ( <i>DrugBank</i> )

De entre los diferentes fármacos, los AINE, concretamente el diclofenaco, es una de las sustancias más comúnmente encontradas en el ambiente acuático. Tras su uso terapéutico en humanos, cerca del 15% es excretado sin cambios en su estructura (Landsdorp *et al.*, 1990). Como consecuencia, el diclofenaco o sus metabolitos, alcanzan el medio acuáticos a través de las aguas residuales domésticas (Stumpf *et al.*, 1996). Una vez en esta agua, la tasa de eliminación del diclofenaco durante los procesos de tratamiento de aguas residuales es del 69% aproximadamente (Ternet, 2001). Aún con ello, se han registrado valores de concentraciones en ríos y arroyos de 0.15  $\mu\text{g/L}$  (Ternes, 1998). Además, se ha visto que en organismos acuáticos, a menudo se dan respuestas agudas tóxicas a corto plazo y letalidad en plantas superiores y en peces (Feito & Catalá, 2012). También inducen, no solo efectos letales, si no cambios en su ciclo de vida, reproducción, crecimiento o deformidades anatómicas, que pueden alterar el comportamiento biológico e incluso, inducir su extinción (Jjemba, 2006).

### 1.3.3. Pentaclorofenol

El pentaclorofenol (PCP) es un compuesto organoclorado empleado como insecticida, pesticida, herbicida y desinfectante, que también se ha utilizado como conservante de madera. Se produjo por primera vez en la década de 1930, y es posible encontrarlo de dos formas: PCP en sí mismo o como sal de sodio de PCP, que se disuelve más fácilmente en agua. Su estructura química aparece detallada en la Figura 3.



**Figura 3** Estructura química de pentaclorofenol. a: Estructura 2D. b: Conformación 3D. (PUBCHEM, 2017)

Fue uno de los biocidas más utilizados en los Estados Unidos. Sin embargo, su uso está más restringido ya que actualmente no está disponible para público general. Sus principales características físico-químicas se recogen en la Tabla 3. Respecto a sus propiedades físicas, se trata de un sólido cristalino blanco, ligeramente soluble en agua.

**Tabla 3** Principales características físico-químicas de pentaclorofenol (PUBCHEM, 2017).

<b>Fórmula molecular</b>	$C_6HCl_5O$ ò $C_6Cl_5OH$
<b>Peso molecular</b>	266.323 g/mol
<b>Nombre según la IUPAC</b>	2,3,4,5,6-pentachlorophenol
<b>Punto de fusión</b>	174-191 °C
<b>Punto de ebullición</b>	309-310 °C
<b>Solubilidad</b>	Solubilidad en agua: 5 mg/L a 0°C; 14 mg/L a 20 °C; 35 mg/L a 50 °C; 85 mg/L a 70 °C. También en solventes orgánicos como acetona, benceno, isopropanol, etanol, metanol u otros.
<b>Densidad</b>	1.978 g/mL

La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos advierte de que el PCP se absorbe a través de la piel, el pulmón y el tracto gastrointestinal. En animales, la  $DL_{50}$  (dosis letal del 50% de los organismos) dermal es de la misma magnitud que la oral. En exposiciones agudas es rápidamente excretado, principalmente por la orina. Sin embargo, en exposiciones crónicas, la vida media del compuesto se prolonga hasta los 20 días. Esta larga vida media se atribuye a la baja excreción. Una gran fracción de PCP se fija a las proteínas de la sangre y se distribuye por todo el cuerpo, incluyendo los riñones y el corazón (EPA, 2015).

En lo referente a su incidencia sobre el medio ambiente, su presencia causa una elevada toxicidad en organismos acuáticos, causándoles alteraciones funcionales y daños severos sobre su salud, como consecuencia de un incremento del metabolismo oxidativo celular, resultado de un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Además, se trata de una sustancia acumulativa que puede llegar a afectar al ser humano a través de la cadena alimenticia (ECHA.EUROPA.EU, 2017).

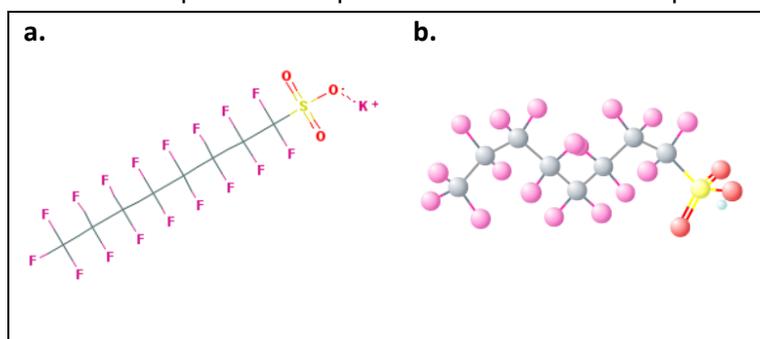
#### 1.3.4. PFO (heptadecafluorooctanesulfonic acid potassium salt)

Se trata de un contaminante perteneciente al grupo de los ácidos perfluoroalquílicos (PFAA) que ha pasado a convertirse en un compuesto con potencial efecto tóxico en una gran variedad de organismos (Midgett, 2015). Históricamente, este compuesto químico ha sido utilizado en una gran variedad de productos, entre los que destacan, tratamientos superficiales, producción de papel,

productos químicos de espumas contra incendios, abrillanadoras, películas fotográficas, dentaduras, champús, producto antimanchas o insecticidas (OECD, 2002.)

Los datos de seguimiento indican que la población general se encuentra expuesta a estos compuestos (variantes de ácidos perfluoroalquílicos, tales como PFO, PFOS o PFOA), a través del agua, la ingesta de pescado contaminado, o el contacto dérmico con productos que contienen estos compuestos químicos (EPA, 2013). En mayo de 2016 la US EPA (United States Environmental Protection Agency), tras varios ensayos, lanzó la alarma de la toxicidad que producen, y son muchos los estudios que se están llevando a cabo actualmente para esclarecer más información acerca de su peligrosidad (Tsuda, 2016).

Su estructura química, así como sus principales características físico-químicas quedan detallados en la Figura 4 y la Tabla 4, respectivamente. Sin embargo, y dado que el interés despertado por este compuesto resulta bastante reciente, son muchos los estudios que quedan por realizar, y mucha la información que aún falta por conocer sobre este compuesto.



**Figura 4** Estructura química de PFO. a: Estructura 2D. b: Conformación 3D. (PUBCHEM, 2017)

**Tabla 4** Principales características físico-químicas de PFO (PUBCHEM, 2017., EFSA, 2017).

<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>8</sub> F <sub>17</sub> KO <sub>3</sub> S
<b>Peso molecular</b>	538.216 g/mol
<b>Nombre según la IUPAC</b>	Potassium;1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-heptadecafluorooctane-1-sulfonate
<b>Punto de fusión</b>	277-280°C
<b>Punto de ebullición</b>	No calculado
<b>Solubilidad</b>	En agua, 512 mg/L a 20°C y 680 mg/L a 24-25°C.
<b>Densidad</b>	1.837 g/mL

### 1.3.5. Terbutrina

La terbutrina (TBT) es un compuesto de triazina que actúa como herbicida selectivo. Su estructura química queda recogida en la Figura 5. En lo referente a su modo de actuación, este compuesto es absorbido por las raíces y el follaje, y actúa como inhibidor de la fotosíntesis. Esto es debido a que su traslocación acrópeta en el xilema hace que se acumule en los meristemos apicales. Ahí actúa interfiriendo con la función clorofílica, ya que impide que se produzca la absorción de CO<sub>2</sub> y la reacción de Hill, e inhibe el transporte de electrones en el fotosistema II, especialmente en fase de germinación y en estado plántula. Además, destaca por ser altamente peligroso para los organismos

acuáticos (TOXNET, 2017). Se aplicación principal se da para el control selectivo de malezas de hoja ancha y gramíneas en caña de azúcar, cereales, cítricos, maíz y patata. Algunas de sus características físico-químicas quedan recogidas en la Tabla 5.

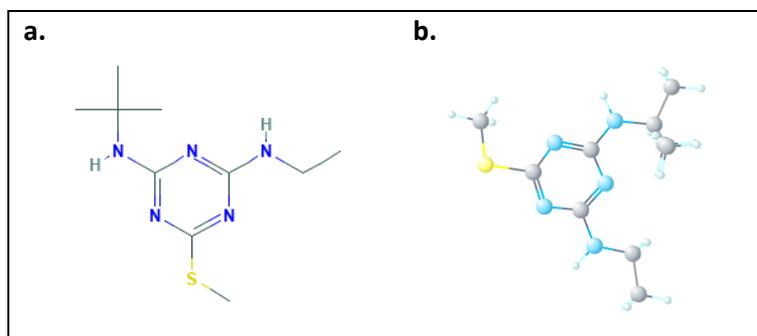


Figura 5 Estructura química de terbutrina. a: Estructura 2D. b: Conformación 3D. (PUBCHEM, 2017)

Tabla 5 Principales características físico-químicas de terbutrina (PUBCHEM, 2017).

<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> S
<b>Peso molecular</b>	241.357 g/mol
<b>Nombre según la IUPAC</b>	2-N-tert-butyl-4-N-ethyl-6-methylsulfanyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine
<b>Punto de fusión</b>	104 °C
<b>Punto de ebullición</b>	154-160 °C a 0.06 mmHg
<b>Solubilidad</b>	En agua, 25 mg/L a 20°C. Soluble también en disolventes orgánicos como acetona, hexano, n-octano, metanol o tolueno.
<b>Densidad</b>	1.115 g/mL a 20°C.

#### 1.4. UTILIZACIÓN DE BIOENSAYOS

Los ensayos de toxicidad o bioensayos, son procedimientos en los cuales se miden las respuestas de los organismos expuestos a una o varias sustancias, residuos o factores ambientales aislados o en combinación. Es decir, comprenden cualquier ensayo en el cual el poder o potencia del tóxico es medido a través de la respuesta de organismos vivos o sistemas vivientes (Ronco et al., 2004). Son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar los efectos de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba, bajo condiciones experimentales específicas y controladas en los cuales se controlan las condiciones bióticas (especie, edad) y abióticas (temperatura, humedad, intensidad lumínica, duración e intensidad de la exposición, composición físico-química del medio). Esta estandarización en el desarrollo de los experimentos permite, por una parte, poder fijar mejor los factores que influyen sobre la respuesta de los organismos y, por otra, poder comparar los resultados obtenidos entre diferentes poblaciones y laboratorios (Clément, 2006). Estos efectos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, evaluados por la reacción de los organismos, tales como muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos. Asimismo, los efectos pueden manifestarse a diferentes niveles, desde estructuras subcelulares o sistemas de enzimas, hasta organismos completos, poblaciones o comunidades. De esta manera, la toxicidad será la capacidad de una sustancia para ejercer un efecto nocivo sobre un organismo, y dependerá tanto de las propiedades químicas del compuesto como de su

concentración, según sea la duración y frecuencia de la exposición al tóxico, y su relación con el ciclo de vida del organismo.

Existen diferentes tipos de ensayos de toxicidad, como por ejemplo los ensayos de toxicidad aguda y de toxicidad crónica. En los primeros se utilizan dosis altas de la sustancia a analizar y tiempos de exposición cortos (24 - 96 horas), permitiendo valorar la toxicidad del compuesto así como hacer estudios comparativos. Por el contrario, los ensayos de toxicidad crónica evalúan parámetros relacionados con el ciclo de vida, crecimiento y reproducción, como son la supervivencia, duración de los diferentes estadios, tamaño y peso de las larvas, eclosión de las puestas, emergencia de adultos, entre otros. Para ello se emplean dosis bajas del compuesto y tiempos largos de exposición.

### 1.5. UTILIZACIÓN DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

El campo de la ecotoxicología investiga las diferentes respuestas de los organismos al estrés producido por la exposición a sustancias potencialmente peligrosas. Con los hallazgos obtenidos se pretende establecer una serie de parámetros e índices que miden dicha respuesta a la exposición del contaminante en cuestión. Con este fin, son muchas las investigaciones y estudios llevados a cabo, para desarrollar, establecer, estandarizar y validar ensayos tanto *in vivo* como *in vitro*, basados en biomarcadores.

Un biomarcador es una medición en un sistema biológico que refleja cuantitativamente la interacción con un agente. Los biomarcadores de exposición y efecto son empleados para evaluar la exposición, graduar los efectos de un determinado compuesto y monitorizar la posible recuperación (Jiménez, 2009), siendo considerablemente útil para detectar el impacto de la contaminación sobre la salud de los ecosistemas, en combinación con otras aproximaciones que evalúen la calidad del ambiente, como son los análisis químicos convencionales, los bioensayos o los estudios ecotoxicológicos a largo plazo (Cajaraville, *et al.*, 2000). En definitiva, un marcador ecotoxicológico se define como la variación bioquímica, fisiológica o del comportamiento, que puede ser medida en un tejido o fluido biológico, o a nivel de todo el organismo, que indica la exposición y/o efecto a uno o varios compuestos contaminantes (Depledge, 1994). Además, de entre sus características, destacan por ser reproducibles, sensibles, específicos, de amplio rango de aplicabilidad que incluye diversos taxones, sencillos y con una buena relación coste/efectividad (Cajaraville, *et al.*, 2000).

En el presente trabajo se pretende detectar los efectos tóxicos en la especie *Oryzias latipes*, en aquellos individuos recién eclosionados, antes de que se produzcan alteraciones fisiológicas importantes como la reproducción, el crecimiento o la muerte (Janssen *et al.*, 1993). Con ello, se podrán estimar y prever los riesgos a los que se encuentran sometidos por la exposición a estos contaminantes emergentes. En concreto, y para un mayor conocimiento de los microcontaminantes de estudio, en este trabajo se plantea el uso de dos enzimas para dicho análisis, la acetilcolinesterasa (AChE) y la lactato deshidrogenasa (LDH), como biomarcadores bioquímicos.

Para ello se realizará una determinación proteica por el método Bradford (Anexo I.1), para que los resultados de los ensayos enzimáticos puedan ser comparados posteriormente. De entre los ensayos enzimáticos llevados a cabo, el uso del enzima acetilcolinesterasa (AChE) resulta útil para

conocer si la función nerviosa se ha visto alterada por algún tratamiento estudiado (Anexo I.2). Por otro lado, el empleo de la enzima lactato deshidrogenasa servirá para conocer si el estrés químico induce un aumento de la glicólisis anaerobia (Anexo I.3).

## 1.6. EVALUACIÓN DEL RIESGO AMBIENTAL DEBIDO AL USO DE MICROCONTAMINANTES

Para evaluar el riesgo ambiental de la presencia de contaminantes es necesario integrar dos elementos esenciales: caracterización de la exposición y evaluación de efectos derivados de esa exposición. Se entiende por caracterización de la exposición y evaluación de los efectos, la estimación del tiempo y tipo de contacto entre el compuesto de estudio así como la entidad ecológica sobre la que se ensaya (EPA, 1998). Dicha información puede ser obtenida, bien a través de la recogida de datos representativos de los programas de monitorización de la contaminación, o a través de modelos matemáticos y programas informáticos que simulan la dispersión y distribución del contaminante de estudio. Estos modelos de estudio describen y simulan el transporte, la transformación y la distribución ambiental de las sustancias químicas peligrosas, liberadas al medio ambiente (Board, 1992).

### 1.6.1. Legislación para los 5 microcontaminantes

Atendiendo a las especificaciones del Real Decreto 817/2015, del 11 de septiembre, y las Directivas 2000/60/EC y 2008/105/EC, por las que se establecen los criterio de seguimiento y evaluación del estado de aguas superficiales y las normas de calidad ambiental, en la Tabla 6 se procede a detallar algunas de las normas de calidad para sustancias prioritarias y otros contaminantes, evaluadas en el presente trabajo.

**Tabla 6** Normas de calidad ambiental para sustancias prioritarias y otros contaminantes (Real Decreto 817/2015, de 11 de septiembre, ANEXO IV).

Nombre de la sustancia	Clase de la sustancia	NCA-MA Aguas superficiales continentales	NCA-MA Otras aguas superficiales	NCA-CMA Aguas superficiales continentales	NCA-CMA Otras aguas superficiales
Clorfenvinfós <sup>1</sup>	Prioritaria	0.1	0.1	0.3	0.3
Pentaclorofenol <sup>1</sup>	Prioritaria	0.4	0.4	1	1
Derivados de PFOS <sup>1</sup>	Peligrosa prioritaria	6.5E <sup>-4</sup>	1.3E <sup>-4</sup>	36	7.2
Terbutrina <sup>1</sup>	Prioritaria	0.065	0.0065	0.34	0.034
Diclofenaco <sup>2</sup>	Prioritaria	0.1	0.01	No aplicable	No aplicable

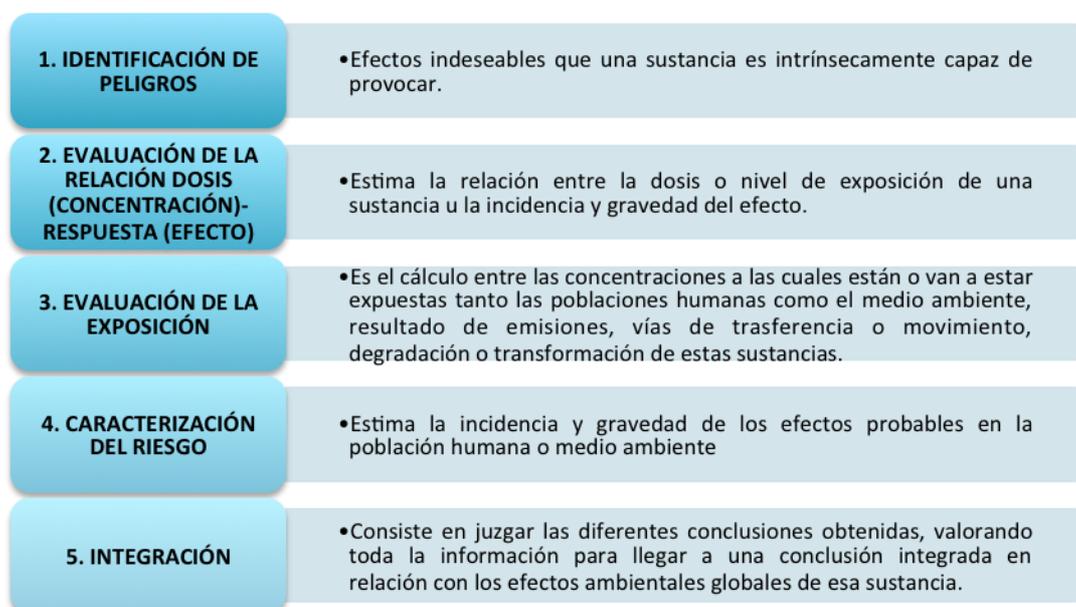
MA: Media anual. CMA: Concentración máxima admisible. NCA: Normas de calidad del agua. Unidades: µg/L para las NCA-MA y NCA-CMA en aguas, y µg/kg de peso húmedo para NCA en biota. En caso de que NCA-CMA esté marcada como "no aplicable", se considera que los valores de contaminación a corto plazo en descargas continuas son significativamente inferiores a los valores derivados de la toxicidad aguda.

<sup>1</sup>: Normas de calidad ambiental para sustancias prioritarias y otros contaminantes (Real Decreto 817/2015, de 11 de septiembre, ANEXO IV).

<sup>2</sup>: Normas de calidad ambiental para sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas (Directivas 2000/60/EC y 2008/105/EC).

### 1.6.2. Evaluación y caracterización del riesgo por el cociente PEC/PNEC según la directriz DOCE NºL 161/9 (1994)

Según la Directiva 93/67/CEE de la comisión de 20 de julio de 1993, *artículo 5*, y tras una primera etapa de evaluación para la identificación de peligros, se procede a evaluar su peligrosidad, con arreglo a las directrices que marca el Anexo III, a través de las etapas que quedan reflejadas en la Figura 6. También pasan a detallarse los aspectos más relevantes en lo referente a la evaluación del riesgo y la caracterización del mismo, comprendidas entre las fases dos y cuatro.



**Figura 6** Principios generales de evaluación de riesgos de las sustancias para el medio ambiente, según el artículo 5 de la Directiva 67/548/CEE.

**FASE 2: Evaluación de la relación dosis (concentración)-respuesta (efecto) (PNEC):** Tras una identificación previa de los peligros, se procede a predecir la concentración de la sustancia por debajo de la cual no se esperan efectos adversos en el compartimento ambiental del que se trate. Esta concentración es conocida como concentración prevista sin efecto (PNEC). Su valor se calcula aplicando un factor de evaluación a los valores resultantes de los ensayos en organismos, que bien pueden ser LD50 (dosis letal 50), LC50 (concentración letal media), EC50 (concentración efectiva media), IC50 (concentración que produce el 50% de la inhibición de un parámetro dado), NOEL ò NOEC (nivel/concentración sin efecto observado) o LOEL o LOEC (nivel/concentración con mínimo efecto observado). El factor de evaluación, según la EPA y la OECD, es una expresión del grado de incertidumbre en la extrapolación de los datos de un ensayo en un número limitado de especies, al medio ambiente real. Por ello, en general, cuanto más amplios sean los datos y mayor la duración de los ensayos, menor será el grado de incertidumbre y con ello, la magnitud del factor de evaluación.

**FASE 3: Evaluación de la exposición (PEC):** El objetivo en esta fase es el de predecir la concentración de la sustancia que se encontrará finalmente en el medio ambiente. Dicha concentración es conocida como PEC (concentración ambiental prevista). Este valor es necesario determinarlo en aquellos casos

en los que existen emisiones, vertidos, eliminaciones o distribuciones, que son razonablemente previsibles.

*FASE 4: Caracterización del riesgo (PEC/PNEC):* En cada compartimento ambiental dado, la caracterización del riesgo lleva asociada una comparación de la PEC con la PNEC, en la medida de lo posible, para obtener el cociente PEC/PNEC. Si esta relación es  $\leq 1$ , no se requerirán más estudios sobre el compuesto. En cambio, si el cociente es  $>1$ , los datos recogidos hasta el momento no son suficientes, por lo que resulta necesario obtener más información para realizar una correcta valoración del riesgo ambiental de la sustancia. Finalmente, y tras esta etapa, se procedería a integrar toda la información que se tiene al respecto de la sustancia en cuestión para elaborar una conclusión global con los efectos ambientales de ese compuesto.

### **1.6.3. Índices de riesgo para una emisión directa y escala local según el modelo de Vighi y Calamari (1996)**

El resultado de una compleja evaluación ecotoxicológica, es a menudo difícil de expresar en términos simples e inequívocos de fácil comprensión e interpretación. Normalmente, la evaluación concluyente puede ser diferente en función de numerosas variables. Por consiguiente, frente a la pregunta: ¿la sustancia X es peligrosa para el ambiente?, en muchos casos la respuesta no podrá ser sí o no, deberá ser depende. Una respuesta similar puede no ser suficiente para algunas sustancias potencialmente peligrosas que requieren una evaluación del riesgo más aproximada, expresada en términos cuantitativos fácilmente interpretables.

Para responder a esta exigencia se han desarrollado sistemas integrados de clasificación, cuyo objetivo es expresar el riesgo en términos cuantitativos. Estos sistemas tienen en cuenta las diferentes propiedades de una sustancia que pueden contribuir a determinar el riesgo y se atribuyen a cada una de sus propiedades una puntuación en relación a los respectivos niveles de actividad. Las puntuaciones relativas a las diferentes propiedades se asocian después mediante un algoritmo que proporciona como resultado un índice numérico.

El modelo de Vighi y Calamari (1996) contempla diversos niveles de operación para la valoración del riesgo ambiental que incluyen diferentes escalas espaciales y temporales: riesgo inmediato de emisiones directas, riesgo a escala local y riesgo a escala global. El riesgo a escala local se refiere al impacto en un espacio de tiempo relativamente largo. La extensión del área de estudio debe ser evaluada en función de las características y dimensiones del estudio que se pretenda realizar. El riesgo a escala global se refiere al impacto de un contaminante sobre el medio ambiente en un periodo de tiempo muy amplio.

La valoración del índice de riesgo según estos autores comprende tres fases: atribución de valores a los diferentes parámetros usados para la valoración según la importancia de los mismos sobre el valor final, atribución de un intervalo de valores a cada parámetro y cálculo de los algoritmos definitivos para obtener el valor final.

#### 1.6.4. Modelo informático de predicción y evaluación de niveles de riesgo medioambientales en organismos acuáticos: modelo PERPEST 3.0

PERPEST es un modelo informático que tiene como finalidad predecir los riesgos ecológicos de los plaguicidas en ecosistemas acuáticos. Se encarga además de predecir, simultáneamente, los efectos de un compuesto a una determinada concentración en varios puntos finales de la comunidad afectada. Dicho método utiliza un modelo conocido como Case-Base Reasoning, cuyo objetivo es resolver nuevos problemas usando como referencia experiencias anteriores (WUR, 2017).

A diferencia de otros modelos encargados de predecir efectos, PERPEST se basa en datos empíricos extraídos de la literatura. Por ello, es un modelo basado en casos estudiados y revisados en profundidad, capaz de dar salida a nuevos análisis. A partir de dicha revisión, se evalúan los efectos producidos en las diferentes especies pertenecientes al ecosistema afectado en cuestión, y se clasifica de acuerdo a su magnitud y duración. Con ello, PERPEST es capaz de buscar situaciones análogas, en diferentes bases de datos, y a partir de una serie de datos que le proporciona al programa, éste te devuelve como resultado los posibles efectos relevantes (toxicidad) del compuesto que pretendes analizar en las especies expuestas al mismo (Van den Brick, *et al.*, 2002).

## 2. OBJETIVOS

Los objetivos planteados para el presente trabajo han sido:

- I. Determinar la toxicidad de los microcontaminantes clorfenvinfos, diclofenaco, pentaclorofenol, perfluoroalquilo y terbutrina en cuatro sistemas modelo (*Vibrio fischeri*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Oryzias latipes* y las líneas celulares HEK y N2a).
- II. Estudiar los efectos subletales de estos compuestos en embriones del pez *Oryzias latipes* mediante biomarcadores bioquímicos.
- III. Evaluar la eficacia del tratamiento de oxidación avanzada foto-Fenton en la detoxificación de soluciones acuosas fortificadas con los cinco microcontaminantes utilizando el alga *P. subcapitata* como sistema modelo.
- IV. Evaluar el riesgo ecotoxicológico asociado a dichos microcontaminantes en ecosistemas acuáticos.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se ha realizado en el laboratorio de Ecotoxicología del Departamento de Biotecnología de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Natural (ETSIAMN).

#### 3.1. COMPUESTOS DE ENSAYO

Los microcontaminantes clorfenvinfos, diclofenaco, pentaclorofenol, perfluoroalquilo y terbutrina han sido suministrados por Sigma-Aldrich. Para cada ensayo se preparó una disolución madre de cada uno de los compuestos. Debido a problemas de solubilidad de estos compuestos en soluciones acuosas, todas las disoluciones preparadas fueron sonicadas (Sonicador Branson Heat Systems Ultrasonics Sonicator Cell Disruptor W-225R). Los reactivos utilizados en la determinación de las actividades enzimáticas han sido suministrados por Sigma-Aldrich .

Además de los cinco compuestos puros y su mezcla, también fueron analizadas, soluciones acuosas fortificadas con los cinco microcontaminantes, a una concentración de 1 mg/L y sometidas a un proceso de oxidación avanzada (foto-Fenton) durante diferentes tiempos (0, 15, 30 y 360 min), con el fin de evaluar la eficacia del tratamiento en la detoxificación de las muestras. El tratamiento foto-Fenton fue realizado en el laboratorio de Química del Departamento de Ingeniería Textil y Papelera de la Escuela Politécnica Superior de Alcoy. Se estudió el efecto de estas soluciones tratadas mediante foto-Fenton sobre diferentes organismos pero, en este trabajo, solo se describe el ensayo realizado con el alga *P.subcapitata*.

#### 3.2. ORGANISMOS DE ENSAYO

Se han seleccionado cuatro organismos pertenecientes a diferentes niveles tróficos: la bacteria marina bioluminiscente *Vibrio fischeri* (ANEXO II.1), el alga unicelular *Pseudokirchneriella subcapitata* (ANEXO II.2), el pez de agua dulce *Oryzias latipes* (ANEXO II.3) y dos líneas celulares de mamíferos (HEK y N2a; ANEXO II.4). *P. subcapitata* fue suministrada por la empresa ECOTest S.L. (AlgalToxkit), *V. fischeri* (cepa NRRL-B-11177) fue suministrada por Fisher, *O. latipes* procede de la empresa DNATEcosistemas y las líneas celulares fueron cedidas por el Instituto de Biomedicina de Valencia.

#### 3.3. EQUIPOS EMPLEADOS.

Los equipos empleados en la realización de este trabajo de investigación han sido un Lector de microplacas (TECAN Infinite M200), una cámara climatizada (Versatil Environmental Test Chamber SANYO MLR-350), un sonicador (Branson Heat Systems Ultrasonics Sonicator Cell Disruptor W-225R), una campana de flujo laminar, una incubadora y una lupa binocular (motic smz-140).

### 3.4. ENSAYOS DE TOXICIDAD

#### 3.4.1. Ensayo de toxicidad con la bacteria *Vibrio fischeri*

La evaluación de la toxicidad de soluciones acuosas con diferentes concentraciones de los microcontaminantes sobre *V. fischeri* se ha realizado según el protocolo UNE-EN ISO 11348-3:2009, adaptado a microplaca. El objetivo del ensayo es determinar la inhibición de la bioluminiscencia de la bacteria expuesta a las muestras, durante 30 min.

El ensayo se ha realizado en microplacas de 96 pocillos blancas de fondo plano (Costar, Corning Inc., New York, USA). Cada placa consta de cuatro réplicas del control positivo 1 (20% solución bacteriana), cuatro réplicas del control positivo 2 (50% solución bacteriana), cuatro réplicas de cada dilución de la muestra (solución bacteriana, diluyente y muestras de ensayo) y cuatro réplicas del control negativo (diluyente). El diluyente se prepara con agua destilada y cloruro de sodio (20%) y la solución bacteriana se prepara con las bacterias liofilizadas y el diluyente. Las concentraciones de las soluciones madre de los microcontaminantes de estudio han sido: 22.3 mg/L clorfenvinfos, 172.0 mg/L diclofenaco, 0.90 mg/L pentaclorofenol, 40.0 mg/L perfluoroalquilo, 20.0 mg/L terbutrina y 0.80 mg/L mezcla. Las diluciones ensayadas de cada muestra han sido 1:1.25, 1:2, 1:3, 1:4, 1:6, 1:8, 1:12; 1:16, 1:24 y 1:32.

Las placas se llenaron con el módulo inyector del lector de microplacas Tecan Infinite M200. En primer lugar, se llena una microplaca con los controles negativos y las diluciones de los microcontaminantes, se realiza una medida de la luminiscencia (blancos) y se guarda a 15°C. El volumen final en la primera placa es 100 µL/pocillo. A continuación, se llena una segunda placa con la solución bacteriana utilizando una pipeta multicanal, se incuba durante 15 minutos a 15°C y se lee la luminiscencia en el lector de microplacas. El volumen final en la segunda placa es 100 µL/pocillo. Inmediatamente se transfiere el contenido de la primera placa a la segunda con la pipeta multicanal y se incuba ésta última placa a 15°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se mide de nuevo la luminiscencia. Los resultados obtenidos fueron procesados de acuerdo a la normativa UNE-EN ISO 11348-3 (Anexo III.1).

#### 3.4.2. Ensayo de toxicidad con el alga *Pseudokirchneriella subcapitata*

La evaluación de la toxicidad de soluciones acuosas con diferentes concentraciones de los microcontaminantes sobre *P. subcapitata* se ha llevado a cabo de acuerdo a la normativa UNE-EN ISO 8692:2004, adaptada a microplaca. El objetivo del ensayo es determinar la inhibición del desarrollo del alga expuesta a diferentes diluciones de las muestras, durante 72 horas.

El ensayo se realizó en microplacas de 96 pocillos transparentes de fondo plano (Costar, Corning Inc., New York, USA). Cada ensayo consta de dieciséis réplicas del control positivo (medio de cultivo y algas), ocho réplicas de cada dilución de la muestra (medio de cultivo, algas y muestras de ensayo) y ocho blancos (medio de cultivo). Las concentraciones de las soluciones madre de los microcontaminantes de estudio han sido: 20.0 mg/L clorfenvinfos, 0.005 mg/L diclofenaco, 50.0 mg/L pentaclorofenol, 0.001 mg/L perfluoroalquilo, 5.0 mg/L terbutrina y 0.025 mg/L mezcla. Las diluciones ensayadas a partir de la solución madre han sido 1:1.25, 1:2, 1:3, 1:4, 1:6, 1:8, 1:12; 1:16 y 1:24.

Las placas se llenaron con el módulo inyector del lector de microplacas Tecan Infinite M200. En primer lugar se llena la microplaca con todas las soluciones de ensayo, se inoculan los pocillos correspondientes con 30  $\mu\text{L}$  de una suspensión madre de algas y 30  $\mu\text{L}$  de una solución madre del medio de cultivo BBM (Bold's Basal Medium). El volumen final de ensayo ha sido 300  $\mu\text{L}$ /pocillo y la concentración de células  $10^4$  células/mL. A continuación, se introduce en una bolsa de plástico transparente que se sella y se satura con  $\text{CO}_2$  (Zamora, 2006). Las microplacas se incuban en la cámara climatizada, a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , bajo iluminación continua (6000-10000 lux). El parámetro seleccionado para la medida del crecimiento del alga ha sido la fluorescencia del contenido *in vivo* de clorofila, a 430 nm y 663 nm como longitudes de onda de excitación y emisión, respectivamente. La fluorescencia se mide cada 24 horas. Todos los datos de fluorescencia se transforman en valores de concentración celular y, a partir de estos valores se determinan los porcentajes de inhibición, según normativa. Los resultados de fluorescencia obtenidos fueron procesados siguiendo las directrices que marca la normativa UNE-EN ISO 8692 (Anexo III.2).

### 3.4.3. Ensayo de toxicidad con el pez *Oryzias latipes*

Para realizar este ensayo, individuos adultos de entre 3 y 6 meses de edad (2-4 cm de longitud) de *O. latipes*, más comúnmente conocido como Medaka, fueron separados acorde a su sexo en dos acuarios, provistos de oxigenación y un filtro para garantizar las condiciones óptimas de desarrollo, a una temperatura de  $\sim 24^\circ\text{C}$ , un fotoperiodo natural de 12 horas Luz: 12 horas Oscuridad, respetando la relación de 1L de agua por individuo.

El ensayo se ha realizado según la normativa OECD/OECD 236 (2013) y UNE-EN ISO 15088:2009. Esta normativa se refiere a la especie *Danio rerio*, que es la especie estándar para este tipo de ensayos, por lo que ha sido necesario adaptar las condiciones de temperatura, fotoperiodo, tiempo del ensayo y duración del desarrollo embrionario para Medaka. Estas especificaciones para la especie *O. latipes* aparecen detalladas en el Anexo IV, extraído del protocolo OECD/OECD 212 (1998).

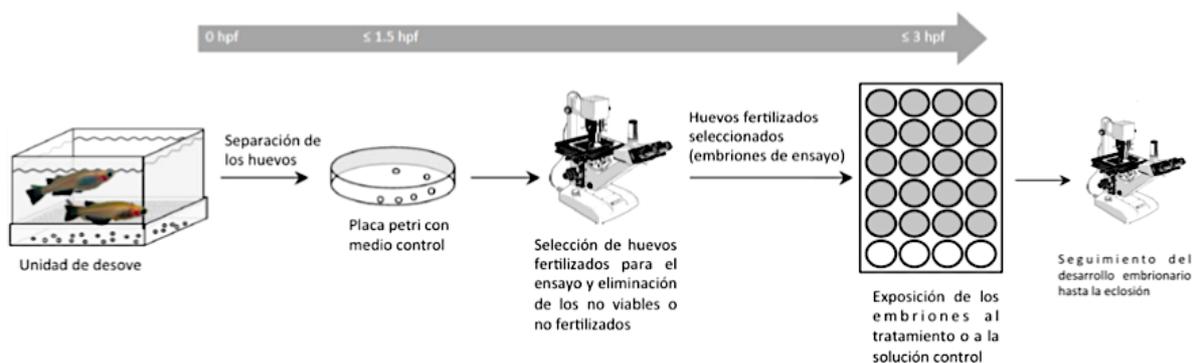
Para la obtención de los embriones se formaban varias parejas de individuos. Cada pareja se introducía en acuarios de 35 x 17 x 25 cm. En cada acuario se separaba el macho de la hembra mediante un vidrio que impedía el contacto entre ellos pero no la circulación del agua. El volumen total de agua en cada acuario fue de 2 L y se añadían 100  $\mu\text{L}$  de azul de metileno para evitar la contaminación de los embriones por hongos y bacterias. En estas condiciones se mantenían durante 72 horas, tras las cuales, se quitaba el vidrio que los separaba dejando cada pareja en contacto durante 1-3 horas para facilitar la puesta de huevos y la fecundación de los mismos. La puesta, normalmente en esta especie queda unida a la hembra mediante una red filamentosa que hay que separar mecánicamente sobre una superficie de papel humedecido realizando movimientos circulares suaves con los dedos. Con ayuda de una lupa binocular se revisaban los embriones descartando los inviables.

Este ensayo se ha realizado en microplacas de 96 pocillos transparentes de fondo plano (Costar, Corning Inc., New York, USA). Cada ensayo consta de 8 réplicas del control positivo (medio de cultivo) y 8 réplicas de cada dilución de la muestra (medio de cultivo y muestras de ensayo). Las concentraciones ensayadas se exponen en la Tabla 7. En cada pocillo se depositaba un embrión y el volumen final de ensayo ha sido 200  $\mu\text{L}$ /pocillo. El medio de cultivo contiene 294 mg/L de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 123.3 mg/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 63 mg/L  $\text{NaHCO}_3$  y 5 mg/L de KCl.

**Tabla 7** Concentraciones de los microcontaminantes utilizadas en el ensayo de toxicidad con *O. latipes*.

Compuesto	Concentración (mg/L)
CVF	0.005, 0.02, 0.04, 1 y 10
DCF (mg/L)	2.5, 5, 10, 40, 80 y 160.
PCP	0.025, 0.4, 14, 20 y 30
PFO	2, 10, 32.5, 50, 62.5 y 125
TBT	5, 15, 25.0 y 30.0

Los embriones se incuban en la cámara climatizada, a  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ , con un fotoperiodo 12/12, durante 8-10 días hasta su eclosión (Iwamatsu, 2004). Durante este tiempo se observa el desarrollo embrionario de los individuos expuestos a cada microcontaminante y concentración ensayada, con una lupa binocular. En la Figura 6 se recogen las diferentes etapas del proceso general llevado a cabo en el presente ensayo.


**Figura 6** Esquema del ensayo de toxicidad con embriones de *O. latipes*. Adaptado de "OECD Guidelines for the testing of chemicals. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) test" (2013).

A partir de los resultados obtenidos, se procedió a calcular el porcentaje de supervivencia de los embriones expuestos a cada compuesto y concentración de ensayo con respecto a los controles, y a analizar los efectos subletales observados durante el desarrollo embrionario.

#### 3.4.4. Ensayo de toxicidad con las líneas celulares HEK y N2a.

El objetivo del ensayo de citotoxicidad es determinar la viabilidad celular de las líneas HEK y N2a expuestas a diferentes diluciones de las muestras, durante 24 horas (Rampersad, 2012).

Para el mantenimiento de las células y para el ensayo de citotoxicidad se utilizó el medio DMEM (4,5 g de D-glucosa/L) suplementado con 20% de suero fetal bovino, 2% de penicilina/estreptomina y 1% de L-glutamina. En todos los casos las células crecieron en un incubador, a  $37^{\circ}\text{C}$  y en una atmósfera con 5% de  $\text{CO}_2$ . Todos los pasos descritos a continuación se realizaron en condiciones de esterilidad, en cabina de flujo laminar. Antes de iniciar el ensayo de citotoxicidad se prepararon, en primer lugar, los subcultivos de las células en placas Petri tratadas, se dejaron crecer en el incubador y cuando alcanzaron la subconfluencia se tripsinizaron con el fin de preparar una suspensión celular de  $1 \cdot 10^5$  células/mL. Las concentraciones de las soluciones madre de

los microcontaminantes de estudio para el ensayo con las líneas HEK y N2a han sido: 1000 mg/L clorfenvinfos, 10000 mg/L diclofenaco, 1000 mg/L pentaclorofenol, 680 mg/L perfluoroalquilo, 1000 mg/L terbutrina y 250 mg/L mezcla. Las diluciones ensayadas a partir de la solución madre han sido (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 y 1:1024); estas diluciones se prepararon en metanol. El ensayo de citotoxicidad se realizó en placas transparentes de fondo plano (VWR Tissue Culture Plates) de 96 pocillos. Cada pocillo se llenó con 100  $\mu$ L de la suspensión celular, excepto los pocillos de la primera columna que se llenaron con 100  $\mu$ L de PBS (control negativo). Después de 24 horas de incubación se añadió, a cada pocillo, 5  $\mu$ L de la dilución correspondiente; se realizaron cuatro réplicas del control positivo, cuatro réplicas de cada una de las diluciones y cuatro réplicas con 5  $\mu$ L de metanol. Se incubaron las placas otras 24 horas y después de este tiempo se añadieron 30  $\mu$ L de una solución 6.6  $\mu$ M de resazurin. Finalmente, se incubaron las placas durante 3 horas y se midió la fluorescencia (Ex560/Em590) en el lector multifuncional Tecan Infinite M200. Con los datos de fluorescencia obtenidos se calcularon los porcentajes de viabilidad celular, tomando como referencia el crecimiento de los controles, con un 100% de viabilidad.

#### 3.4.5. Análisis de los resultados obtenidos.

Los datos obtenidos en cada ensayo de toxicidad se han analizado mediante ANOVA para determinar diferencias significativas entre los diferentes niveles de concentración y los controles, y para calcular los valores NOEC (máxima concentración ensayada sin efecto) o LID (mínima dilución sin efecto) (Statgraphics Plus v. 5.1).

Para el cálculo de los valores  $EC_{50}$  (concentración que produce un 50% de respuesta) o MID (dilución que produce un 50% de respuesta) y sus intervalos de confianza al 95%, se ha realizado un análisis Probit utilizando el programa estadístico SPSS (v. 16.0).

### 3.5. ANÁLISIS DE BIOMARCADORES EN EMBRIONES DE *Oryzias latipes* EXPUESTOS A LOS CINCO MICROCONTAMINANTES.

#### 3.5.1. Preparación de las muestras.

Se tomaron los individuos de *O. latipes* recién eclosionados que sobrevivieron a la exposición de cada microcontaminante, y se depositaron en un eppendorf de 1.5 mL. Se lavaron con 100  $\mu$ L de PBS para eliminar los restos del microcontaminante y se añadió un volumen de 400  $\mu$ L de PBS. Las muestras fueron trituradas con un homogeneizador manual y centrifugadas a 8000 rpm, durante 15 minutos, a 4°C. A continuación se recogió el sobrenadante y se procedió al análisis de los biomarcadores de interés (AChE, LDH y GST). Todos los pasos se realizaron sobre hielo.

#### 3.5.2. Proteínas totales.

La determinación de las proteínas totales se ha realizado en microplacas de 96 pocillos transparentes de fondo plano (Costar, Corning Inc., New York, USA), siguiendo el método de Bradford (Bradford, 1976). Los reactivos utilizados han sido: reactivo Bradford, PBS y patrón de globulinas bovinas a 1 mg/mL. En primer lugar se prepararon diferentes diluciones de las globulinas bovinas (0.0, 0.2, 0.5 y 1.0 mg/mL) con agua Mili-Q. La microplaca se llenó con 10  $\mu$ L de cada dilución

de globulinas bovines y 10 µL de las muestras (sobrenadante obtenido en el apartado anterior). Se realizaron cuatro réplicas de cada una de las soluciones de ensayo. A cada pocillo se le añadieron 250 µL del reactivo Bradford y se incubó la placa 15 min a temperatura ambiente, en oscuridad. Finalmente, se midió la absorbancia en el lector de microplacas, a 595 nm. Se realizó la curva patrón Absorbancia/Concentración de proteína y se determinó el contenido medio de la concentración de proteínas de las muestras.

### 3.5.3. Actividades enzimáticas

La determinación de la actividad acetilcolinesterasa (AChE) se ha realizado en microplacas de 96 pocillos transparentes de fondo plano (Costar, Corning Inc., New York, USA), siguiendo el método de Ellman (Ellman *et al.*, 1961). Los reactivos utilizados han sido: PBS, Acetilcolina 0,075 M en agua Mili-Q, solución de DTNB 10 nM en PBS, solución de reacción (30 mL de PBS + 0.2 mL de acetilcolina y 1 mL de DTNB). La microplaca se llenó con 50 µL de las muestras y 50 µL de PBS. Se realizaron dos réplicas de cada una de las soluciones de ensayo. A cada pocillo se le añadieron 250 µL de la solución de reacción, se incubó la placa durante 5 min a temperatura ambiente y se midió la actividad enzimática en el lector de microplacas, a 414 nm, cada 20 segundos durante 5 min.

La determinación de la actividad Lactato Deshidrogenasa (LDH) se ha realizado en microplacas de 96 pocillos transparentes de fondo plano (Costar, Corning Inc., New York, USA), siguiendo el método de Herbert (Herbert *et al.*, 1995). Los reactivos utilizados han sido: tampón (Imidazol 65 mM y Piruvato 65 mM) y sustrato (NADH 0.18 mM), solución de reacción (4 volúmenes de tampón y 1 volumen de sustrato). La microplaca se llenó con 50 µL de las muestras y 50 µL de PBS. Se realizaron dos réplicas de cada una de las soluciones de ensayo. A cada pocillo se le añadieron 250 µL de la solución de reacción, se incubó la placa durante 1 min a temperatura ambiente y se midió la actividad enzimática en el lector de microplacas, a 340 nm, cada 50 segundos durante 10 min.

El cálculo de las actividades enzimáticas AChE y LDH, se realizó a partir de la siguiente ecuación.

$$\text{Actividad enzimática (nmol/min ml)} = \text{Abs/min} \times (1/l) \times (Vt/Vm) \times (1/d) \quad (1)$$

Donde,

$\Delta$  Abs/min: pendiente de la recta Abs/ tiempo

$\epsilon$  = coeficiente de extinción del ácido tionitrobenzoico =  $1,36 \times 10^{-2}$  mL /nmol cm (AChE); coeficiente de extinción del NADH =  $6,3 \times 10^{-3}$  mL /nmol cm (LDH).

Vt = volumen total de reacción en el pocillo (µL).

Vm = volumen de la muestra en el pocillo (µL).

d= paso de luz (1 cm).

La actividad enzimática se ha calculado en función del contenido en proteínas de cada muestra y se ha estandarizado a un contenido de 1 mg/mL.

### 3.6. EVALUACIÓN DEL RIESGO AMBIENTAL: CÁLCULO DEL COCIENTE PEC/PNEC SEGÚN LA DIRECTRIZ DOCE Nº 161/9 (1994)

Para la caracterización del riesgo según la Directriz DOCE NºL 161/9 (1994), se han utilizado como valores PNEC los parámetros EC<sub>50</sub>, LC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub>, obtenidos experimentalmente en este trabajo, en los ensayos de toxicidad, a los que se les ha aplicado un factor de incertidumbre de 1000.

En cuanto a los valores PEC se han utilizado los datos de monitoreo registrados en el del Real Decreto 817/2015, del 11 de septiembre, y en las Directivas 2000/60/EC y 2008/105/EC, donde se informa de la concentración media anual de un gran número de microcontaminantes en las aguas superficiales.

### 3.7. EVALUACIÓN DEL RIESGO AMBIENTAL: CÁLCULO DEL COCIENTE PEC/PNEC SEGÚN LA DIRECTRIZ DOCE Nº 161/9 (1994)

En la Tabla 8 se muestran los valores numéricos que se atribuyen a cada parámetro utilizado en el cálculo del índice de riesgo de una emisión directa de un contaminante, teniendo en cuenta la importancia de los mismos sobre el valor final. Para calcular este Índice de riesgo se aplica el algoritmo  $I_1 = (A \times B)$  obteniendo, para cada microcontaminante, un valor numérico en una escala de 0 a 10. Se han utilizado los valores PEC/PNEC obtenidos en el presente trabajo y se ha considerado un valor máximo de 2,5 en relación a la importancia de la población de riesgo, debido a que presentan un umbral de riesgo ecotoxicológico moderado-alto o bien a que dicho valor no ha sido registrado aún (PESTICIDE PROPERTIES DATABASE (2017); WHO Guidelines (2004)).

**Tabla 8** Parámetros utilizados en el cálculo del índice de riesgo de una emisión directa.

PEC/PNEC	A	Poblaciones de riesgo	B
>10	4	Muy importante	2.5
1 - 10	3		
$10^{-1}$ - 1	2	Importante	1.5
$10^{-3}$ - $10^{-1}$	1	Poco importante	1
$<10^{-3}$	0		

En la Tabla 9 se muestran los valores numéricos que se atribuyen a cada parámetro utilizado en el cálculo del índice de riesgo a escala local de un contaminante para un ecosistema acuático, teniendo en cuenta la importancia de los mismos sobre el valor final. Para calcular este Índice de riesgo se aplica el algoritmo  $I_2 = (A_{aire} + A_{suelo}) \times B \times C \times D$  obteniendo, para cada microcontaminante, un valor numérico en una escala de 0 a 10. Se han utilizado los valores PEC/PNEC obtenidos en el presente trabajo y los valores de factor de bioconcentración y de persistencia en el medio obtenidos en la bibliografía (PUBCHEM, 2017)

**Tabla 9** Parámetros utilizados en el cálculo del índice de riesgo a escala local para un ambiente acuático ( $I_2$ ).

PEC/PNEC	A	FBC	B	Persistencia	C	Poblaciones de riesgo	D
$>10^2$	4	$\log Kow > 3.5$	1.0	Meses	1.0	Muy importante	1.25
$10 - 10^2$	3						
1 - 10	2	$2.5 < \log Kow < 3.5$	0.75	Semanas	0.8	Importante	0.75
$10^{-1}$ - 1	1	$\log Kow < 2.5$	0.5	Días	0.6	Poco importante	0.5
$<10^{-1}$	0						

**\*Nota:** FBC= Factor de bioconcentración; Kow= Coeficiente de partición octanol-agua.

En relación al parámetro PEC/PNEC de los microcontaminantes en sedimentos, hemos considerado el peor de los casos, al no encontrar en la bibliografía datos relevantes sobre estudios realizados en sedimentos con estos compuestos. En caso de desconocer algún parámetro siempre se ha considerado el peor de los casos.

### 3.8. EVALUACIÓN DEL RIESGO AMBIENTAL: MODELO PESPEST 3.0

Con el fin de evaluar los riesgos ambientales para organismos acuáticos debidos a la exposición a los plaguicidas terbutrina, clorfenvinfos y pentaclorofenol en estudios de microcosmos, se procedió a utilizar el modelo predictivo PERPEST (v.3.0). Los compuestos diclofenaco y PFO no se pudieron analizar ya que no son plaguicidas. Los datos relacionados con las propiedades físico-químicas y mecanismo de acción necesarios para la ejecución del programa se presentan en la Tabla 10.

**Tabla 10** Parámetros relacionados con las propiedades físico-químicas necesarios para la ejecución del modelo predictivo PERPEST 3.0 [AMI databases (2017); Pesticides Properties DataBase (2017)].

Compuesto	Número CAS	HC50	Tipo de plaguicida	DT50	Koc	Constante de Henry a 25°C (Pa m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )
TBT	886-50-0	0.0712	Herbicida	Estable	2432	1.5E <sup>-3</sup>
CVF	470-90-6	1.4	Insecticida	125	680	2.2E <sup>-8</sup>
PCP	87-86-5	0.444	Pesticida	68	30	4.3E <sup>-1</sup>

*\*Nota:* HC50: Concentración peligrosa para el 50 % de los organismos; DT50: hidrólisis acuosa (días); Koc: coeficiente de partición carbón orgánico-agua en el suelo.

Seguidamente, se procede a seleccionar diferentes opciones proporcionadas por el modelo, y se introducen datos de los compuestos relacionados con la exposición ambiental (Tabla 11).

**Tabla 11** Parámetros relacionados con la exposición ambiental necesarios para la ejecución del modelo predictivo PERPEST 3.0 [AMI databases (2017); Pesticides Properties DataBase (2017)].

PARÁMETROS	Compuestos		
	CVF	PCP	TBT
Tipo de exposición	1 aplicación	1 aplicación	1 aplicación
Concentración (µg/L)*	0.1	0.1	0.065
Tipo de exposición	Pico	Pico	Pico
Número de clases de efectos	5	5	5
Exposición	Constante	Constante	Constante
Hidrología	Flujo constante	Flujo constante	Flujo constante

El parámetro de la concentración corresponde a los valores PEC (Predicted Environmental Concentration) obtenidos del Real Decreto 817/2015, de 11 de septiembre, ANEXO IV, y de las Directivas 2000/60/EC y 2008/105/EC.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el siguiente apartado se procede a exponer los resultados obtenidos en los ensayos realizados, tras el estudio estadístico.

### 4.1. Efecto de los microcontaminantes sobre *Vibrio fischeri*

Con los resultados obtenidos, se realizó un Análisis de la Varianza Simple, siendo la variable independiente *Concentración ensayada*, para cada uno de los microcontaminantes de estudio, y la variable dependiente *Inhibición de la bioluminiscencia* de la bacteria, a los 30 min de ensayo. En las Tablas 12-17 se muestran los valores medios de los porcentajes de inhibición de la bioluminiscencia de las cuatro réplicas ensayadas para cada nivel de concentración, con su respectiva desviación estándar relativa. El F-test del ANOVA indica que existen diferencias significativas entre las medias ( $p < 0.05$ ) por lo que se aplica un procedimiento de comparación múltiple, los Test de Rangos Múltiples, para establecer las medias que son significativamente diferentes unas de otras, a un nivel de confianza 95.0%.

Según el análisis estadístico realizado la variable dependiente *Inhibición de la bioluminiscencia* sigue una tendencia cuadrática respecto a los distintos niveles del factor *Concentración ensayada* para cada uno de los microcontaminantes (Figura 7), ya que el  $p$ -valor de la componente cuadrática es inferior a 0,01.

**Tabla 12** Inhibición de la bioluminiscencia (%) de *V. fischeri*, expuesta a clorfenvinfos (mg/L).

CVF (mg/L)	Inhibición de la bioluminiscencia (%)
0.0	0.3 ± 5.9 <sup>f</sup>
0.9	-2.8 ± 5.5 <sup>f</sup>
1.2	-3.3 ± 3.2 <sup>f</sup>
1.7	-1.9 ± 2.8 <sup>ef</sup>
2.3	1.5 ± 2.9 <sup>ef</sup>
3.5	4.3 ± 1.8 <sup>e</sup>
4.6	9.6 ± 3.1 <sup>d</sup>
6.9	15.3 ± 1.5 <sup>c</sup>
9.3	20.9 ± 1.5 <sup>b</sup>
13.9	24.4 ± 0.7 <sup>b</sup>
22.3	50.8 ± 5.9 <sup>a</sup>

**Tabla 13** Inhibición de la bioluminiscencia (%) de *V. fischeri*, expuesta a diclofenaco (mg/L).

DCF (mg/L)	Inhibición de la bioluminiscencia (%)
0.0	0.3 ± 5.9 <sup>h</sup>
6.7	23.9 ± 1.6 <sup>g</sup>
8.9	36.7 ± 3.5 <sup>f</sup>
13.4	56.9 ± 1.7 <sup>e</sup>
17.9	75.5 ± 1.5 <sup>d</sup>
26.9	89.8 ± 0.9 <sup>c</sup>
35.8	94.8 ± 0.6 <sup>b</sup>
53.8	98.8 ± 0.1 <sup>a</sup>
71.7	99.7 ± 0.1 <sup>a</sup>
107.5	99.9 ± 0.03 <sup>a</sup>
172.0	99.7 ± 0.1 <sup>a</sup>

**Tabla 14** Inhibición de la bioluminiscencia (%) de *V. fischeri*, expuesta a pentaclorofenol (mg/L).

PCP (mg/L)	Inhibición de la bioluminiscencia (%)
0.0	0.3 ± 5.9 <sup>h</sup>
0.03	-1.3 ± 1.0 <sup>h</sup>
0.05	-1.8 ± 1.5 <sup>h</sup>
0.07	-0.5 ± 2.3 <sup>h</sup>
0.09	5.0 ± 1.5 <sup>g</sup>
0.14	15.0 ± 0.8 <sup>f</sup>
0.19	24.6 ± 2.4 <sup>e</sup>
0.28	37.3 ± 1.2 <sup>d</sup>
0.37	47.5 ± 1.2 <sup>c</sup>
0.56	58.2 ± 1.1 <sup>b</sup>
0.89	78.1 ± 0.7 <sup>a</sup>

**Tabla 15** Inhibición de la bioluminiscencia (%) de *V. fischeri*, expuesta a perfluoroalquilo (mg/L).

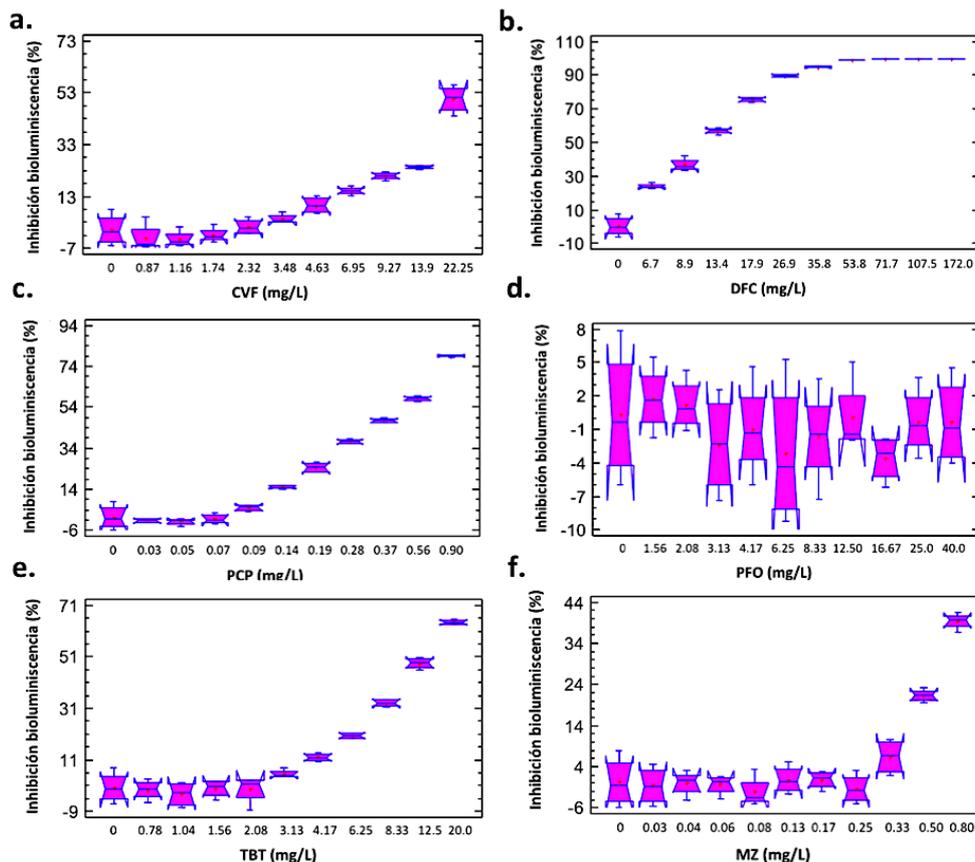
PFO (mg/L)	Inhibición de la bioluminiscencia (%)
0.0	0.3 ± 5.9 <sup>a</sup>
1.6	1.7 ± 3.0 <sup>a</sup>
2.1	1.2 ± 2.3 <sup>a</sup>
3.1	-2.4 ± 4.5 <sup>a</sup>
4.1	-1.0 ± 4.3 <sup>a</sup>
6.3	-3.1 ± 6.5 <sup>a</sup>
8.3	-1.6 ± 4.4 <sup>a</sup>
12.5	0.1 ± 3.4 <sup>a</sup>
16.7	-3.6 ± 2.0 <sup>a</sup>
25	-0.3 ± 3.0 <sup>a</sup>
40	-0.3 ± 3.9 <sup>a</sup>

**Tabla 16** Inhibición de la bioluminiscencia (%) de *V. fischeri*, expuesta a terbutrina (mg/L).

TBT (mg/L)	Inhibición de la bioluminiscencia (%)
0.0	0.3 ± 5.9 <sup>b</sup>
0.8	-0.5 ± 3.8 <sup>b</sup>
1.0	-2.3 ± 4.8 <sup>b</sup>
1.6	-0.03 ± 3.5 <sup>b</sup>
2.1	-0.3 ± 5.4 <sup>b</sup>
3.1	5.6 ± 1.5 <sup>f</sup>
4.2	12.1 ± 1.5 <sup>e</sup>
6.3	20.3 ± 1.0 <sup>d</sup>
8.3	33.0 ± 1.4 <sup>c</sup>
12.5	48.5 ± 2.0 <sup>b</sup>
20	64.4 ± 1.0 <sup>a</sup>

**Tabla 17** Inhibición de la bioluminiscencia (%) de *V. fischeri*, expuesta a clorfenvinfos (mg/L).

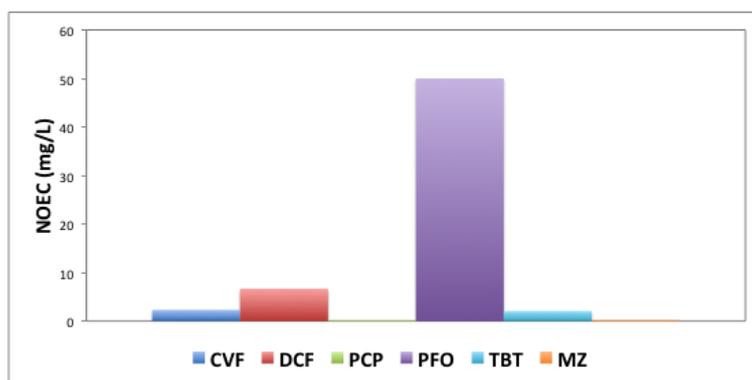
MZ (mg/L)	Inhibición de la bioluminiscencia (%)
0.0	0.3 ± 5.9 <sup>d</sup>
0.03	-0.6 ± 4.7 <sup>d</sup>
0.04	0.04 ± 3.1 <sup>d</sup>
0.06	-0.3 ± 2.4 <sup>d</sup>
0.08	-2.1 ± 3.9 <sup>d</sup>
0.13	0.8 ± 3.4 <sup>d</sup>
0.17	0.8 ± 2.1 <sup>d</sup>
0.25	-1.38 ± 3.5 <sup>d</sup>
0.33	6.5 ± 4.2 <sup>c</sup>
0.50	21.4 ± 1.5 <sup>b</sup>
0.80	39.34 ± 1.9 <sup>a</sup>



**Figura 7** Gráficos de cajas y bigotes de la inhibición de la bioluminiscencia de la bacteria *V. fischeri* frente a los diferentes niveles de concentración de los cinco microcontaminantes y de la mezcla. a. CVF (mg/L). b. DCF (mg/L). c. PCP (µg/L). d. PFO (mg/L). e. TBT (µg/L). f. MZ (µg/L).

Tanto en las Tablas como en las Figuras se observa un aumento gradual de la inhibición de la bioluminiscencia, a medida que aumenta la concentración del compuesto de ensayo, a excepción del perfluoroalquilo. Las concentraciones que han producido un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre la luminiscencia están comprendidas entre 3.5 y 22.3 mg/L para clorfenvinfos, 6.7 y 172.0 mg/L para diclofenaco, 0.09 y 0.89 mg/L para pentaclorofenol, 3.1 y 20.0 mg/L para terbutrina y 0.33 y 0.8 mg/L para la mezcla. Se puede observar la diferente sensibilidad de la bacteria a cada uno de los compuestos estudiados, ya que concentraciones bajas de pentaclorofenol y de la mezcla han producido un efecto significativo sobre la bioluminiscencia mientras que el resto de microcontaminantes han producido el mismo efecto con concentraciones más altas, excepto PFO, que a las concentraciones estudiadas no produjo ningún efecto sobre la bacteria.

En la Figura 8 se presentan los valores NOEC de cada uno de los compuestos para *V. fischeri*. Las concentraciones que no han producido un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre la bioluminiscencia han sido  $\gg 50.0$ ,  $< 6.7$ , 2.3, 2.1, 0.25 y 0.07 mg/L para perfluoroalquilo, diclofenaco, clorfenvinfos, terbutrina, mezcla y pentaclorofenol, respectivamente. Perfluoroalquilo ha sido el compuesto con menor efecto sobre el alga ya que serían necesarias concentraciones muy altas para producir un efecto sobre su crecimiento. En cambio, el compuesto con mayor efecto ha sido pentaclorofenol.



**Figura 8** Valores NOEC (mg/L) de cada uno de los microcontaminantes para la bacteria *V. fischeri*.

La Tabla 18 muestra los valores  $EC_{50}$  de los cuatro microcontaminantes y de la mezcla. No se ha podido calcular el valor  $EC_{50}$  de pentaclorofenol ya que los porcentajes de inhibición han sido inferiores al 50.0%. Estos resultados indican que pentaclorofenol ha sido el compuesto más tóxico para la bacteria, mientras que perfluoroalquilo ha sido el menos tóxico. El orden de toxicidad creciente ha sido  $PFO < DCF < CFV < TBT < MZ < PCP$ . Cabría esperar un mayor efecto de la mezcla, ya que pentaclorofenol ha sido muy tóxico; esto podría ser debido a una posible reactividad entre los diferentes microcontaminantes que produciría una variación del efecto tóxico.

**Tabla 18** Valores  $EC_{50}$  (mg/L) de cada uno de los microcontaminantes para la bacteria *V. Fischeri*, con sus intervalos de confianza al 95%.

CVF	DCF	PCP	PFO	TBT	MZ
27.7 [22.2-37.0]	11.3 [10.7-11.9]	0.4 [0.38-0.43]	--	13.8 [12.5-15.4]	1.6 [1.0-3.6]

#### 4.2. Efecto de los microcontaminantes sobre *P. subcapitata*

Con los resultados obtenidos, se realizó un Análisis de la Varianza Simple, siendo la variable independiente *Concentración ensayada*, para cada uno de los microcontaminantes de estudio, y la variable dependiente *Inhibición del crecimiento* del alga, a las 72 horas de ensayo.

En las Tablas 19-24 se muestran los valores medios del porcentaje de inhibición del crecimiento del alga de las cuatro réplicas ensayadas para cada nivel de concentración, con su respectiva desviación estándar relativa. El F-test del ANOVA indica que existen diferencias significativas entre las medias ( $p < 0.05$ ) por lo que se aplica un procedimiento de comparación múltiple, los Test de Rangos Múltiples, para establecer las medias que son significativamente diferentes unas de otras, a un nivel de confianza 95.0% (ver superíndices).

Según el análisis estadístico realizado la variable dependiente *Inhibición del crecimiento* sigue una tendencia cuadrática respecto a los distintos niveles del factor *Concentración ensayada* para cada uno de los microcontaminantes (Figura 9), ya que el  $p$ -valor de la componente cuadrática es inferior a 0,01.

**Tabla 19** Inhibición del crecimiento (%) de *P. subcapitata*, expuesta a clorfenvinfos (mg/L).

CVF (mg/L)	Inhibición del crecimiento (%)
0.0	1.0 ± 0.1 <sup>d</sup>
0.8	0.7 ± 0.3 <sup>d</sup>
1.3	0.6 ± 0.3 <sup>d</sup>
1.7	0.7 ± 0.5 <sup>d</sup>
2.5	0.9 ± 1.2 <sup>d</sup>
3.3	2.2 ± 2.7 <sup>d</sup>
5.0	2.2 ± 2.4 <sup>d</sup>
6.7	30.8 ± 5.1 <sup>c</sup>
10.0	64.4 ± 4.3 <sup>b</sup>
16.0	88.2 ± 1.3 <sup>a</sup>

**Tabla 20** Inhibición del crecimiento (%) de *P. subcapitata*, expuesta a diclofenaco (mg/L).

DCF (mg/L)	Inhibición del crecimiento (%)
0.0	1.0 ± 0.1 <sup>f</sup>
0.21	1.4 ± 1.1 <sup>f</sup>
0.31	2.9 ± 2.5 <sup>f</sup>
0.42	3.5 ± 3.1 <sup>f</sup>
0.6	2.8 ± 2.8 <sup>ef</sup>
0.8	6.1 ± 1.6 <sup>e</sup>
1.3	16.2 ± 3.7 <sup>d</sup>
1.7	25.4 ± 4.4 <sup>c</sup>
2.5	58.6 ± 5.9 <sup>b</sup>
4.0	85.8 ± 1.9 <sup>a</sup>

**Tabla 21** Inhibición del crecimiento (%) de *P. subcapitata*, expuesta a pentaclorofenol (µg/L).

PCP (µg/L)	Inhibición del crecimiento (%)
0.0	1.0 ± 0.1 <sup>j</sup>
0.10	1.3 ± 0.8 <sup>j</sup>
0.17	10.7 ± 3.0 <sup>i</sup>
0.25	16.9 ± 2.9 <sup>h</sup>
0.33	23.0 ± 2.3 <sup>g</sup>
0.50	27.5 ± 4.1 <sup>f</sup>
0.67	39.9 ± 4.0 <sup>e</sup>
1.0	49.9 ± 2.8 <sup>d</sup>
1.3	61.7 ± 2.8 <sup>c</sup>
2.0	70.4 ± 4.4 <sup>b</sup>
3.2	94.0 ± 1.6 <sup>a</sup>

**Tabla 22** Inhibición del crecimiento (%) de *P. subcapitata*, expuesta a perfluoroalquilo (mg/L).

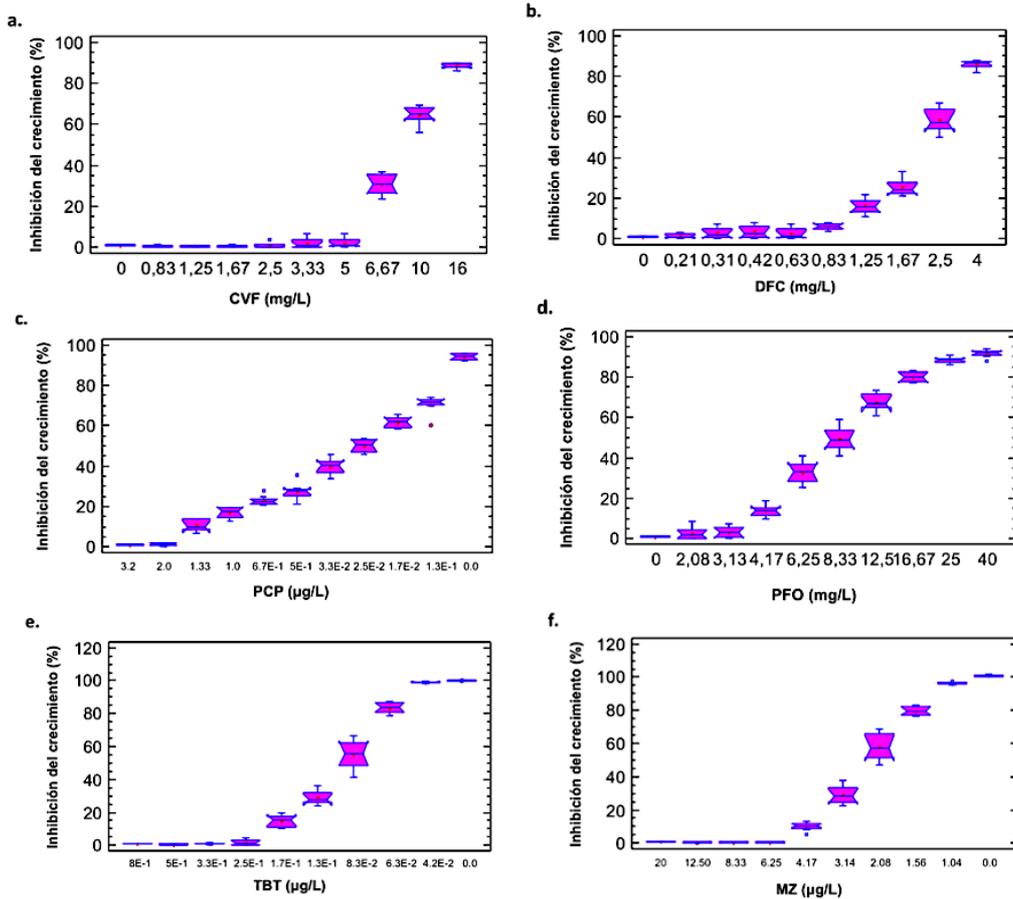
PFO (mg/L)	Inhibición del crecimiento (%)
0.0	1.00 ± 0.1 <sup>g</sup>
2.1	2.7 ± 3.1 <sup>g</sup>
3.1	3.3 ± 2.8 <sup>g</sup>
4.2	13.8 ± 2.9 <sup>f</sup>
6.3	32.9 ± 5.6 <sup>e</sup>
8.3	49.4 ± 5.8 <sup>d</sup>
12.5	67.7 ± 4.3 <sup>c</sup>
16.7	79.9 ± 2.6 <sup>b</sup>
25.0	88.4 ± 1.5 <sup>a</sup>
40.0	91.5 ± 1.8 <sup>a</sup>

**Tabla 23** Inhibición del crecimiento (%) de *P. subcapitata*, expuesta a TBT (µg/L).

TBT (µg/L)	Inhibición del crecimiento (%)
0.00	1.00 ± 0.1 <sup>f</sup>
0.04	0.5 ± 0.4 <sup>f</sup>
0.06	1.1 ± 0.5 <sup>f</sup>
0.08	1.7 ± 1.8 <sup>f</sup>
0.13	14.8 ± 3.5 <sup>e</sup>
0.17	28.9 ± 4.7 <sup>d</sup>
0.25	55.2 ± 8.9 <sup>c</sup>
0.33	83.4 ± 3.2 <sup>b</sup>
0.50	98.9 ± 0.4 <sup>a</sup>
0.80	100.0 ± 0.3 <sup>a</sup>

**Tabla 24** Inhibición del crecimiento (%) de *P. subcapitata*, expuesta a mezcla (µg/L).

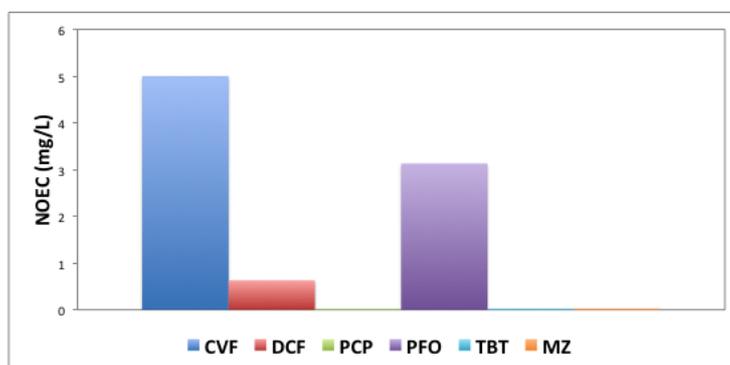
MZ (µg/L)	Inhibición del crecimiento (%)
0.0	1.0 ± 0.1 <sup>g</sup>
1.0	0.5 ± 0.2 <sup>g</sup>
1.6	0.5 ± 0.3 <sup>g</sup>
2.1	0.5 ± 0.3 <sup>g</sup>
3.1	10.1 ± 2.4 <sup>f</sup>
4.2	29.0 ± 5.5 <sup>e</sup>
6.3	58.0 ± 8.4 <sup>d</sup>
8.3	79.8 ± 2.5 <sup>c</sup>
12.5	96.3 ± 0.7 <sup>b</sup>
20.0	100.9 ± 0.5 <sup>a</sup>



**Figura 9** Gráficos de cajas y bigotes de la inhibición del crecimiento del alga *P.subcapitata* frente a los diferentes niveles de concentración de los cinco microcontaminantes y de la mezcla. a. CVF (mg/L). b. DCF (mg/L). c. PCP (µg/L). d. PFO (mg/L). e. TBT (µg/L). f. M (µg/L).

Tanto en las Tablas 19-24 como en las Figura 9, se observa un aumento gradual de la inhibición del crecimiento, a medida que aumenta la concentración del compuesto de ensayo. Las concentraciones que han producido un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre el crecimiento del alga están comprendidas entre 6.7 y 16.0 mg/L para clorfenvinfos, 0.83 y 4.0 mg/L para diclofenaco,  $1.7E^{-5}$  y  $3.2E^{-3}$  mg/L para pentaclorofenol, 4.2 y 40.0 mg/L para PFO,  $1.2E^{-4}$  y  $5.0E^{-4}$  mg/L para terbutrina y  $3.1E^{-3}$  y  $2.0E^{-2}$  para la mezcla. Se puede observar la diferente sensibilidad del alga a cada uno de los compuestos estudiados, ya que concentraciones muy bajas de pentaclorofenol, terbutrina y mezcla han producido un efecto significativo sobre el crecimiento del alga mientras que el resto de microcontaminantes han producido el mismo efecto con concentraciones más altas.

En la Figura 10 se presentan los valores NOEC de cada uno de los compuestos para *P. subcapitata*. Las concentraciones que no han producido un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) sobre el crecimiento del alga han sido 5.0, 3.1, 0.63,  $2.2E^{-3}$ ,  $1,25E^{-3}$  y  $8.3E^{-5}$ , para clorfenvinfos, perfluoroalquilo, diclofenaco, mezcla, pentaclorofenol y terbutrina, respectivamente. Clorfenvinfos ha sido el compuesto con menor efecto sobre el alga, ya que son necesarias concentraciones más altas para producir un efecto sobre su crecimiento. En cambio, el de mayor efecto ha sido terbutrina.



**Figura 10** Valores NOEC (mg/L) de cada uno de los microcontaminantes para el alga *P. subcapitata*.

La Tabla 25 muestra los valores  $EC_{50}$  de los cinco microcontaminantes y de la mezcla. Estos resultados indican que el pentaclorofenol ha sido el compuesto más tóxico para el alga, seguido por la terbutrina, mientras que clorfenvinfos y perfluoroalquilo han sido los compuestos menos tóxicos. El orden de toxicidad creciente ha sido  $PFO < CVF < DCF < M < TBT < PCP$ . Cabría esperar un mayor efecto de la mezcla, sin embargo, terbutrina y pentaclorofenol han sido más tóxicos; esto podría ser debido a una posible reactividad entre los diferentes microcontaminantes que produciría una variación del efecto tóxico.

**Tabla 25** Valores  $EC_{50}$  (mg/L) de cada uno de los microcontaminantes para el alga *P. subcapitata*, con sus intervalos de confianza al 95%.

CVF	DCF	PCP	PFO	TBT	M
8.9 [8.5-9.4]	2.3 [2.1-2.6]	$8.9E^{-4}$ [ $8.4E^{-4}$ - $9.4E^{-4}$ ]	9.4 [9.0-9.9]	$2.1E^{-3}$ [ $2.0E^{-3}$ - $2.2E^{-3}$ ]	$5.6E^{-3}$ [ $5.5E^{-3}$ - $5.7E^{-3}$ ]

#### 4.3. Efecto de soluciones acuosas fortificadas con los cinco microcontaminantes, tratadas mediante foto-Fenton a diferentes tiempos, sobre *P. subcapitata*

Con los resultados obtenidos, se realizó un Análisis de la Varianza Simple, siendo la variable independiente *Dilución ensayada*, para cada una de las muestras de estudio, y la variable dependiente *Inhibición del crecimiento* del alga, a las 72 horas de ensayo. En la Tabla 26 se muestran los valores medios del porcentaje de inhibición del crecimiento del alga de las cuatro réplicas ensayadas para cada nivel de dilución, con su respectiva desviación estándar relativa. El F-test del ANOVA indica que existen diferencias significativas entre las medias ( $p < 0.05$ ) por lo que se aplica un procedimiento de comparación múltiple, los Test de Rangos Múltiples, para establecer las medias que son significativamente diferentes unas de otras, a un nivel de confianza 95.0% (ver superíndices).

**Tabla 26** Inhibición del crecimiento (%) de *P. subcapitata* expuesta a diferentes diluciones de las soluciones de ensayo.

Dilución	Muestras de ensayo			
	T 0 min	T 15 min	T 30 min	T 360 min
Control	1.3 ± 1.0 <sup>i</sup>	1.3 ± 1.0 <sup>i</sup>	1.3 ± 1.0 <sup>i</sup>	1.3 ± 1.0 <sup>i</sup>
1:48	1.9 ± 2.3 <sup>i</sup>	-	-	-
1:32	17.9 ± 3.5 <sup>h</sup>	-	-	-
1:24	21.9 ± 5.5 <sup>g</sup>	1.7 ± 1.8 <sup>i</sup>	2.3 ± 1.3 <sup>hi</sup>	2.4 ± 2.1 <sup>i</sup>
1:16	33.2 ± 2.5 <sup>f</sup>	6.8 ± 3.2 <sup>h</sup>	4.4 ± 3.1 <sup>h</sup>	6.1 ± 2.9 <sup>h</sup>
1:12	41.5 ± 4.7 <sup>e</sup>	17.9 ± 3.2 <sup>g</sup>	14.4 ± 2.8 <sup>g</sup>	12.6 ± 2.9 <sup>g</sup>
1:8	65.5 ± 4.9 <sup>d</sup>	26.5 ± 3.5 <sup>f</sup>	28.5 ± 6.1 <sup>f</sup>	22.2 ± 3.6 <sup>f</sup>
1:6	78.0 ± 1.2 <sup>c</sup>	39.6 ± 4.5 <sup>e</sup>	45.2 ± 3.6 <sup>e</sup>	31.0 ± 4.8 <sup>e</sup>
1:4	96.3 ± 0.5 <sup>b</sup>	53.0 ± 3.3 <sup>d</sup>	60.2 ± 3.4 <sup>d</sup>	41.3 ± 4.0 <sup>d</sup>
1:3	99.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	64.1 ± 3.5 <sup>c</sup>	70.9 ± 3.0 <sup>c</sup>	51.0 ± 4.5 <sup>c</sup>
1:2	100.2 ± 0.3 <sup>a</sup>	72.1 ± 3.5 <sup>b</sup>	77.0 ± 2.1 <sup>b</sup>	59.3 ± 2.8 <sup>b</sup>
1:1.25	100.5 ± 0.3 <sup>a</sup>	82.3 ± 2.6 <sup>a</sup>	82.2 ± 1.7 <sup>a</sup>	66.8 ± 3.2 <sup>a</sup>

En la Tabla 26 se observa un aumento gradual de la inhibición del crecimiento, a medida que disminuye la dilución de la muestra. Todas las diluciones ensayadas han producido un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre el crecimiento del alga, para cada tiempo de tratamiento, excepto las diluciones 1:48 para la muestra no tratada y 1:24 para las muestras tratadas. Para todas las diluciones ensayadas se observa una disminución significativa de la inhibición del crecimiento ( $p < 0.05$ ) en las muestras tratadas. El efecto de las muestras T 15 min y T 30 min sobre el crecimiento del alga ha sido similar. Sin embargo, las muestras tratadas han tenido un efecto menor sobre el crecimiento del alga, siendo más patente a los 360 min.

Los valores LID y MID de las soluciones acuosas para *P. subcapitata* se muestran en la Tabla 27. La muestra no tratada es más tóxica que las muestras tratadas, sin embargo se observa una disminución de la toxicidad a lo largo del tiempo de tratamiento. No obstante, la muestra T 360 min sigue produciendo un efecto sobre el alga, por lo que el tratamiento no consigue la detoxificación completa de los microcontaminantes y/o sus metabolitos. Por ello, serían necesarios tiempos de tratamiento más largos para eliminar por completo el efecto tóxico, ya que durante el tratamiento se

forman compuestos intermedios que pueden ser más tóxicos que los contaminantes de los cuales proceden.

**Tabla 27** Valores LID y MID para *P.subcapitata* expuesta a las muestras de ensayo.

Muestras	LID	MID
T 0 min	1:48	1:12 ( 1:14 – 1:12)
T 15 min	1:24	1:4 (1:4 – 1:3)
T 30 min	1:24	1:4 (1:5 – 1:4)
T 360 min	1:24	1:2 (1:4 – 1:3)

#### 4.4. Efecto de los microcontaminantes sobre *Oryzias latipes*

A partir de los resultados obtenidos en el seguimiento diario del desarrollo embrionario se ha llevado a cabo un análisis estadístico con el fin de determinar si existen o no diferencias significativas en la mortalidad entre los individuos expuestos y los individuos control.

El análisis de tabulación cruzada (Figura 11) y el test chi-cuadrado, nos permite afirmar que existe una relación ente las variables (concentración del compuesto y mortalidad) y por tanto se da una dependencia entre ambas ( $p < 0.01$ ). A las concentraciones más bajas ensayadas 0.005, 2.5, 0.025, 2.0 y 5.0 mg/L de clorfenvinfos, diclofenaco, pentaclorofenol, perfluoroalquilo y terbutrina no se observaron diferencias significativas en la mortalidad ( $p < 0.05$ ) ni tampoco efectos subletales como consecuencia de la exposición. El aumento de las concentraciones ensayadas de los microcontaminantes de estudio no solo produjo el aumento de la mortalidad sino también la aparición de anomalías morfológicas en los individuos que sobrevivieron al efecto tóxico de los compuestos, tales como el aumento del saco vitelino, que provocaba una movilidad anormal del individuo, malformaciones en la cola, escoliosis y aumento del tiempo transcurrido hasta la eclosión (Tabla 28). La mezcla de los cinco compuestos a la concentración de 1 mg/L, produjo una mortalidad del 100% de los individuos.

Destaca el retraso en la eclosión, de tres a ocho días, de los embriones expuestos a 0.4 - 10.0 mg/L de clorfenvinfos, 2.4 mg/L de diclofenaco, 10.0 mg/L de perfluoroalquilo, 20.0 - 25.0 mg/L de terbutrina y 14.0 mg/L de pentaclorofenol. Individuos expuestos a concentraciones de clorfenvinfos comprendidas entre 0.04 y 10.0 mg/L, de diclofenaco entre 10.0 y 80.0 mg/L, de terbutrina entre 15.0 y 30.0 mg/L y de pentaclorofenol entre 14.0 y 25.0 mg/L sufrieron anomalías morfológicas que, en la mayoría de los casos, produjeron su muerte entre las primeras 24 y 48 horas después de la eclosión. También destaca que los embriones expuestos a concentraciones entre 2.0 y 50.0 mg/L de perfluoroalquilo sobrevivieron con efectos subletales durante más de 48 horas tras la eclosión.

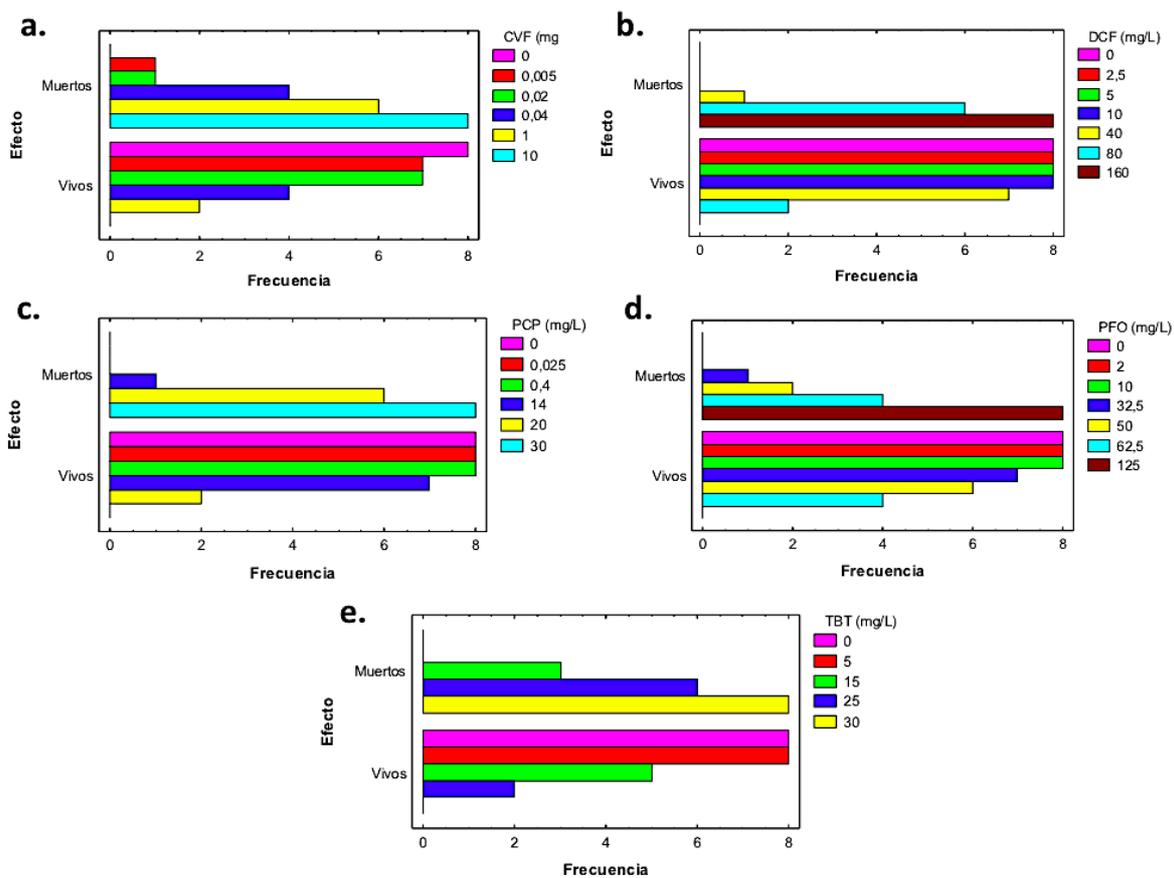
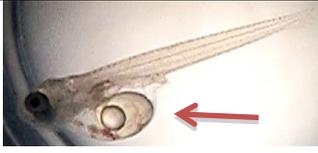
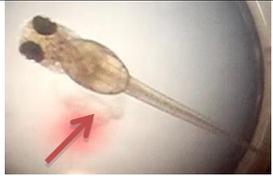
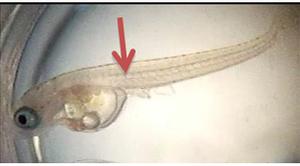


Figura 11 Diagrama de barras de Efecto frente a Concentración para *O.latipes*. a. CVF (mg/L). b. DCF (mg/L). c. PCP (mg/L). d. PFO (mg/L). e. TBT (mg/L).

**Tabla 28** Efectos subletales observados en *O. latipes*, para diferentes concentraciones de los cinco microcontaminantes de estudio.

<p><b>Malformación en el saco vitelino</b></p>	 <p><b>Tratamiento:</b> 2 mg/L de PFO. <b>Observaciones:</b> Aumento del tamaño del saco vitelino en el individuo que altera su movilidad.</p>	 <p><b>Tratamiento:</b> 10 mg/L de PFO. <b>Observaciones:</b> Aumento del tamaño del saco vitelino que disminuye el movimiento del individuo.</p>	 <p><b>Tratamiento:</b> 15 mg/L de terbutrina. <b>Observaciones:</b> Aumento muy acusado del tamaño del saco vitelino, disminuyendo la movilidad del mismo.</p>	 <p><b>Tratamiento:</b> 80 mg/L de diclofenaco. <b>Observaciones:</b> Aumento muy considerable del tamaño del saco vitelino, disminuyendo su movilidad.</p>
<p><b>Malformación en la cola</b></p>	 <p><b>Tratamiento:</b> 0.04 mg/L de clorfenvinfos. <b>Observaciones:</b> Individuo con curvatura anormal de la cola que murió a las 24 tras su eclosión.</p>	 <p><b>Tratamiento:</b> 10 mg/L de clorfenvinfos. <b>Observaciones:</b> Ejemplo de individuo con desprendimiento prematuro de la cola.</p>	 <p><b>Tratamiento:</b> 50 mg/L de PFO. <b>Observaciones:</b> Individuo con curvatura anormal de la cola que finalmente murió a las 24 horas tras la eclosión.</p>	 <p><b>Tratamiento:</b> 25 mg/L de PFO. <b>Observaciones:</b> Individuo con escoliosis severa y un prominente saco vitelino.</p>
<p><b>Escoliosis</b></p>	 <p><b>Tratamiento:</b> 0.04 mg/L de clorfenvinfos. <b>Observaciones:</b> Individuo con escoliosis que murió a las 24-48 tras su eclosión.</p>	 <p><b>Tratamiento:</b> 10 mg/L de clorfenvinfos. <b>Observaciones:</b> Individuo con escoliosis que murió tras 48 tras su eclosión</p>	 <p><b>Tratamiento:</b> 25 mg/L de terbutrina. <b>Observaciones:</b> Individuo con escoliosis. Tras 24 desde su eclosión, el individuo murió.</p>	 <p><b>Tratamiento:</b> 15 mg/L de terbutrina. <b>Observaciones:</b> Individuo con escoliosis y un prominente saco vitelino.</p>
<p><b>Tiempo hasta la eclosión (días)</b></p>	<p>Tratamiento con 0.04 y 10 mg/L de clorfenvinfos: 13-16 Tratamiento con 2.37 mg/L de diclofenaco: 12-14 Tratamiento con 15 y 25 mg/L de terbutrina: 13-17</p>		<p>Tratamiento con 10 mg/L de PFO: 12-14 Tratamiento con 14 mg/L de pentaclorofenol: 13-15</p>	

En la Tabla 29 se muestran los valores  $LC_{50}$  de los cinco microcontaminantes para Medaka. En las Figuras IV.1-IV.5 (Anexo IV) se muestran los gráficos del modelo ajustado del análisis de regresión avanzada Probit con los límites de confianza al 95%. Estos resultados indican que clorfenvinfos ha sido el compuesto más tóxico, mientras que perfluoroalquilo y diclofenaco han sido los menos tóxicos. Pentaclorofenol y terbutrina han mostrado una toxicidad intermedia.

**Tabla 29** Valores  $LC_{50}$  (mg/L) de cada uno de los microcontaminantes sobre el pez *O. latipes*.

CVF	DCF	PCP	PFO	TBT
8.1 [1.1-22.4]	52.7 [38.2-78.1]	16.5 [11.3-24.9]	54.7 [41.8-77.8]	16.2 [9.2-23.2]

#### 4.5. Efecto de los microcontaminantes sobre las líneas celulares HEK y N2a

Con los resultados obtenidos, se realizó un Análisis de la Varianza Simple, siendo la variable independiente *Concentración ensayada*, para cada uno de los microcontaminantes de estudio, y la variable dependiente *Viabilidad celular*, a las 24 horas de ensayo. En las Tablas 30-33 se muestran los valores medios de los porcentajes de viabilidad celular de las cuatro réplicas ensayadas para cada nivel de concentración, con su respectiva desviación estándar relativa. El F-test del ANOVA indica que existen diferencias significativas entre las medias ( $p < 0.05$ ) por lo que se aplica un procedimiento de comparación múltiple, los Test de Rangos Múltiples, para establecer las medias que son significativamente diferentes unas de otras, a un nivel de confianza del 95.0%, tal y como muestran los superíndices.

Según el análisis estadístico realizado la variable dependiente *Viabilidad celular* sigue una tendencia cuadrática respecto a los distintos niveles del factor *Concentración ensayada* para cada uno de los microcontaminantes (Figuras 12 y 13), ya que el  $p$ -valor de la componente cuadrática es inferior a 0,01.

**Tabla 30** Viabilidad de la línea celular HEK (%) expuesta a clorfenvinfos, pentaclorofenol y terbutrina.

mg/L	CVF (% Viabilidad)	PCP (% Viabilidad)	TBT (% Viabilidad)
0.0	96.7 ± 7.3 <sup>e</sup>	96.7 ± 7.3 <sup>d</sup>	96.7 ± 7.3 <sup>f</sup>
1.0	95.6 ± 3.0 <sup>e</sup>	99.6 ± 6.4 <sup>d</sup>	95.9 ± 4.0 <sup>f</sup>
2.0	94.3 ± 5.3 <sup>e</sup>	98.6 ± 6.8 <sup>d</sup>	98.3 ± 8.3 <sup>f</sup>
3.9	91.2 ± 4.5 <sup>e</sup>	93.0 ± 6.3 <sup>d</sup>	94.4 ± 6.4 <sup>f</sup>
7.8	79.7 ± 5.0 <sup>d</sup>	94.0 ± 9.9 <sup>c</sup>	79.9 ± 6.6 <sup>f</sup>
15.6	76.7 ± 2.3 <sup>c</sup>	76.5 ± 2.7 <sup>c</sup>	94.9 ± 4.3 <sup>f</sup>
31.3	57.5 ± 5.2 <sup>b</sup>	49.9 ± 5.0 <sup>b</sup>	91.0 ± 2.8 <sup>e</sup>
62.5	24.6 ± 1.9 <sup>b</sup>	52.0 ± 6.4 <sup>a</sup>	58.1 ± 1.4 <sup>d</sup>
125	12.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	35.2 ± 0.9 <sup>a</sup>	42.1 ± 1.1 <sup>c</sup>
250	12.5 ± 0.4 <sup>a</sup>	33.5 ± 0.4 <sup>a</sup>	36.6 ± 2.9 <sup>bc</sup>
500	12.7 ± 0.5 <sup>a</sup>	34.6 ± 2.5 <sup>a</sup>	29.6 ± 2.7 <sup>b</sup>
1000	12.8 ± 0.3 <sup>a</sup>	11.7 ± 2.6 <sup>a</sup>	21.0 ± 4.3 <sup>a</sup>

**Tabla 31** Viabilidad de la línea celular HEK (%) expuesta a diclofenaco, perfluoroalquilo y la mezcla.

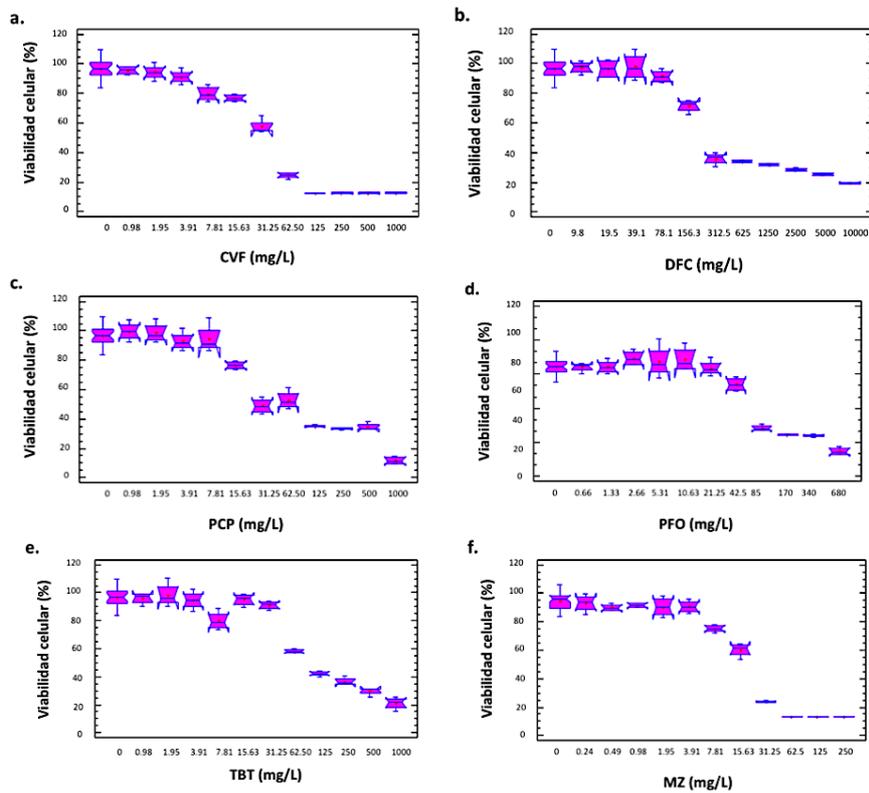
DCF (mg/L)	DCF (% Viabilidad)	PFO (mg/L)	PFO (% Viabilidad)	MZ (mg/L)	MZ (% Viabilidad)
0.0	96.7 ± 7.3 <sup>f</sup>	0.0	96.7 ± 7.3 <sup>d</sup>	0.0	96.7 ± 7.3 <sup>e</sup>
9.8	97.6 ± 3.9 <sup>f</sup>	0.7	96.2 ± 4.0 <sup>d</sup>	0.2	93.0 ± 6.0 <sup>e</sup>
19.3	96.5 ± 6.1 <sup>f</sup>	1.3	96.3 ± 5.6 <sup>d</sup>	0.5	90.1 ± 2.3 <sup>e</sup>
39.1	97.8 ± 9.0 <sup>f</sup>	2.7	104.0 ± 6.7 <sup>d</sup>	1.0	91.6 ± 1.9 <sup>e</sup>
78.1	91.4 ± 4.2 <sup>f</sup>	5.3	101.2 ± 14.5 <sup>d</sup>	2.0	90.6 ± 7.0 <sup>e</sup>
156	71.7 ± 4.2 <sup>e</sup>	10.6	102.7 ± 0.7 <sup>d</sup>	3.9	90.7 ± 4.5 <sup>e</sup>
312.5	35.9 ± 0.8 <sup>c</sup>	21.2	95.2 ± 6.6 <sup>d</sup>	7.8	75.1 ± 2.6 <sup>d</sup>
6250	33.9 ± 3.9 <sup>c</sup>	42.0	81.0 ± 6.1 <sup>c</sup>	15.6	60.2 ± 4.9 <sup>c</sup>
1250	31.9 ± 0.8 <sup>bc</sup>	85.0	42.4 ± 2.4 <sup>b</sup>	31.3	24.0 ± 0.4 <sup>b</sup>
2500	28.4 ± 0.9 <sup>bc</sup>	170	36.4 ± 0.4 <sup>b</sup>	62.5	13.2 ± 0.2 <sup>a</sup>
5000	25.5 ± 0.6 <sup>ab</sup>	340	36.1 ± 0.9 <sup>b</sup>	125	13.2 ± 0.2 <sup>a</sup>
10000	19.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	680	21.9 ± 3.4 <sup>a</sup>	250	13.1 ± 0.1 <sup>a</sup>

**Tabla 32** Viabilidad de la línea celular N2a (%) expuesta a clorfenvinfos, pentaclorofenol y terbutrina.

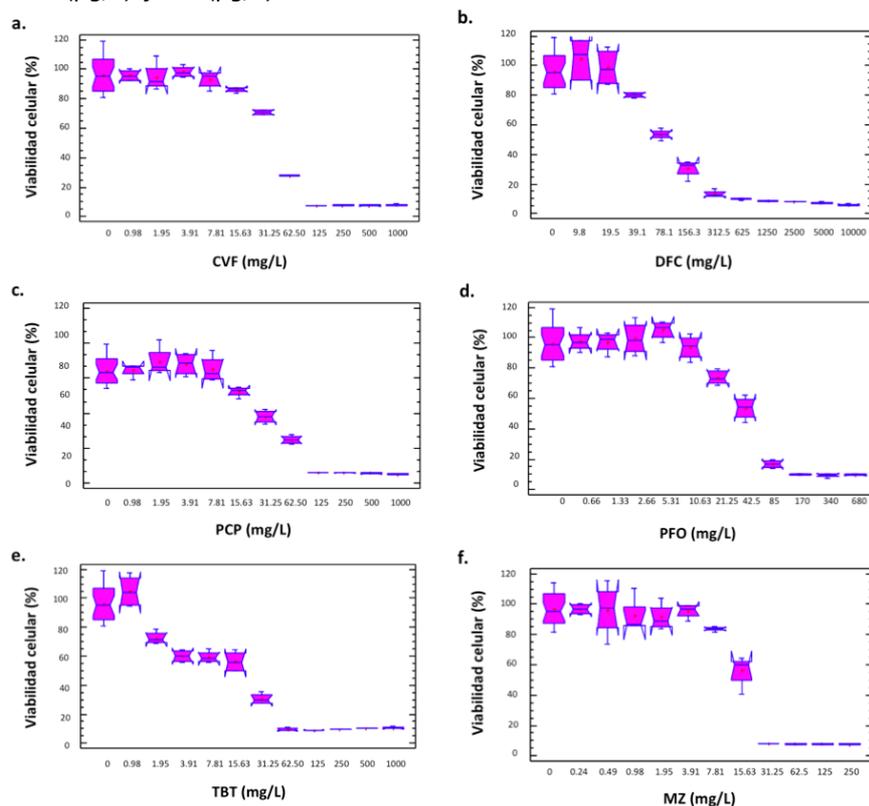
mg/L	CVF (% Viabilidad)	PCP (% Viabilidad)	TBT (% Viabilidad)
0.0	96.0 ± 12.1 <sup>e</sup>	96.0 ± 12.1 <sup>e</sup>	96.0 ± 12.1 <sup>e</sup>
1.0	95.8 ± 3.8 <sup>de</sup>	96.9 ± 5.6 <sup>e</sup>	105.0 ± 11.2 <sup>e</sup>
2.0	94.0 ± 9.8 <sup>de</sup>	104.2 ± 12.8 <sup>e</sup>	72.6 ± 4.6 <sup>d</sup>
3.9	98.0 ± 3.7 <sup>e</sup>	102.0 ± 9.6 <sup>e</sup>	59.9 ± 4.0 <sup>c</sup>
7.8	93.4 ± 6.1 <sup>de</sup>	97.4 ± 11.5 <sup>e</sup>	59.4 ± 4.1 <sup>c</sup>
15.6	86.1 ± 1.8 <sup>d</sup>	78.4 ± 4.5 <sup>d</sup>	56.3 ± 7.3 <sup>c</sup>
31.3	70.9 ± 1.5 <sup>c</sup>	57.0 ± 5.4 <sup>c</sup>	30.5 ± 3.5 <sup>b</sup>
62.5	27.8 ± 0.4 <sup>b</sup>	37.4 ± 3.3 <sup>b</sup>	9.7 ± 1.1 <sup>a</sup>
125	7.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	9.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	9.0 ± 0.2 <sup>a</sup>
250	7.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	9.2 ± 0.4 <sup>a</sup>	9.9 ± 0.1 <sup>a</sup>
500	7.8 ± 0.5 <sup>a</sup>	8.9 ± 0.7 <sup>a</sup>	10.0 ± 0.1 <sup>a</sup>
1000	8.0 ± 0.6 <sup>a</sup>	7.9 ± 0.5 <sup>a</sup>	10.6 ± 0.6 <sup>a</sup>

**Tabla 33** Viabilidad de la línea celular N2a (%) expuesta a diclofenaco, PFO y la mezcla.

DCF (mg/L)	DCF (% Viabilidad)	PFO (mg/L)	PFO (% Viabilidad)	MZ (mg/L)	MZ (% Viabilidad)
0.0	96.0 ± 12.1 <sup>e</sup>	0.0	96.0 ± 12.1 <sup>d</sup>	0.0	96.0 ± 12.1 <sup>d</sup>
9.8	104.9 ± 13.3 <sup>e</sup>	0.7	97.5 ± 6.8 <sup>d</sup>	0.2	96.6 ± 3.5 <sup>d</sup>
19.3	98.8 ± 12.7 <sup>e</sup>	1.3	97.0 ± 6.9 <sup>d</sup>	0.5	96.2 ± 17.4 <sup>cd</sup>
39.1	79.9 ± 1.8 <sup>d</sup>	2.7	99.5 ± 11.1 <sup>d</sup>	1.0	92.2 ± 12.1 <sup>cd</sup>
78.1	53.5 ± 3.5 <sup>c</sup>	5.3	105.1 ± 6.3 <sup>d</sup>	2.0	91.4 ± 8.7 <sup>cd</sup>
156	30.4 ± 5.8 <sup>b</sup>	10.6	93.7 ± 7.9 <sup>d</sup>	3.9	95.4 ± 4.8 <sup>cd</sup>
312.5	13.5 ± 2.3 <sup>a</sup>	21.2	73.8 ± 5.0 <sup>c</sup>	7.8	83.7 ± 1.4 <sup>c</sup>
6250	9.8 ± 0.4 <sup>a</sup>	42.0	53.7 ± 7.6 <sup>b</sup>	15.6	56.1 ± 10.6 <sup>b</sup>
1250	8.7 ± 0.3 <sup>a</sup>	85.0	16.7 ± 2.8 <sup>a</sup>	31.3	8.1 ± 0.2 <sup>a</sup>
2500	8.2 ± 0.2 <sup>a</sup>	170	10.1 ± 0.4 <sup>a</sup>	62.5	7.9 ± 0.2 <sup>a</sup>
5000	7.4 ± 0.5 <sup>a</sup>	340	9.5 ± 1.1 <sup>a</sup>	125	7.9 ± 0.1 <sup>a</sup>
10000	5.9 ± 0.5 <sup>a</sup>	680	9.8 ± 0.4 <sup>a</sup>	250	7.7 ± 0.2 <sup>a</sup>



**Figura 12** Gráficos de cajas y bigotes de la viabilidad celular de HEK frente a los diferentes niveles de concentración de los cinco microcontaminantes y de la mezcla. a. CVF (mg/L). b. DCF (mg/L). c. PCP (µg/L). d. PFO (mg/L). e. TBT (µg/L). f. MZ (µg/L).



**Figura 13** Gráficos de cajas y bigotes de la viabilidad celular de N2a frente a los diferentes niveles de concentración de los cinco microcontaminantes y de la mezcla. a. CVF (mg/L). b. DCF (mg/L). c. PCP (µg/L). d. PFO (mg/L). e. TBT (µg/L). f. MZ (µg/L).

Tanto en las Tablas 30-33 como en las Figuras 12 y 13, se observa una disminución gradual de la viabilidad celular a medida que aumenta la concentración del compuesto de ensayo. Las concentraciones que han producido un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre la viabilidad celular de HEK están comprendidas entre 7.8 y 1000 mg/L para clorfenvinfos y pentaclorofenol, 31.3 y 1000 mg/L para terbutrina, 156.0 y 10000 mg/L para diclofenaco, 42.6 y 680.0 mg/L para perfluoroalquilo y 7.8 y 250.0 mg/L para la mezcla.

Las concentraciones que han producido un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre la viabilidad celular de N2a están comprendidas entre 15.6 y 1000 mg/L para clorfenvinfos y pentaclorofenol, 2.0 y 1000 mg/L para terbutrina, 39.0 y 10000 mg/L para diclofenaco, 21.2 y 680.0 mg/L para perfluoroalquilo y 156.0 y 250.0 mg/L para la mezcla.

En la Figura 14 se presentan los valores NOEC de cada uno de los compuestos para las dos líneas celulares. Las concentraciones que no han producido un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) sobre la viabilidad de HEK han sido 78.1, 31.3, 21.3, 7.8, 3.9 y 3.9 mg/L para diclofenaco, terbutrina, perfluoroalquilo, pentaclorofenol, clorfenvinfos y mezcla, respectivamente. Las concentraciones que no han producido un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) sobre la viabilidad de N2a han sido 19.5, 10.6, 7.8, 7.8, 3.9, 1.0 mg/L para diclofenaco, perfluoroalquilo, clorfenvinfos, pentaclorofenol, mezcla y terbutrina, respectivamente. Diclofenaco ha sido el compuesto con menor efecto sobre la viabilidad de las dos líneas celulares; en cambio, los compuestos que han tenido un mayor efecto han sido la mezcla para la línea HEK y terbutrina para la línea N2a.

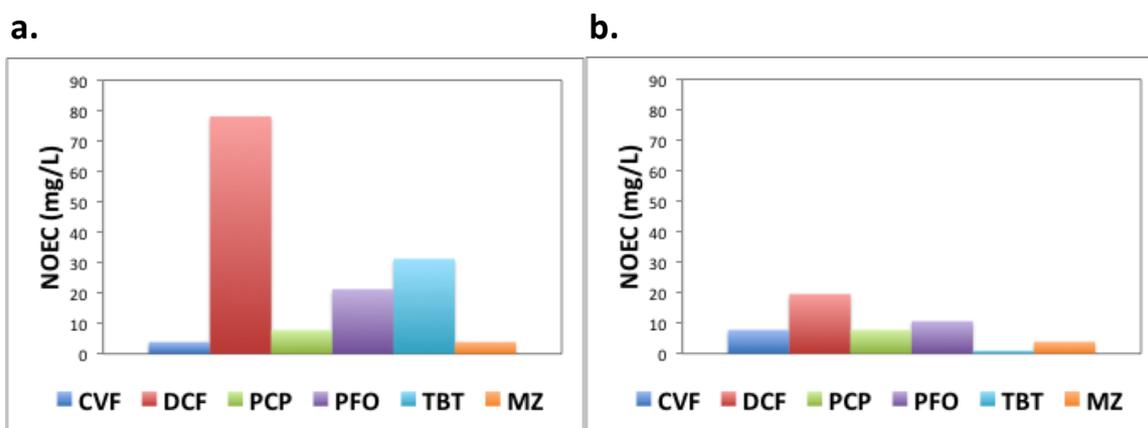


Figura 14 Valores NOEC (mg/L) de los microcontaminantes para las líneas celulares HEK (a) y N2a (b).

En las Tablas 34 y 35 se presentan los valores  $EC_{50}$  de los cinco microcontaminantes y de la mezcla, para las dos líneas celulares. Estos resultados muestran la menor toxicidad de diclofenaco y la elevada toxicidad de la mezcla para ambas líneas y de terbutrina para N2a. En general la línea N2a ha sido más sensible que HEK a los compuestos estudiados.

Tabla 34 Valores  $EC_{50}$  (mg/L) de cada uno de los microcontaminantes para la línea HEK, con sus intervalos de confianza al 95%.

CVF	DCF	PCP	PFO	TBT	MZ
37.1 [30.0-45.8]	551.0 [416.7-729.7]	76.8 [62.3-95.3]	128.14 [92.6-184.9]	137.4 [104.3-186.7]	16.54 [12.6-21.9]

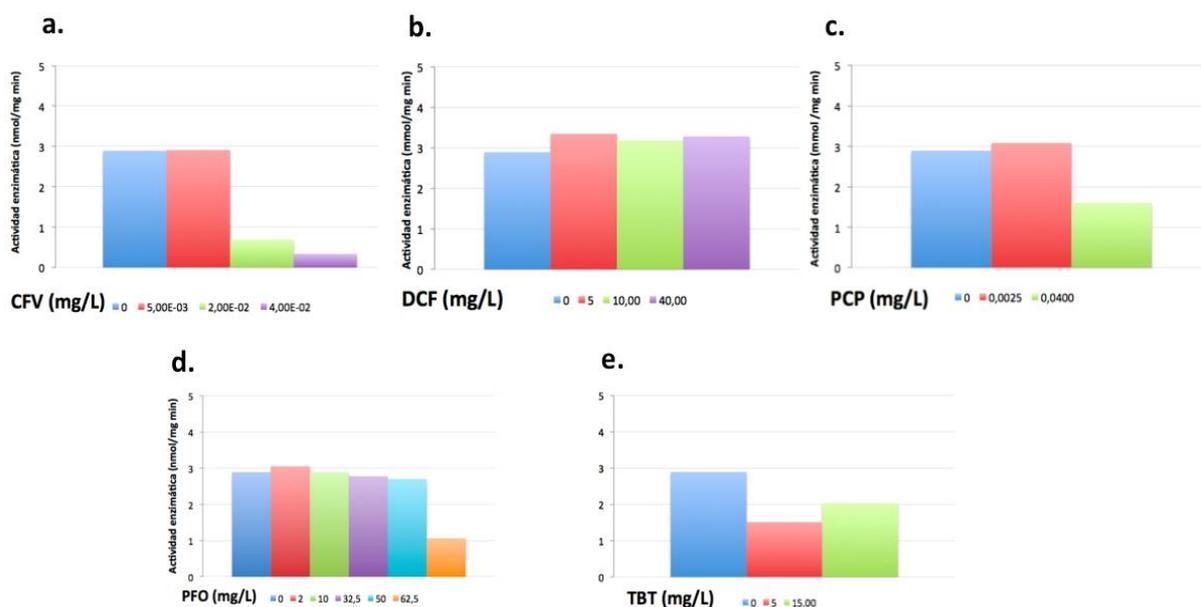
**Tabla 35** Valores  $EC_{50}$  (mg/L) de cada uno de los microcontaminantes para la línea N2a, con sus intervalos de confianza al 95%.

CVF	DCF	PCP	PFO	TBT	MZ
41.7 [31.9-54.6]	94.65 [68.5-125.6]	40.8 [32.6-50.8]	37.7 [28.1-49.9]	10.8 [8.1-14.1]	13.2 [9.3-19.0]

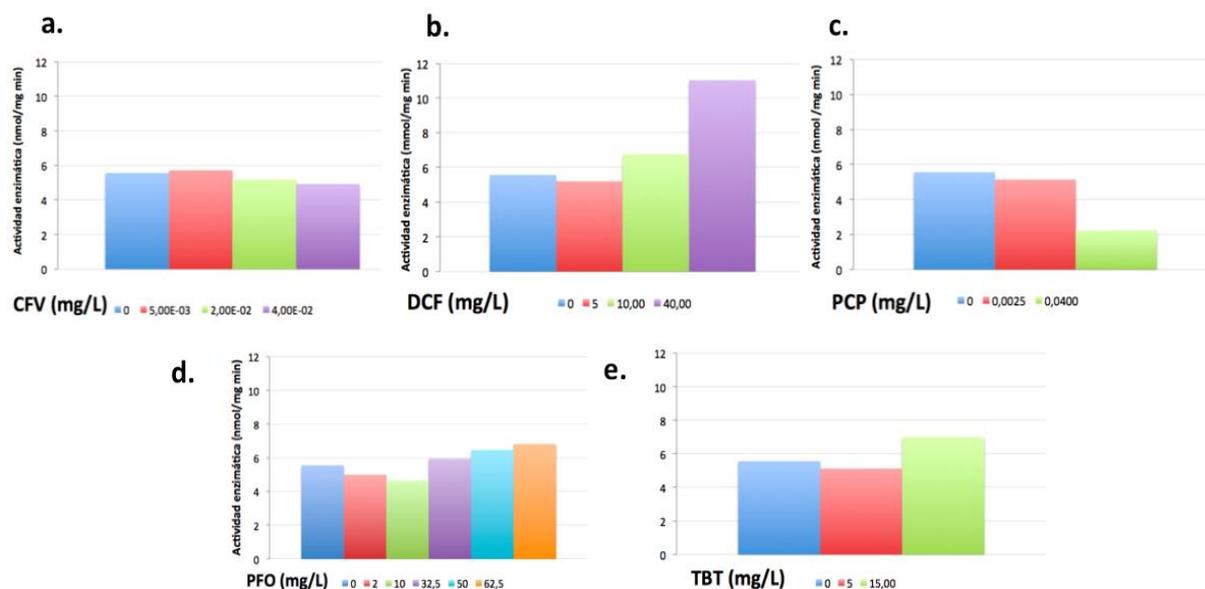
#### 4.6. Análisis de biomarcadores

Las Figuras 15 y 16 muestran la variación de las actividades enzimáticas AChE y LDH de los embriones expuestos a diferentes concentraciones de cada microcontaminante, con respecto a los embriones control. Como se puede observar (Figuras 15 y 16), en el caso de la actividad AChE hubo una clara disminución de la misma en los individuos expuestos a clorfenvinfos, a medida que aumenta la concentración. Estos resultados confirman la acción de clorfenvinfos sobre el sistema nervioso, al ser un insecticida organofosforado. En los embriones expuestos a las concentraciones más altas de pentaclorofenol, terbutrina y perfluoroalquilo, que se pudieron procesar, se observa una disminución de la actividad AChE debido, posiblemente, a la toxicidad elevada de estos compuestos a dichas concentraciones.

Para la actividad LDH, la Figura 16 muestra un aumento de la misma para los embriones expuestos a perfluoroalquilo, diclofenaco y terbutrina, con respecto a los individuos control. La enzima lactato deshidrogenasa participa en la glicólisis anaerobia cuando se da un estrés químico aumentando su actividad, como ocurre en este caso en los embriones expuestos a dichos compuestos. En los embriones expuestos a 0.04 mg/L de pentaclorofenol se observa una disminución de la actividad LDH debido, posiblemente, a la toxicidad elevada de este compuesto a dicha concentración.



**Figura 15** Actividad enzimática de AChE (nmol/mg min) frente a la concentración del microcontaminante. a. CVF (mg/L). b. DCP (mg/L). c. PCP (mg/L). d. PFO (mg/L). e. TBT (mg/L).



**Figura 16** Actividad enzimática de LDH (nmol/mg min) frente a la concentración del microcontaminante. a. CVF (mg/L). b. DCF (mg/L). c. PCP (mg/L). d. PFO (mg/L). e. TBT (mg/L).

#### 4.7. Resultado de la evaluación del riesgo ambiental: cálculo del cociente PEC/PNEC según la directriz DOCE NºL 161/9 (1994)

En la Tabla V.1 (Anexo V) se muestran los resultados del cociente PEC/PNEC, de los microcontaminantes estudiados, cuando se emplean  $EC_{50}/1000$  y  $NOEC/100$ , como valores PNEC. Estos factores de evaluación son una expresión del grado de incertidumbre en la extrapolación de los datos de un ensayo, al ambiente real.

De estos resultados destaca el riesgo de pentaclorofenol y terbutrina para la especie *P.subcapitata*, dado que PEC/PNEC ( $PNEC=EC_{50}/1000$ ), es superior a la unidad. Eso indica la necesidad de información adicional, y las recomendaciones de las autoridades competentes para reducir el riesgo, ya estas sustancias plantean un problema para el medio ambiente. Los demás compuestos, en los diferentes sistemas estudiados, no plantean problemas adicionales.

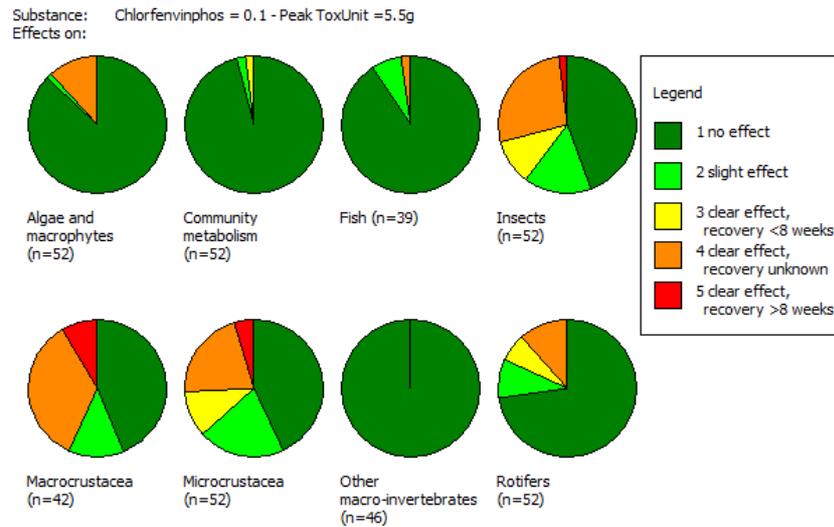
#### 4.8. Resultado de la evaluación del riesgo ambiental: cálculo de los índices de riesgo para descarga directa a escala local y global según el modelo de Vighi y Calamari (1996)

En la Tabla VI.1 (Anexo VI) se muestran los índices de riesgo por descarga directa y a escala global para los cinco microcontaminantes estudiados. Estos valores se encuentran comprendidos entre 0 y 10, siendo el 0 el de mínimo riesgo ambiental, y el de 10 el de máxima. Destaca el diferente riesgo al que se encuentran expuestos los diferentes sistemas de estudio, siendo los más afectados *P.subcapitata* y *V.fischeri*.

Aquellos microcontaminantes con un menor riesgo ambiental han sido clorfeninfos, diclofenaco, perfluoroalquilo y terbutrina. Por el contrario, pentaclorofenol ha mostrado un mayor riesgo. También se aprecia como, en líneas generales, el riesgo a escala local es superior al riesgo por descarga directa.

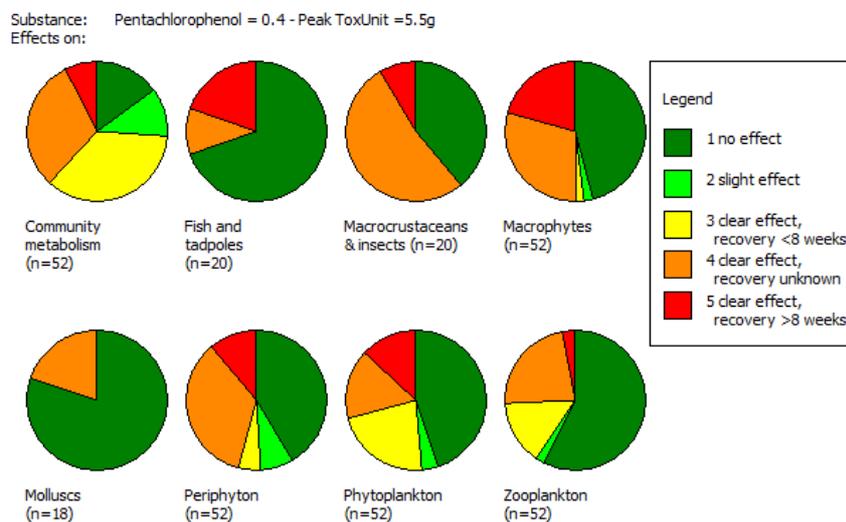
#### 4.9. Resultado de la evaluación del riesgo ambiental: riesgo predecible en organismos acuáticos según el modelo PERPEST

A continuación, en las Figuras 17-19 se muestran los resultados obtenidos por el modelo informático PERPEST para la predicción del riesgo ecológico de los plaguicidas, a partir de las concentraciones detalladas en el Real Decreto 817/2015, de 11 de septiembre, ANEXO IV, y de las Directivas 2000/60/EC y 2008/105/EC.



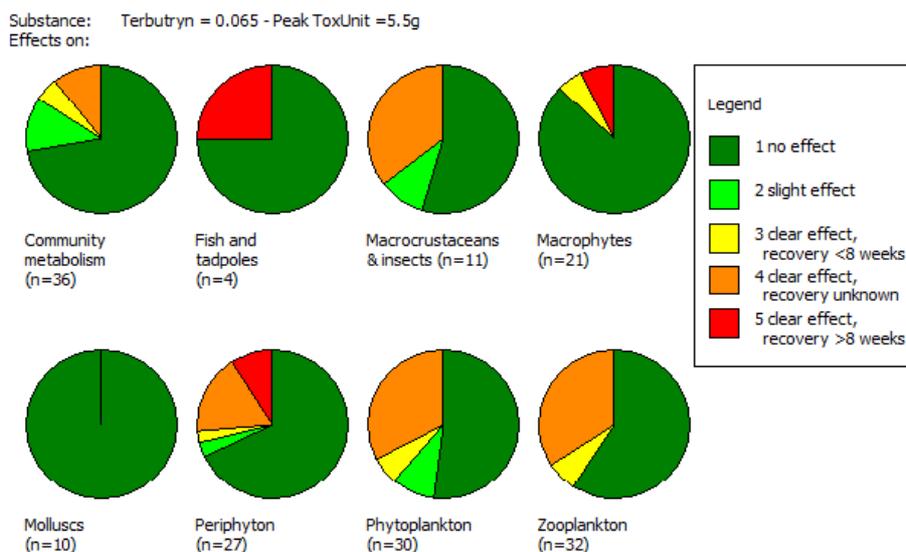
**Figura 17** Output del modelo PERPEST para la predicción de riesgo ecológico de una concentración de clorfenvinfos de 0.1 µg/L.

El resultado para clorfenvinfos desvela que para la mayor parte de las poblaciones estudiadas por el modelo, existe una probabilidad superior al 50% de que este microcontaminante no tenga un efecto sobre las mismas. Sin embargo, este riesgo ecotoxicológico resulta mayor en macrocrustáceos, microcrustáceos e insectos, con un riesgo estimado superior al 25% de padecer algún efecto como consecuencia de la exposición a clorfenvinfos, y cuyo periodo de recuperación al mismo resulta desconocido.



**Figura 18** Output del modelo PERPEST para la predicción de riesgo ecológico de una concentración de pentaclorofenol de 0.1 µg/L.

Los riesgos ecotoxicológicos para la exposición a pentaclorofenol resultan más evidentes y elevados que para clorfenvinfos y terbutrina. En este caso, a excepción de peces, moluscos y zooplancton, donde existe una probabilidad superior al 50% de no padecer ningún efecto, el resto de poblaciones no se encuentran exentas de padecer algún riesgo. Y, entre las posibles poblaciones afectadas, hay diversidad en lo referente a los periodos de recuperación a la exposición.



**Figura 19** Output del modelo PERPEST para la predicción de riesgo ecológico de una concentración de terbutrina de 0.065 µg/L.

Por último, para la exposición a terbutrina, el programa nos devuelve un resultado en el que, para todas las poblaciones contempladas por el modelo, existe una probabilidad superior al 50% en todos los casos de que no se produzcan efectos sobre las mismas. No obstante, la probabilidad de padecer algún efecto como consecuencia de la exposición, cuyo periodo de recuperación se desconoce, es superior al 25% para las poblaciones de fitoplacton, zooplacton u macrocrustáceos.

## 5. CONCLUSIONES

De los diferentes ensayos llevados a cabo en el presente trabajo se pudieron extraer las siguientes conclusiones.

1. Existe una gran variación en la sensibilidad de los organismos a los microcontaminantes estudiados, estando los valores  $EC_{50}$  comprendidos entre  $8.9E^{-4}$  y 551 mg/L, por lo que en estudios de toxicidad es necesario utilizar siempre una batería de ensayos.
2. En general, las especies *P. subcapitata*, *V. fischeri* y *O. latipes* han sido las más sensibles resultando adecuadas para el estudio de la toxicidad de los cinco microcontaminantes.
3. El tratamiento mediante foto-Fenton de las muestras fortificadas con los cinco microcontaminantes resulta efectivo ya que la toxicidad sobre el alga disminuye a lo largo del tiempo. No obstante, la muestra tratada durante seis horas sigue produciendo un efecto tóxico, por lo que son necesarios tiempos de tratamiento más largos para lograr una detoxificación completa de la muestra.
4. Las concentraciones más bajas ensayadas de clorfenvinfos (0.005 mg/L), diclofenaco (2.5 mg/L), pentaclorofenol (0.025 mg/L), perfluoroalquilo (2.0 mg/L) y terbutrina (5.0 mg/L) no han producido efectos subletales en embriones de *O. latipes*. Sin embargo, al aumentar la concentración de los microcontaminantes se ha producido un aumento en la mortalidad y la aparición de efectos subletales tales como aumento del saco vitelino, malformaciones en la cola, escoliosis y aumento del tiempo transcurrido hasta la eclosión.
5. Las actividades enzimáticas acetilcolinesterasa y lactato deshidrogenasa han mostrado una respuesta significativa en los embriones expuestos a los cinco microcontaminantes resultando ser adecuadas como biomarcadores de efectos subletales en *O. latipes*.
6. Según nuestros resultados los modelos de evaluación de riesgos que contemplan toda la información disponible relativa a la emisión, exposición y características de los compuestos así como el escenario físico bajo estudio (Índices de riesgo, PERPEST) es mucho más real que la basada únicamente en exposición y toxicidad *in vitro* (PEC/PNEC).
7. La evaluación de los riesgos ambientales muestra que el pentaclorofenol es el microcontaminante con mayor riesgo ambiental.

## 6. REFERENCIAS

- Amiplastics.com. (2017). *AMI databases*. [online] Available at: <https://www.amiplastics.com/pubs/dbase> [Accessed 27 May 2017].
- Arora, D., Dhanwal, V., Nayak, D., Saneja, A., Amin, H., ur Rasool, R., ... & Goswami, A. (2016). Preparation, characterization and toxicological investigation of copper loaded chitosan nanoparticles in human embryonic kidney HEK-293 cells. *Materials Science and Engineering: C*, 61, 227-234.
- BOARD, E. (1992). International Programme on Chemical Safety (IPCS).
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dyebinding. *Anal. Biochem.* 72, pp 248-254.
- Cajaraville MP, MJ Bebianno, J Blasco, C Porte, C Sarasquete & A Viarengo. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. En: *Science of the Total Environment. Special issue on Towards an integrative approach in Environmental Contamination and Toxicology*. MP Cajaraville (guest ed.), Elsevier Science, Oxford, 247: 295-311
- Cetin, A. K., & Mert, N. (2006). Growth rate of *Scenedesmus acutus* (Meyen) in cultures exposed to trifluralin. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(4), 631.
- Depledge M.H. (1994). The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. Fossi M.C., Leoncio C., eds. *Non destructive Biomarkers in Vertebrates*, Lewis Publishers, Boca Ratón, Florida, USA. pp271-296.
- Drugs.com. (2017). *Diclofenac - FDA prescribing information, side effects and uses*. [online] Available at: <https://www.drugs.com/pro/diclofenac.html> [Accessed 19 Apr. 2017].
- Efsa.europa.eu. (2017). *European Food Safety Authority | Trusted science for safe food*. [online] Available at: <https://www.efsa.europa.eu/> [Accessed 29 May 2017].
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 881-9095.
- Esclapés, M. (1999). *Protocolos estándares para bioensayos de toxicidad con especies acuáticas y terrestres. Versión 2.0*. PDVSA. INTEVEP. 213pp.
- Espanol.epa.gov. (2017). *Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos | US EPA*. [online] Available at: <https://espanol.epa.gov> [Accessed 19 Apr. 2017].
- EU, D. (2013). 39/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *L226/1, EPaCotE Union, Editor*.
- FAO. (1981). *Manual de métodos de investigación del medio ambiente acuático. Parte 4a. Bases para la elección de ensayos biológicos para evaluar la contaminación marina*. FAO, Doc. Tec. Pesca. (164): 34pp.
- Feito, R., Valcárcel, Y., & Catalá, M. (2012). Biomarker assessment of toxicity with miniaturised bioassays: diclofenac as a case study. *Ecotoxicology*, 21(1), 289-296.
- Fent, K. (2013). *Ecotoxicología: Toxicología Química Ambiental Ecología*. Georg Thieme Verlag.
- Forbes, T. L. (1993). *Ecotoxicology in theory and practice*. Springer Science & Business Media.
- Girotti, S., Ferri, E. N., Fumo, M. G., & Maiolini, E. (2008). Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. *Analytica Chimica Acta*, 608(1), 2-29.
- Herbert, A., Guilhermino, L., Da Silva De Assis, H. C., & Hansen, P. D. (1995). Acetylcholinesterase activity in aquatic organisms as pollution biomarker. *Z Angewandte Zoo*, 3, 1-15.
- Hertfordshire, U. (2017). *PPDB - Pesticides Properties DataBase*. [online] Sitem.herts.ac.uk. Available at: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/index.htm> [Accessed 27 May 2017].
- Iwamatsu, T. (2004). Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mechanisms of development*, 121(7), 605-618.
- Janssen C.R., Espiritu E.Q., Persoone G., (1993). Evaluation of the new "enzymatic inhibition" criterion for toxicity testing with *Daphnia magna*. En: (Soares, A.M.V.M., Calow, P. eds.). *Progress in Standardization of Aquatic Toxicity Tests*, Lewis Publishers, USA, pp. 71-80.
- Jiménez, M. R., & Kuhn, G. R. (2009). *Toxicología fundamental*. Ediciones Díaz de Santos.
- Jjemba PK (2006) Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf* 63:113-130.
- Johnson, M. (2012). *Protein Quantitation*. [online] Labome.com. Available at: <https://www.labome.com/method/Protein-Quantitation.html> [Accessed 11 Jun. 2017].
- Kruger, N. J. (1994). The Bradford method for protein quantitation. *Basic protein and peptide protocols*, 9-15.
- Kungolos, A., Samaras, P., Kipopoulou, A. M., Zoumboulis, A., & Sakellaropoulos, G. P. (1999). Interactive toxic effects of agrochemicals on aquatic organisms. *Water science and technology*, 40(1), 357-364.

- Lin, C. Y., Chiang, C. Y., & Tsai, H. J. (2016). Zebrafish and Medaka: new model organisms for modern biomedical research. *Journal of biomedical science*, 23(1), 19.
- Mallebrera Simarro, B. (2016). In vitro toxicity assessment and mitigation strategies of beauvericin, sterigmatocystin and patulin/Evaluación de la toxicidad in vitro y estrategias de mitigación de la beauvericina, esterigmatocistina y patulina.
- Mannervik, B & Danielson, U.H. (1998). *CRT Crit Rev. Biochem.* 23, 283-337.
- Massoulié J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Vallette FM (1993) Molecular and Cellular Biology of Cholinesterases. *Prog Neurobiol* 41:31-91.
- Midgett, K., Peden-Adams, M. M., Gilkeson, G. S., & Kamen, D. L. (2015). In vitro evaluation of the effects of perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) on IL-2 production in human T-cells. *Journal of Applied Toxicology*, 35(5), 459-465.
- Monell, I. V. (2007). *Evaluación y desarrollo de modelos" in vitro" para la predicción de neurotoxicidad. Aproximación proteómica a la neurotoxicidad inducida por metilmercurio* (Doctoral dissertation, Universitat de Barcelona).
- Navarro, M. S., Almendros, C. O., Caballero, M. P., Hurtado, J. A., & Muñoz, M. S. (1996). Isoenzimas de lactato deshidrogenasa en el suero y aspirado bronquial de recién nacidos con dificultad respiratoria de etiología diversa. *An Esp Pediatr*, 45, 62-66.
- Neyens, E., & Baeyens, J. (2003). A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. *Journal of Hazardous materials*, 98(1), 33-50.
- OECD Guidelines for the testing of chemicals. Fish embryo Acute Toxicity (FET) test. (Julio, 2013)
- OECD Guideline for testing of chemicals. Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages. (Septiembre, 1998).
- Olson, B. J., & Markwell, J. (2007). Assays for determination of protein concentration. *Current protocols in protein science*, 3-4.
- Pica Granados, Y. (2004). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. IMTA, Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo
- Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. (2017). [online] Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> [Accessed 18 Apr. 2017].
- Rampersad, SN (2012). Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors* 2012, 12, 12347-12360; doi:10.3390/s120912347
- Romero, P. R., & Cantú, A. M. (Eds.). (2008). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: la experiencia en México*. Instituto Nacional de Ecología.
- Sánchez-Chávez, G., & Salceda, R. (2008). Enzimas Polifuncionales: El caso de la acetilcolinesterasa. *REB*, 27(2), 44-51.
- Sancho E., Cerón J.J., Ferryo M.D. (2000). Colinesterasa activity and hematological parameters as biomarkers of sublethal eolinate exposure in Anguilla anguilla, *EcoToxicol. Environ. Safety* 46,pp 81-86.
- Satyavani, G., Chandrasehar, G., Varma, K. K., Goparaju, A., Ayyappan, S., Reddy, P. N., & Murthy, P. B. (2012). Toxicity assessment of expired pesticides to green algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *ISRN toxicology*, 2012.
- Tietz G.F. (1987). Mineral distribution and feldspar weathering in a saprolite from northeastern Nigeria. *Chem. Geol.*, Vol. 60, Issues 1-4,pp 163-176
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Microbiology: An Introduction*,—International Student Edition.
- Toxnet.nlm.nih.gov. (2017). *TOXNET*. [online] Available at: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+470-90-6> [Accessed 18 Apr. 2017].
- Tsuda, S. (2016). Differential toxicity between perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA). *The Journal of Toxicological Sciences*, 41(Special), SP27-SP36.
- U.S. EPA (1998) Principles of Environmental Impact Assessment Review
- Van den Brink, P. J., Roelsma, J., Van Nes, E. H., Scheffer, M., & Brock, T. (2002). Perpest model, a case-based reasoning approach to predict ecological risks of pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(11), 2500-2506.
- Van der Eb, A. 2012. USA FDA CTR For biologics evaluation and research vaccines and related biological products advisory committee meeting.
- Wilce, M. C., & Parker, M. W. (1994). Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1205(1), 1-18.
- WUR. (2017). *PERPEST Version 1.0, manual and technical description; a model that predicts the ecological risks of pesticides in freshwater ecosystems*. [online] Available at: <http://www.wur.nl/en/Publication-details.htm?publicationId=publication-way-333237353632> [Accessed 27 May 2017].
- Zinkl J.G., Lonchart W.L., Kenny S.A., Ward F.J. (1991). The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish. En: (In Mineau P., ed.), *Cholinesterase Inhibiting Insecticides: Their Impact on Wildlife and the Environment*, Elsevier, Amsterdam, pp. 233-254.