



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y
DEL MEDIO NATURAL

Evaluación de la actividad estrogénica (RYA) y citotóxica de aguas
contaminadas tratadas mediante procesos de oxidación avanzada
(POAs)

Trabajo de Fin de Grado en Biotecnología

Alumno: Sergio Gimeno Rocafort

Tutores: M^a Ángeles Castillo López y Consuelo Sabater Marco

Curso: 2018/2019

Valencia, Julio 2019

Datos personales

Alumno/a: Sergio Gimeno Rocafort

Datos del Trabajo Fin de Grado

Título del TFG:	Evaluación de la actividad estrogénica (RYA) y citotóxica de aguas contaminadas tratadas mediante procesos de oxidación avanzada (POAs)	
Lugar de realización:	Departamento de Biotecnología	Fecha de lectura: Septiembre 2019
Titulación:	Grado en Biotecnología	
Especialidad:	Toxicología ambiental	
Director/a:	M ^a Ángeles Castillo López	
Codirector/a:	Consuelo Sabater Marco	

Resumen

En los últimos años, ha aumentado la preocupación por el creciente número de compuestos tóxicos detectados en el medio ambiente, especialmente los llamados contaminantes emergentes o microcontaminantes, que debido a su falta de regulación en la legislación actual y al desconocimiento de sus efectos a corto y largo plazo, se han convertido en una prioridad para los investigadores.

Uno de los efectos que más preocupa en la actualidad es la disrupción endocrina que presentan muchos de estos compuestos. Estos son incorporados al medio ambiente por la actividad industrial, agrícola y por efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales, donde, en muchos casos, no se consigue una eliminación completa de los mismos. Es por ello que, actualmente, se están desarrollando nuevas tecnologías para conseguir una completa eliminación de este tipo de sustancias (Procesos de Oxidación Avanzada).

Además de evaluar la eficacia de los tratamientos de oxidación avanzada a nivel de su capacidad para degradar los contaminantes, se hace necesario determinar la actividad endocrina y citotóxica de las aguas tratadas, ya que los contaminantes originales pueden convertirse en subproductos de actividad tóxica desconocida.

En este trabajo de investigación, aguas simuladas y naturales artificialmente contaminadas con cuatro microcontaminantes presentes en la Directiva 2013/39/CE, diclofenaco, pentaclorofenol, terbutrina y clorfenvinfos, y sometidas a Procesos de Oxidación Avanzada (Foto-Fenton y ozonización) van a ser evaluadas mediante el ensayo RYA (Recombinant Yeast Assay) y mediante ensayos de citotoxicidad. Además, tanto el estudio mediante RYA, como los ensayos de citotoxicidad nos van a permitir valorar la eficacia de los tratamientos de oxidación avanzada y que tipo de tratamiento sería el más adecuado, ozonización o foto-Fenton.

Palabras clave:

Microcontaminantes; actividad disruptora endocrina; ensayo RYA; citotoxicidad; procesos de oxidación avanzada

Abstract

In recent years, concern has risen over the increasing number of toxic compounds detected in the environment such as the emerging pollutants or microcontaminants, which due to their lack of regulation in the current legislation and the ignorance of their short and long-term effects on the environment and the organisms that inhabit it, have become a priority for researchers.

One of the most worrisome effects today is the endocrine disruption that many chemical compounds present. These compounds are incorporated into the environment by industrial and agricultural activity, as well as by effluents of sewage treatment plants, where, in many cases, a complete elimination of them is not achieved. That is why, currently, new technologies are being developed to achieve a complete elimination of this type of substances (Advanced Oxidation Processes).

In addition to evaluating the effectiveness of advanced oxidation treatments at the level of their ability to degrade contaminants, it is necessary to determine the endocrine and cytotoxic activity of the treated water, since the original contaminants can become byproducts of unknown toxic activity.

In this research work, simulated and natural waters artificially contaminated with four micropollutants present in Directive 2013/39 / EC, diclofenac, pentachlorophenol, terbutryn and chlorphenvinphos, and subjected to Advanced Oxidation Processes (Photo-Fenton and ozonation) are going to be evaluated by the RYA assay (Recombinant Yeast Assay) and by cytotoxicity assays. In addition, both the RYA study and the cytotoxicity assays will allow us to assess the efficacy of advanced oxidation treatments and what kind of treatment would be the most appropriate, ozonation or photo-Fenton.

Keywords:

Microcontaminants; endocrine-disrupting activity; RYA assay; cytotoxicity; advanced oxidation processes

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a M^ª Ángeles Castillo y Consuelo Sabater por toda su paciencia y apoyo a lo largo de los últimos meses. Por dedicarme parte de su tiempo y enseñarme tanto, además de su amabilidad y cariño. Sin vosotras esto no habría sido posible. Gracias también a todo el departamento por su ayuda y consejo en momentos de duda.

A Cristina y Widad por todas las horas, días y semanas en la biblioteca. Vosotras habéis conseguido hacer llevadero lo que parecía imposible. A los amigos que han demostrado que sí es verdad que hay vida después de Valencia. Seguiremos viéndonos sea en California, Alemania, Bélgica o cualquier lugar del mundo.

A toda mi familia por comprender mi mal humor y estrés este último año de carrera. Aunque no viera el final del túnel vosotros me habéis animado a seguir adelante.

Gracias a todos vosotros por haber hecho posible la finalización de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción	1
1.1. Contaminación de las aguas y consecuencias ambientales	1
1.2. Contaminantes emergentes	1
1.3. Disruptores endocrinos	2
1.3.1. Efectos sobre la fauna	3
1.3.2. Efectos sobre la salud humana.....	3
1.4. Procesos de oxidación avanzada (POAs)	4
1.4.1 Foto-Fenton.....	5
1.4.2 Ozonización	5
1.5 Valoración de la eficacia de los tratamientos mediante ensayos de toxicidad	6
1.5.1 Bioensayos para medida de la actividad estrogénica	6
1.5.2 Bioensayos con células animales: citotoxicidad.....	8
2. Objetivos y Plan de Trabajo	9
3. Material y Métodos	10
3.1. Contaminantes	10
3.2. Muestras.....	10
3.2.1. Muestras tratadas mediante foto-Fenton	11
3.2.2. Muestras tratadas mediante ozonización	11
3.3. Preparación y extracción de las muestras de agua	12
3.4. Ensayo de actividad estrogénica: Recombinant Yeast Assay (RYA)	13
3.4.1. Organismo de Ensayo	13
3.4.2. Preparación de los Medios de Cultivo.....	13
3.4.3. Preparación de los Reactivos	14
3.4.4 Cultivo de la levadura (cepa ER).....	14
3.4.5 Procedimiento de ensayo.....	15
3.5. Ensayos de Citotoxicidad.....	19
3.5.1. Líneas celulares	19
3.5.2. Medio de cultivo.....	19
3.5.3. Condiciones de crecimiento celular y del ensayo	19
3.5.4. Procedimiento del ensayo.....	19
3.5.5. Análisis estadístico de los resultados	20
4. Resultados y Discusión	21
4.1. Actividad estrogénica de las muestras.....	21
4.1.1. Actividad estrogénica de las muestras tratadas mediante Foto-Fenton	22
4.1.2. Actividad estrogénica de las muestras tratadas mediante ozonización	23
4.2. Actividad citotóxica de las muestras.....	26
4.1.1. Actividad citotóxica de las muestras tratadas mediante Foto-Fenton	26
4.1.2. Actividad citotóxica de las muestras tratadas mediante ozonización	26
5. Conclusiones	29
6. Bibliografía	30
7. Anexos	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Principales tipos de contaminantes emergentes	2
Tabla 2: Procesos de Oxidación Avanzada	4
Tabla 3: Principales características de los contaminantes emergentes	10
Tabla 4: Relación de muestras y experimentos	12
Tabla 5: Actividad estrogénica de las muestras tratadas con Foto-Fenton.....	22
Tabla 6: Actividad estrogénica de las muestras tratadas con Ozonización.	24
Tabla 7: Valores MID (intervalo de confianza al 95%) para tratamiento de ozonización.....	27
Tabla 8: Valores LID para tratamiento de ozonización	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Componentes de la levadura RYA.....	7
Figura 2: Proceso de concentración de las muestras.....	12
Figura 3: Disposición de las muestras, controles y diluciones en la placa multipocillo.....	16
Figura 4: Rectas de regresión: Fluorescencia vs. tiempo.....	21
Figura 5: Actividad relativa de una muestra representativa.....	22
Figura 6: Gráfico de medias e intervalos al 95% para muestras de los distintos tratamientos de Foto-Fenton.....	23
Figura 7: Gráfico de medias e intervalos al 95% para las muestras de los distintos tratamientos de Ozonización	25
Figura 8: Actividad citotóxica de las muestras tratadas mediante ozonización	26

1. Introducción

1.1. Contaminación de las aguas y consecuencias ambientales

El agua, componente esencial para la vida, está involucrada en un sinnúmero de funciones desde el transporte de nutrientes al mantenimiento de la temperatura corporal, además de ser indispensable en numerosos ecosistemas. A pesar de ello, dos quintas partes de la población mundial no tiene acceso a agua potable, siendo contaminada de manera constante durante las últimas décadas (Pandey, 2006).

La contaminación del agua puede provenir de distintas fuentes. Estas incluyen vertidos industriales, fugas de industrias mineras y petroleras o el uso de insecticidas, herbicidas y otros compuestos químicos, los cuales, tras su uso, pueden acabar alcanzando fuentes de agua tanto superficiales como subterráneas (Singh y Gupta, 2016). Por esta razón se recoge en la Directiva Marco del Agua (Europa) las leyes que indican los niveles de contaminantes autorizados.

Existen, por un lado, contaminantes inorgánicos como son los metales pesados. La exposición a éstos a través de la ingesta de agua contaminada puede causar desde daños leves como irritaciones, hasta varios tipos de cáncer (Inyinbor *et al.*, 2016). Pero es el aumento del vertido de contaminantes orgánicos y la mejora de las técnicas analíticas lo que ha hecho sonar las alarmas al respecto (Kolpin *et al.*, 2002). Estos contaminantes orgánicos pueden afectar al sistema nervioso, provocar alteraciones hormonales, entre otros. Entre estos se encuentran herbicidas, tintes y productos farmacéuticos con un importante efecto tóxico y una limitación del uso del agua tras la contaminación (Sharma y Bhattacharya, 2017).

Es por ello por lo que actualmente la preocupación por este tipo de contaminantes orgánicos para el medio ambiente y la salud humana se encuentra muy extendida. Se investigan maneras más económicas y eficientes de detectar estos compuestos y conseguir eliminarlos. Dentro del amplio rango de compuestos contaminantes, los “contaminantes emergentes” o “microcontaminantes” están en el punto de mira por su poca regulación y sus efectos incluso a concentraciones muy bajas.

1.2. Contaminantes emergentes

Los contaminantes emergentes o microcontaminantes se definen como un grupo de compuestos de naturaleza química diversa que pueden suponer un riesgo para el medio ambiente y salud humana, que suelen ser detectados a concentraciones muy bajas (ng/L a µg/L). Debido a esto, pasan desapercibidos en numerosos estudios, a pesar de su distribución ubicua en numerosas fuentes de agua y sus efectos adversos a largo plazo (Bai *et al.*, 2018).

Mencionados por primera vez en el libro “Primavera Silenciosa” de Rachel Carson que atribuía al uso del insecticida DDT (dicloro difenil tricloroetano) la muerte de ciertas especies de aves, en la actualidad comienzan a ganar importancia dentro de la comunidad científica (Sauvé y Desrosiers, 2014). Dentro de este grupo tan heterogéneo, se encierra una amplia gama de productos químicos detectados en aguas superficiales y subterráneas, como productos farmacéuticos y hormonas, drogas ilícitas (Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2008), plaguicidas, productos para el cuidado personal, edulcorantes artificiales, compuestos perfluorados,

subproductos de desinfección (Lapworth *et al.*, 2012), y otros productos químicos industriales que se han detectado a estas concentraciones (Richardson y Ternes, 2018). En la Tabla 1 se nombran algunos de los grupos principales de contaminantes emergentes.

Tabla 1. Principales tipos de contaminantes emergentes.

Grupo	Ejemplos
Productos Farmacéuticos	Carbamazepina, diclofenaco
Productos de Higiene Personal	Galaxolida, parsol MCX
Esteroides y hormonas	Estradiol, estrona, estriol
Nitrosaminas	N-nitrosodimetilamina (NDMA)
Surfactantes	Nonifenol
Plastificantes	Ftalatos, fosfatos de alquilo
Aditivos de combustibles	Metil tert-butil eter (MTBE)

Las rutas a través de las cuales estos contaminantes entran en contacto con las aguas superficiales son bien conocidas y las principales provienen de efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales (EDAR), donde los residuos no se eliminan por completo, y de actividades agrícolas e industriales. El contacto e intercambio entre acuíferos, ríos y las redes de alcantarillado, además de la lixiviación de los campos agrícolas, pueden causar también la contaminación de aguas subterráneas más profundas (Riva *et al.*, 2018).

Como se ha comentado, estos compuestos no se consiguen eliminar por completo mediante EDARs convencionales por lo que su estudio es una de las líneas de investigación de mayor prioridad de las principales organizaciones dedicadas a la protección de la Salud Pública y Ambiental, como la Organización Mundial de la Salud (OMS) o la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA). Siendo este el caso, no existe una regulación específica y los métodos disponibles para su análisis son limitados (Petrie *et al.*, 2015).

Entre ellos se encuentran los disruptores endocrinos (EDC), compuestos químicos exógenos capaces de alterar las funciones del sistema endocrino y como consecuencia, afectando a la salud, siendo este tipo de compuestos en los que se centrará el estudio.

1.3. Disruptores endocrinos

Según la OMS, los disruptores endocrinos son compuestos químicos capaces de provocar alteraciones en el sistema endocrino, afectando al normal funcionamiento de los sistemas hormonales y, por lo tanto, causando efectos adversos para la salud de un organismo o su progenie (Monneret, 2017).

Estos compuestos químicos tienen varios mecanismos de acción: a) Pueden mimetizar la actividad biológica de una hormona endógena uniéndose a un receptor celular; b) también pueden impedir la unión de las hormonas naturales sin llegar a activar el receptor; c) pueden alterar los niveles de hormonas presentes en el flujo sanguíneo, interfiriendo con las proteínas

de transporte e incluso interferir en los procesos metabólicos del organismo, afectando la síntesis o la lisis de las hormonas (Chichizola, 2003).

En cuanto a su composición, el grupo de moléculas identificadas como disruptores endocrinos es altamente heterogéneo e incluye productos químicos y sus derivados como bifenilos policlorados o polibromados, ciertos tipos de plásticos (bisfenol A) y compuestos como el metoxicloro o la vinclozolina (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009). Otros químicos naturales que se encuentran en los alimentos humanos y animales también pueden actuar como disruptores endocrinos (Swartz *et al.*, 2006)

1.3.1. Efectos sobre la fauna

Los estudios en cultivos celulares, animales de laboratorio y fauna silvestre muestran que los EDC pueden causar una amplia gama de problemas reproductivos, de desarrollo, de crecimiento y de comportamiento. La mayoría de estas adversidades se deben a las acciones de los estrógenos, andrógenos y antiandrógenos. Menos estudiadas son las interacciones con otras hormonas y los posibles efectos sobre el sistema inmune, el cerebro (inteligencia, comportamiento), el corazón y los pulmones. Algunos efectos identificados de los EDC en la fauna incluyen, niveles anormales de hormonas en la sangre, órganos reproductivos anormales y mal formados, mortalidad embrionaria, fertilidad reducida, funciones tiroideas alteradas, problemas cerebrales y neurológicos y densidad y estructura ósea alterada (Guillette, 1995).

Además, los fetos y embriones, cuyo crecimiento y desarrollo están altamente controlados por el sistema endocrino, parecen ser especialmente vulnerables a la exposición (Colborn y Clemetet, 1992). Las madres pueden transmitir ciertos contaminantes a sus crías prenatalmente y después del nacimiento mediante la lactancia a los recién nacidos (Haave *et al.*, 2003).

1.3.2. Efectos sobre la salud humana

Los resultados en modelos animales, observaciones clínicas en humanos y estudios epidemiológicos convergen e implican a los EDC también en cambios observados en los patrones de salud humana durante las últimas décadas (Kumar y Pal, 2018). Numerosos estudios han demostrado que los disruptores endocrinos tienen efectos en el sistema reproductivo masculino y femenino, desarrollo de diversos cánceres, neuroendocrinología, funcionamiento tiroides, metabolismo, obesidad y la endocrinología cardiovascular (Guillette, 1995).

Entre los efectos adversos en los que los disruptores endocrinos podrían desempeñar un papel destacan (Guillette, 2000):

- Disminución del recuento de espermatozoides: algunos estudios han reportado disminuciones en el número de espermatozoides en los últimos 50 años.
- Malformaciones congénitas en niños: en los últimos años ha habido un aumento en la incidencia de hipospadias y la criptorquidia. Sin embargo, aún no se ha establecido una asociación causal con la exposición química.
- Cáncer: se ha observado un aumento en la incidencia de cánceres relacionados con las hormonas tanto en mujeres como en hombres. Nuevamente, no se ha demostrado una asociación causal con sustancias químicas.

- Desarrollo neuroconductor retardado: Estudios en Dinamarca y EE. UU. han sugerido que los niños nacidos en áreas contaminadas tienen deterioro de la memoria y la inteligencia.

1.4. Procesos de oxidación avanzada (POAs)

Las EDARs convencionales son uno de los principales mecanismos para la eliminación de contaminantes de las aguas residuales. Se basan en una serie de tratamientos físicos, químicos y biológicos los cuales, en serie, consiguen decantar la mayoría de los sólidos y materia orgánica del agua permitiendo generar así el mínimo impacto. Sin embargo, estos tratamientos no resultan del todo adecuados para alcanzar el grado de pureza requerido por la ley. Para evitar la contaminación de las aguas y, en consecuencia, evitar cualquier daño que estos compuestos contaminantes puedan ejercer sobre el medio ambiente o los seres vivos, resulta necesario el desarrollo de nuevos métodos para alcanzar la eliminación de compuestos emergentes. Los denominados procesos de oxidación avanzada (AOPs), basados en la generación de especies altamente reactivas, son utilizados en muchos casos para eliminar contaminantes de esta naturaleza (Perez *et al.*, 2006, Klavarioti *et al.*, 2009).

En este contexto, los procesos de oxidación avanzada (POAs) se convierten en nuevas y prometedoras herramientas para tratar las aguas residuales con una carga orgánica elevada (Anjali y Shanthakumar, 2019).

Los procesos de oxidación avanzada se basan en la generación de especies químicas oxidantes fuertes, principalmente radicales de hidroxilo, aunque también otras especies como radicales peridroxilo o el oxígeno singlete. Estos radicales son capaces de oxidar compuestos orgánicos, iniciando una serie de reacciones de degradación que pueden conducir a la completa mineralización de los contaminantes en CO₂, H₂O y otros productos estables. Para conseguir la correcta depuración se suele combinar estos POAs con tratamientos convencionales para conseguir eliminar la materia orgánica biodegradable (Deng y Zhao, 2015).

Al existir tal variedad de POAs, resulta difícil clasificarlos. Una de las formas más habituales para su clasificación se basa en la necesidad de la participación de la luz: Procesos fotoquímicos y procesos no fotoquímicos (Tabla 2).

Tabla 2. Procesos de Oxidación Avanzada.

Procesos Fotoquímicos	Procesos No Fotoquímicos
Ultravioleta/ H ₂ O ₂	Ozonización
Ultravioleta/O ₃	Procesos Fenton
Fotocatálisis heterogénea	Oxidación electroquímica
Ultravioleta de vacío	Ozonización con H ₂ O ₂ /O ₃
Foto-Fenton	Descarga electrohidráulica

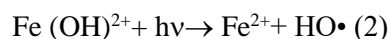
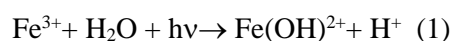
Entre las principales características de los POAs, destacan: la transformación química de los contaminantes, son útiles para tratar mezclas de contaminantes y se consiguen porcentajes de mineralización altos (Milow *et al.*, 1999). Estos procesos son capaces de transformar antibióticos, por ejemplo, en compuestos simples, aunque su aplicación a escala industrial aún se encuentra en desarrollo (Ahmed *et al.*, 20015).

A continuación, se describen los dos tipos de POAs que tienen una relación directa con el presente trabajo.

1.4.1. Foto-Fenton

Una de las formas de obtener radical hidroxilo (HO·) es la reacción de Fenton, utilizando peróxido de hidrógeno y sales ferrosas. Los radicales HO· se generan a partir de una reacción en cadena entre el ion de hierro y el peróxido.

La eficacia del proceso puede mejorarse, pasando a denominarse proceso foto-Fenton si se combina con radiación UV o UV/visible: se producen más radicales hidroxilos y, a su vez, aumenta la velocidad de degradación de los contaminantes orgánicos. La regeneración fotoquímica de iones ferrosos permite que éstos puedan reaccionar nuevamente con H₂O₂ y de esta manera, el ciclo continúa (Gatica *et al.*, 2019). La radiación permite la excitación de las especies de Fe³⁺ hidratadas que, por transferencia de un electrón genera un radical OH adicional, regenerando el ion Fe²⁺. Las reacciones foto-Fenton que producen la degradación del contaminante se describen en las ecuaciones (1) y (2).



El proceso foto-Fenton se considera uno de los más prometedores para la depuración de aguas residuales ya que son capaces de degradar completamente a los contaminantes.

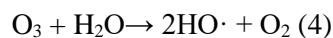
1.4.2. Ozonización

Otro de estos procesos, la ozonización, es ampliamente utilizada en el tratamiento de las aguas, tanto potables como residuales. Permite la eliminación de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos, reduciéndose el olor, color, sabor y turbidez de las aguas (Deng y Zhao, 2015).

Se utiliza el ozono, forma del oxígeno inestable, descomponiéndose espontáneamente a oxígeno, siendo un oxidante fuerte capaz de degradar tanto sustancias orgánicas como inorgánicas. Este, además, puede reaccionar con la mayoría de los contaminantes presentes en aguas residuales. Se trata de un proceso efectivo por su alta reactividad y facilidad de producción, pero su uso se limita en ocasiones por su toxicidad y coste inicial del equipo a utilizar (Sanchis, 2012).

A la hora de trabajar mediante ozonización el pH de la disolución a tratar es clave en la reacción llevada a cabo por el ozono. A pH bajo, se lleva a cabo una reacción directa con el ozono como oxidante principal (Ecuación 3). Por otro lado, a pH elevado, el ozono tiende a descomponerse y la reacción se lleva a cabo por las especies formadas durante la

descomposición tal y como se ilustra en las ecuaciones (3) y (4) (Masten y Davis, 1994; Hoigné y Bader, 1977).



La ozonización estándar puede mejorarse de varias maneras. El uso de radiación ultravioleta, conocido como ozonización fotolítica, aumenta la eficacia del proceso. También pueden utilizarse catalizadores para aumentar la capacidad de oxidación. El uso de catalizadores, tanto homogéneos (Fe^{2+}) como heterogéneos (ZnO), consigue aumentar la tasa de degradación de contaminantes. Además, en el caso de los heterogéneos estos pueden reutilizarse tras su uso.

1.5. Valoración de la eficacia de los tratamientos mediante ensayos de toxicidad

Como se ha comentado, la presencia de componentes estrogénicos en las aguas sirve como indicador del nivel de contaminación de éstas (Noguerol *et al.* 2006). En un principio se utilizaban técnicas como HPLC o GC-MS para su identificación, pero éstas se abandonan por los altos costes, largos tiempos de espera para obtener información relevante y poca resolución para bajas concentraciones (Girotti *et al.*, 2008). Es por ello, que existen otro tipo de herramientas como bioensayos, biomarcadores, etc., para detectar este tipo de contaminantes.

Dado que uno de los principales problemas de los POAs es su alto coste, el uso de ensayos de toxicidad para determinar el estado del agua y los contaminantes que contiene, permite abaratar los costes de estos procedimientos ya que en muchas ocasiones la destrucción total de los contaminantes no es necesaria o es posible utilizar postratamientos biológicos más económicos. Esto se puede determinar mediante ensayos de toxicidad de manera fiable (Fernández-Alba *et al.*, 2002a).

En la actualidad existen una gran cantidad de procedimientos considerados bioensayos, pero en el presente trabajo se describen aquellos relacionados o llevados a cabo durante la realización de éste.

1.5.1. Bioensayos para medida de la actividad estrogénica

Se desarrollan así una serie de ensayos para evaluar la actividad estrogénica de las aguas. Estos ensayos pueden ser tanto *in vivo* como *in vitro*, ambos más eficaces a la hora de identificar sustancias presentes en las muestras. Los ensayos *in vivo* son de mucha utilidad, pero los altos costes y su poca sensibilidad los hace generalmente inadecuados por lo que se utilizan de manera más general los ensayos *in vitro* (Fernández-Alba *et al.*, 2002b).

Estos nuevos ensayos permiten identificar los compuestos con actividad estrogénica y evaluar sus efectos. Se tratan de bioensayos donde se utiliza tejido vivo o un organismo para evaluar los efectos de una sustancia. Estos engloban cualquier ensayo en el cual se evalúa el poder de un compuesto mediante el uso de organismos vivos, desde organismos acuáticos a células animales (Ronco *et al.*, 2004). Además del coste o facilidad de cultivo, la sensibilidad frente al tóxico y la alta disponibilidad se tienen en cuenta a la hora de escoger el tipo de organismo. En estos ensayos, la capacidad de la sustancia estudiada a ser tóxica sobre el

organismo es el factor que se tiene en cuenta, pudiendo ser observado en forma de crecimiento, muerte, cambios morfológicos o histológicos (Svenson *et al.*, 2003)

En líneas generales, no hay un organismo modelo o ensayo general para evaluar todo tipo de compuestos estrogénicos ya que cada uno posee características propias, por lo que es importante desarrollar bioensayos de toxicidad utilizando distintos organismos (Ronco *et al.*, 2004). En cualquier caso, debido a ciertas ventajas en muchos casos se suele utilizar bacterias o células eucariotas como organismos de ensayo.

Bioensayos de actividad estrogénica: uso de levaduras genéticamente modificadas

Dentro de estos nuevos bioensayos se encuentran los ensayos con levaduras, utilizados para identificar compuestos tóxicos por su rapidez, sencillez, reproducibilidad y su bajo coste en comparación con otros métodos de identificación (Noguerol *et al.*, 2006). Además, en la actualidad, se llevan a cabo ensayos con levaduras modificadas genéticamente. Son los denominados ensayos RYA (Recombinant Yeast Assay) en los cuales se basa este trabajo.

El ensayo RYA es uno de los más eficaces para evaluar el potencial endocrino de un compuesto. Este se basa en el uso de una cepa modificada genéticamente de *Saccharomyces cerevisiae*, organismo modelo para células eucariotas. La modificación llevada a cabo es la adición de un receptor estrogénico humano en el ADN de la levadura (hER- α) instalándose como un gen cromosomal, y un gen reportero a nivel plasmidial (Lac-Z), el cual codifica para la síntesis del enzima β -galactosidasa gracias a la ayuda de un promotor transcripcional o elemento de respuesta estrogénica (ERE) y a un promotor fuerte (PGk) (Roda *et al.*, 2006; Céspedes *et al.*, 2004). En la Figura 1 se distinguen los componentes de la levadura utilizada en el ensayo RYA.

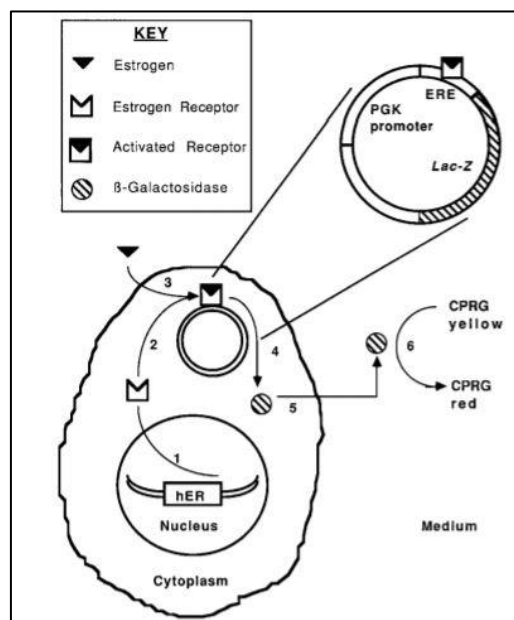


Figura 1. Componentes de la levadura en RYA

Una vez el compuesto con actividad estrogénica entra en contacto con la levadura, este se une al receptor estrogénico humano, activándose así la transcripción y expresión del gen LacZ (reporter gen). La activación de LacZ provoca que se libere la enzima β -galactosidasa. El producto

puede detectarse bien por colorimetría o bien por fluorescencia, en este caso se debe añadir el sustrato Mu-Gal el cual produce fluorescencia (García-Reyero *et al.*, 2001). La cinética de aparición del nuevo compuesto está directamente relacionada con la cantidad de enzima producido, y ésta se relaciona directamente con la concentración de compuesto estrogénico (Noguerol *et al.*, 2006).

Este tipo de ensayo permite evaluar un gran número de compuestos distintos de manera relativamente sencilla, pero se debe tener en cuenta algunos incisos a la hora de utilizarlos. Los ensayos RYA en ocasiones no detectan el compuesto original, sino compuestos secundarios producidos en transformaciones secundarias y, además, solo permiten la detección y cuantificación de la actividad total, de un compuesto o de la muestra que lo contiene. A pesar de esto, se trata de una tecnología muy fiable para compuestos estrogénicos (Noguerol, 2007; Céspedes *et al.*, 2005).

1.5.2. Bioensayos con células animales: citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad se tratan de ensayos capaces de evaluar la toxicidad en células y tejidos al observar cambios en las funciones celulares básicas mediante técnicas de cultivo celular. Al ser tratadas con diferentes compuestos a analizar, las células pueden sufrir cambios que causen su inhibición o muerte celular.

Estas pruebas de citotoxicidad *in vitro* analizan en un ambiente controlado no solo inhibición del crecimiento, sino que también sirven para evaluar síntesis de proteínas y hormonas, carcinogénesis, metabolismo energético y carcinogénesis entre otros. Para evaluar el papel de ciertos tóxicos con potenciales efectos biológicos se utilizado en gran medida ensayos con células de mamífero. Estos métodos son de los más utilizados en la actualidad al estar bien descritos y conocer sus propiedades proliferativas. Algunas de las líneas utilizadas son el ovario de hámster chino (CHO), el riñón de conejo (RK) o las células de cáncer epidermoide humano (Hep-2). Todas estas son utilizadas en ensayos de citotoxicidad, pero cada una es usada en ensayos específicos por distinta metodología o especie/tejido.

Debido a su amplio uso es importante utilizar líneas celulares que se encuentren libres de la presencia de contaminantes biológicos como bacterias, hongos, micoplasmas o virus. Además, se debe conocer su morfología natural, mantener una viabilidad alta y determinar su tasa de multiplicación. Esto permite monitorizar las líneas y así confiar en la calidad de los procesos de almacenamiento prolongado, lo que garantiza contar con sistemas reproducibles (Freshney, 2011).

2. Objetivos y Plan de Trabajo

La creciente contaminación de las aguas y el peligro que esto conlleva, tanto para el medio ambiente como para la salud humana, ha propiciado el desarrollo de nuevos tratamientos, los denominados Procesos de Oxidación Avanzada, utilizados para tratar las aguas contaminadas y reducir así la toxicidad de éstas. Estas técnicas permiten eliminar ciertos contaminantes orgánicos, difíciles de tratar con procesos convencionales, de manera eficiente.

Este trabajo de investigación forma parte del Proyecto de investigación denominado "Tecnologías eficientes para la eliminación de contaminantes de preocupación emergente, contenidas en la Directiva 2013/39/CE o de riesgo significativo según la Directiva 2008/105/CE" (CTQ2015-69832-C4-4-R) y completa la puesta a punto de nuevos tratamientos de foto-Fenton y Ozonización para la eliminación de contaminantes.

A partir de diferentes soluciones acuosas fortificadas con cuatro compuestos químicos, considerados contaminantes emergentes (clorfenvinfos, diclofenaco, pentaclorofenol y terbutrina), tratadas en la Plataforma Solar de Almería mediante Procesos de Oxidación Avanzada (foto-Fenton y ozonización) se establecieron los siguientes objetivos:

1. Detectar y cuantificar la actividad estrogénica de las muestras
2. Detectar y cuantificar la actividad citotóxica de las muestras
3. Evaluar desde el punto de vista toxicológico la eficacia de los tratamientos foto-Fenton y ozonización para la depuración de aguas complejas.

Para la consecución de los anteriores objetivos se traza el siguiente plan de trabajo:

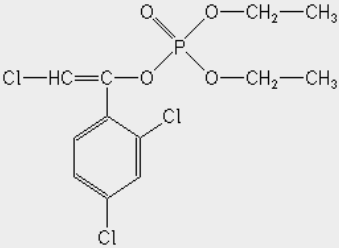
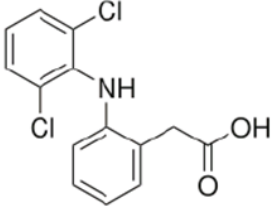
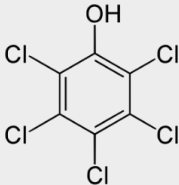
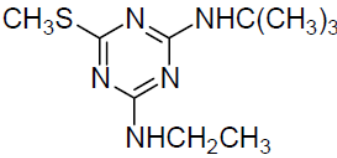
1. Revisión bibliográfica.
2. Preparación de las muestras de agua: extracción, purificación y concentración.
3. Estudio de la actividad estrogénica de las muestras de agua mediante ensayos RYA.
4. Estudio de la citotoxicidad de las muestras de agua mediante ensayos con dos líneas celulares.
5. Tratamiento de datos y discusión de resultados.

3. Material y Métodos

3.1. Contaminantes

Los contaminantes emergentes seleccionados contenidos en las muestras de agua son clorfenvinfos, diclofenaco, pentaclorofenol y terbutrina. En la Tabla 3 se enumeran sus principales características.

Tabla 3. Principales características de los contaminantes emergentes.

Nombre	Fórmula Molecular	Estructura Molecular	Usos
Clorfenvinfos	$C_{12}H_{14}Cl_3O_4P$		Plaguicida, insecticida y larvicida
Diclofenaco	$C_{14}H_{11}NCl_2O_2$		Medicamento antiinflamatorio
Pentaclorofenol	C_6Cl_5OH		Pesticida y preservar madera
Terbutrina	$C_{10}H_{19}N_5S$		Plaguicida y herbicida de temprana acción

3.2. Muestras

Las muestras tratadas han sido proporcionadas por la Unidad de Tratamientos Solares de Agua de la Plataforma Solar de Almería (PSA), perteneciente al Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT).

Se parte de un total de 13 muestras. A continuación, se detallan los procesos y condiciones utilizadas.

3.2.1. Muestras tratadas mediante foto-Fenton

Las muestras proceden de dos experimentos diferentes:

Experimento 1 (FF-1): El primer experimento, llevado a cabo en un Concentrador Parabólico Compuesto (CPC), consistió en agua del grifo diluida al 50% con agua destilada, para rebajar la dureza; el pH fue de 7,9; el agua contenía 200 µg/L de cada uno de los contaminantes emergentes seleccionados y, para llevar a cabo el tratamiento foto-Fenton, la muestra se completó con 10 mg/L de H₂O₂, 5,5 mg/L de Fe (III) y 10 mg/L de sustancias bio-orgánicas (BOS) obtenidas del alperujo procedente de la extracción del aceite de oliva. La muestra fue tratada un tiempo total de 180 minutos. Se tomaron muestras antes de iniciar el tratamiento, a los 45 minutos y al final del tratamiento.

Experimento 2 (FF-2): El segundo experimento, se llevó a cabo en agua simulada de salida de EDAR (Zhang *et al.*, 2007) con un pH entre 7 y 8 a la cual se añadieron 200 µg/L de cada contaminante seleccionado, 10 mg/L de H₂O₂, 5,5 mg/L de Fe (III) y 10 mg/L de BOS. El tiempo total de tratamiento fue de 180 min; se tomaron muestras antes de iniciar el tratamiento, a los 45 minutos y al final del tratamiento. El experimento fue también llevado a cabo en el CPC.

3.2.2. Muestras tratadas mediante ozonización

Las muestras proceden de tres experimentos diferentes, que hemos enumerado correlativamente a los anteriores.

Experimento 3 (Oz-1): El tercer experimento, se llevó a cabo únicamente utilizando O₃ para tratar el agua. El agua contenía 200 µg/L de cada contaminante seleccionado y se protegió de la luz en todo momento. El tiempo total del tratamiento fueron 90 minutos; se tomaron muestras antes de iniciar el tratamiento (válida para todos los experimentos realizados), a los 30 minutos y al final del tratamiento.

Experimento 4 (Oz-2): El experimento cuatro, se llevó a cabo utilizando O₃ y, al mismo tiempo, 5,5 mg/L de Fe³⁺ y 20 mg/L de H₂O₂ como catalizadores. El agua contenía 200 µg/L de cada contaminante emergente). El experimento se llevó a cabo en condiciones de oscuridad y duró 120 minutos. Se tomaron muestras, a los 30 minutos y al final del tratamiento.

Experimento 5 (Oz-3): El quinto experimento consistía en un tratamiento con O₃ completado con 5,5 mg/L de Fe³⁺ y 20 mg/L de H₂O₂ como catalizadores. El agua contenía 200 µg/L de cada contaminante emergente. El experimento se llevó a cabo sin condiciones de oscuridad. El tiempo total del tratamiento fue de 120 minutos; se tomaron muestras, a los 40 minutos y al final del tratamiento.

En todos los experimentos se utilizó agua simulada de salida de EDAR (Zhang *et al.*, 2007). En la Tabla 4 se enumeran los experimentos y muestras.

Tabla 4. Relación de muestras y experimentos.

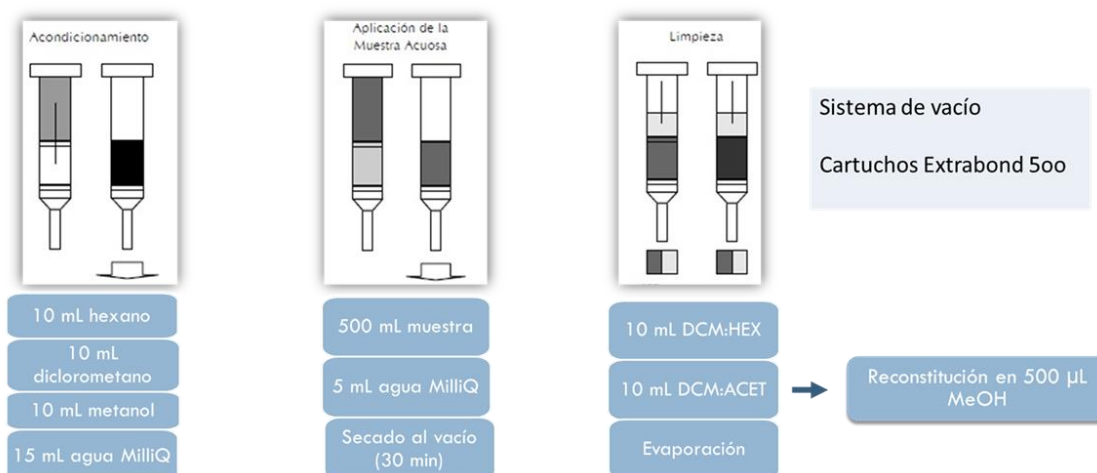
Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4	Experimento 5
FF-1-Inicial	FF-2-Inicial	Oz-Inicial		
FF-1-45min	FF-2-45min	Oz-1-30min	Oz-2-30min	Oz-3-40min
FF-1-180min	FF-2-180min	Oz-1-90min	Oz-2-120min	Oz-3-120min

3.3. Preparación y extracción de las muestras de agua

Con el fin de eliminar los sólidos en suspensión o cualquier otro contaminante presente, las muestras de agua fueron previamente filtradas a través de papel (papel Whatman nº1). Seguidamente las muestras son concentradas mediante un sistema de vacío (Extra Vac 12, Scharlab) con cartuchos SPE (Solid Phase Extraction) (Extrabon EBH 500 mg, 6 mL, Scharlab).

Los cartuchos SPE se pre-acondicionan con 10 mL de hexano, 10 mL de diclorometano, 10 mL de metanol y, finalmente, 15 mL de agua MilliQ (Millipore). Se trabaja a un flujo de 5 mL/min. Todos los disolventes utilizados son grado HPLC (J.T. Baker).

Una vez acondicionados, se hace pasar un volumen de la muestra de agua a través de los cartuchos a un flujo de 10 mL/min. Se filtra un total de 1000 mL. Finalmente, el cartucho se lava con 5 mL de agua y se seca al vacío en desecador durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo, los contaminantes orgánicos retenidos en la matriz del cartucho son eluidos mediante 10 mL de diclorometano:hexano (1:1, v/v), seguido de 10 mL de diclorometano: acetona (1:1, v/v). Mediante un rotavapor (Selecta) se consigue evaporar el eluyente y la muestra seca se reconstituye con 1000 μ L de metanol. Los extractos de las muestras se depositan en recipientes opacos de 2 mL y se almacenan en el congelador a -20 $^{\circ}$ C para poder ser utilizados en el análisis más adelante. En la Figura 2 se muestra de forma esquemática el método descrito.

**Figura 2.** Proceso de concentración de las muestras en cartuchos.

3.4. Ensayo de actividad estrogénica: Recombinant Yeast Assay (RYA)

La actividad estrogénica de las muestras de agua se cuantifica mediante el ensayo de levadura recombinante (Recombinant Yeast Assay). Este bioensayo se basa en el uso de una cepa recombinante de levadura para analizar la actividad estrogénica.

3.4.1. Organismo de Ensayo

El organismo utilizado en el ensayo RYA pertenece a la especie *Saccharomyces cerevisiae* modificada genéticamente para detectar compuestos estrogénicos (cepa ER). En concreto, se le añade el gen hER- α , receptor estrogénico humano, y un gen reportero Lac-Z, el cual codifica para la síntesis del enzima β -galactosidasa frente a un elemento de respuesta estrogénica (ERE) y a un promotor fuerte (PGk).

3.4.2. Preparación de los Medios de Cultivo

Suplementos

Para el crecimiento de la cepa ER es necesario preparar las siguientes soluciones:

- histidina (Sigma-Aldrich) al 1%, riqueza $\geq 98\%$
- metionina (Sigma-Aldrich) al 1%, riqueza $\geq 98\%$
- glucosa (Sigma-Aldrich) al 40%

La solución de histidina, además de almacenarse a 4 °C, se debe envolver con papel de aluminio para protegerla de la luz.

Medio Enriquecido (YPD)

El medio enriquecido YPD, fundamental para el crecimiento de la levadura, se prepara a partir de 50 g de YPD (Yeast Peptone Dextrose, Difco) los cuales se disuelven en 1 L de agua MilliQ. El medio se reparte en tubos de ensayo a razón de unos 2 mL, son esterilizados en autoclave (15 min, 121 °C). Si se necesitara preparar placas con medio sólido del medio YPD, se añadirían 20 g/L de agar-agar (Bacto Agar, Difco). Tras autoclavar y atemperar se reparte en las placas Petri.

Medio selectivo SD-ER

El primer paso es preparar el medio selectivo SD (Synthetic Dextrose). Para ello se pesan 1,7 g de YNBAA/AS (Yeast Nitrogen Base, Difco) y 5 g de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Panreac). Estos componentes se disuelven en 1L de agua MilliQ y el medio se esteriliza en autoclave. Para su almacenamiento se debe conservar en refrigeración a 5-6 °C.

Para el cultivo de la cepa recombinante, el medio SD debe complementarse con los aminoácidos y la glucosa previamente preparados. Para un volumen total de 100 mL, se añaden 5 mL de la solución de glucosa al 40%, fuente de carbono necesaria para el crecimiento de la levadura. A continuación, se añaden los aminoácidos, necesarios para completar la auxotrofia: 100 μL de la solución de histidina y 100 μL de la solución de metionina. Tras añadir todos los componentes, se enrasa con medio SD hasta completar un volumen final de 100 mL. Para conservar la esterilidad del medio y evitar cualquier contaminación todo este procedimiento se realiza en condiciones de asepsia.

3.4.3. Preparación de los Reactivos

Tampón Z

El tampón Z se prepara a partir de los siguientes stocks: Na₂HPO₄ (Scharlau) 60 mM, NaH₂PO₄ (Scharlau) 40 mM, KCl (Scharlau) 10 mM, MgSO₄ (Panreac) 1mM.

Para preparar 1 L de tampón Z se añaden 600 mL de Na₂HPO₄ 0,1 M, 40 mL de NaH₂PO₄ 1 M, 10 mL de KCl 1 M, 10 mL de MgSO₄ 0,1 M y se enrasa con agua MilliQ hasta alcanzar un volumen de 1L. El pH se ajusta a 7.

Sustrato MU-Gal

A partir de 100 mL de tampón Z, 1 mL de tritón x-100 al 10% (Fisher Chemical), 1 mL de SDS 10% (Fisher Chemical), 21 mg de Mu-Gal (4-metilumbeliferil b-d galactosidase) (Sigma-Aldrich) y 70 µL de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) se prepara el sustrato MU-Gal.

El MU-Gal se disuelve junto con el resto de los componentes en el Tampón Z excepto el β-mercaptoetanol que debe añadirse justo antes de la reacción. La disolución se deja en agitación toda la noche a unos 35-38 °C y protegida de la luz con papel de aluminio. A la mañana siguiente, se realizan alícuotas en tubos Falcon y se añade el β-mercaptoetanol. Los Falcon se conservan en oscuridad a -20 °C.

Patrón 17β- Estradiol (E2) (Control Positivo)

Para evaluar la actividad estrogénica se utiliza como patrón la hormona 17β- estradiol (E2) a una concentración de 10 µM. Para ello, se pesa 1 mg de estradiol E2 (Sigma-Aldrich) y se disuelve en 1,5 mL de metanol (grado HPLC). Se obtiene así una solución 2.4 mM. Tras esto, se diluye a 100 µM y, a continuación, se diluye nuevamente para conseguir la concentración de 10 µM. Se conserva a -20 °C.

3.4.4 Cultivo de la levadura (cepa ER)

Conservación de la cepa

La levadura utilizada *Saccharomyces cerevisiae* crece de manera óptima a 30 °C tanto en medio YPD como en medio selectivo SD.

Para su conservación a largo tiempo, tras hacer crecer la levadura de forma abundante en el medio de cultivo apropiado, se inoculan en crioviales Microbank™-Blue (Pro-Lab Diagnostics) y se guardan a -40 °C, obteniendo así, un stock de la cepa.

A partir del stock se pueden obtener colonias frescas para el ensayo tomando uno de los críotubos y realizando una siembra en placa con el medio selectivo apropiado. Las placas se incuban a 30 °C permitiendo la aparición de colonias a los 3 días aproximadamente. Estas placas pueden almacenarse en nevera a 5 °C durante un mes. Siguiendo este método de stock y placas en refrigeración se consigue mantener colonias de levadura listas para el ensayo en todo momento.

Preparación de la levadura para el ensayo RYA

Se pretende conseguir el crecimiento exponencial de la levadura partiendo de cultivos en medio sólido. Se inocula una colonia en un tubo de ensayo con 2 ml de medio YPD. El cultivo se incuba en agitación (120 rpm) a 30 °C durante 17 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación se siembra un volumen de 25 µL de cultivo en YPD en 50 mL de medio SD-ER contenido en un matraz Erlenmeyer, de esta manera, tras la incubación (30 °C, agitación orbital a 150 rpm, 17 h) se obtiene un cultivo cuya densidad óptica (DO) medida a 600 nm está entre 0,08 y 0,15, la cual indica que la levadura está en la fase de crecimiento exponencial. Una DO (600 nm), de 0,1 equivale a 2×10^6 células/mL. Con una DO inferior al valor fijado (0.08), se debería volver a dejar el matraz en el incubador para permitir el crecimiento de la levadura. En el caso contrario, una DO mayor de 0.15 supondría la necesidad de diluir el cultivo hasta obtener la DO adecuada.

3.4.5 Procedimiento de ensayo

Preparación de la placa

El ensayo se lleva a cabo en placas multipocillo de polipropileno (NUNCTM, Thermo Scientific). Se realiza el ensayo mediante diluciones seriadas de la muestra, además de los correspondientes controles como se detalla a continuación:

- **Columna 1:** cultivo + extracto de la muestra.
- **Columna 2 a 9:** cultivo + metanol (5%) + diluciones de la muestra.
- **Columna 10 (Control de toxicidad):** cultivo + patrón (E2) + muestra.
- **Columna 11 (Control positivo):** cultivo levadura + patrón (E2).
- **Columna 12 (Control negativo):** cultivo levadura + metanol (5%).

Se preparan las siguientes soluciones para realizar el ensayo:

- **Solución A:** Cultivo levadura + 5% de metanol
- **Solución B:** Cultivo levadura + E2 (1 µL de E2 (10 µM) / mL de cultivo)

Tras esto se procede a la carga de la placa con una pipeta multicanal siguiendo un orden constante para evitar errores:

1. Columna 1: 190 µL de cultivo levadura y 10 µL muestra, obteniendo así la dilución 1/20 de la muestra.
2. Columnas 2 - 9 y 12 (Control negativo): 50 µL de la solución A.
3. Columnas 10 (Control toxicidad) y 11 (Control positivo): 50 µL de la solución B.
4. Mezclar mediante pipeteo el contenido de la columna 1, pasar 50 µL a la columna 2 y otros 50 µL a la columna 10 (Control de toxicidad).
5. Mezclar mediante pipeteo el contenido de la columna 2 y pasar 50 µL a la columna 3. Repetir esta operación hasta la columna 9.

6. Con el fin de que el volumen de todos los pocillos de la placa sea de 50 μ L se desechan 50 μ L de las columnas 1, 9 y 10.

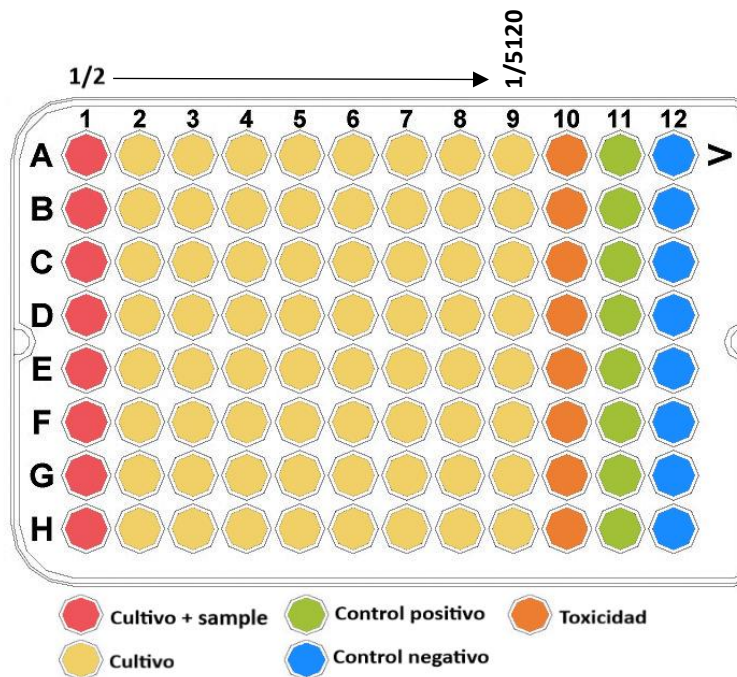


Figura 3. Disposición de las muestras, controles y diluciones en la placa multipocillo.

En cada placa se ensayan 2 muestras con 4 réplicas cada una. De la fila A a la D se ensaya una muestra y de la fila E a la H se ensaya la segunda muestra.

Mediante la columna 10 (control toxicidad) se pretende aclarar el motivo por el que una muestra no resulte en respuesta. Si la falta de señal se debe a la ausencia de compuestos susceptibles de unirse al receptor específico, la respuesta en esta columna será aproximadamente la misma que la del control positivo. Pero si la muestra resulta tóxica para la levadura, la señal de estos pocillos será menor que la del control positivo.

Incubación de la placa

Tras la completa carga de la placa, ésta se envuelve en papel de aluminio para protegerla de la luz y se incuba a 120 rpm a 30 °C durante 6 horas. Tras el periodo de incubación se añade el YPER (Yeast Protein Extraction Reagent) (Thermo Scientific). Se trata de un tampón de lisis que permite extraer las proteínas solubles de la levadura permeabilizando la pared de esta.

Se añaden 50 μ L de YPER a todos los pocillos de la placa y se vuelve a incubar la placa durante 30 minutos a 30 °C sin agitación. En el caso de que la lectura de la placa no pudiera realizarse el mismo día, tras la adición del YPER esta debería envolverse y congelar de inmediato a -20 °C. Para volver a descongelarla se incuba al día siguiente a 30 °C durante 60 minutos.

Adición del MU-Gal: reacción enzimática

Tras la incubación de la placa se añade a cada pocillo 75 μL de la solución MU-Gal descongelada y a temperatura ambiente. Se añade la solución en exceso para asegurar que la reacción enzimática se ha realizado al completo. Esta reacción enzimática será iniciada por la solución de MU-Gal si la muestra añadida contenía compuestos capaces de unirse al receptor específico.

La velocidad de trabajo es muy importante en esta etapa, ya que la reacción enzimática podría saturarse si se tarda demasiado. Para minimizar el tiempo de adición, se realiza la carga de la placa empezando por la columna 12 de manera descendente, ya que las columnas 10-12 son controles y la columna 9 es la muestra más diluida (reacción más lenta que una con menor dilución) Tras la adición del sustrato MU-Gal, se centrifuga la placa a 1000 rpm durante 1 minuto con el fin de que los restos celulares se depositen.

Lectura de la placa

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

Método de cálculo de equivalentes

La lectura de la placa da como resultado una serie de medidas de fluorescencia. La cantidad de fluorescencia observada coincide con la actividad de la enzima β -galactosidasa. La actividad es proporcional a la cantidad de enzima presente y ésta, a su vez, es proporcional a la cantidad de complejo ligando-receptor (L-R) que se forma. Este complejo se forma al unirse el compuesto con supuesta actividad con el receptor específico que al unirse al elemento de respuesta activa la expresión del gen LacZ. Este gen es el que codifica para la enzima β -galactosidasa que al actuar sobre el MU-Gal producirá la fluorescencia. Dicha actividad de la enzima se calcula a partir de la pendiente de rectas obtenidas por métodos de regresión (fluorescencia frente a tiempo).

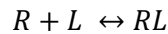
La relación entre fluorescencia y actividad se asume estableciendo que la concentración de receptor libre es mucho menor que la concentración de hormona, que todo el complejo L-R que se forma se une al DNA activando la transcripción del gen LacZ y que la cantidad de fluorescencia obtenida en la reacción enzimática es proporcional a la cantidad de enzima producido por la acción de L-R. Además, es imprescindible que la concentración de sustrato sea mayor que la constante de disociación, K_d , para que la reacción no esté limitada por el sustrato.

El cálculo de la actividad de β -galactosidasa se realiza usando la actividad del control positivo (17 β -estradiol) y el control negativo obteniendo así los valores de actividad mínima y actividad máxima que permiten calcular una actividad relativa (A_{rel}) siguiendo la ecuación (1').

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

De esta manera se obtiene una curva dosis-respuesta representando A_{rel} frente las distintas diluciones de las muestras. Esta curva permite calcular una A_{rel} del 50% de la A_{rel}

máxima. También se determina la constante de disociación, K_d , considerando R y L como receptor y compuesto respectivamente.



$$R_t = [R] + [RL]$$

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

Se sabe que la respuesta del compuesto, A_{rel} , es proporcional a la cantidad de R-L que se forma respecto a R_t . Siguiendo la ecuación (3') que logra relacionar A_{rel} con la constante de disociación K_d , es posible calcular K_d a partir de la curva dosis-respuesta como se observa en la ecuación (4').

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

$$R_t = [R] + [RL]$$

$$A_{rel} = \frac{[RL]}{[R] + [RL]} = \frac{\frac{[RL]}{[RL]}}{\frac{[R]}{[RL]} + \frac{[RL]}{[RL]}} = \frac{1}{1 + \frac{[R]}{[RL]}} = \frac{1}{1 + \frac{K_d}{[L]}} \quad (3')$$

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

Asumiendo que la mitad del receptor disponible está formando el complejo R-L, se asume que la respuesta obtenida será la mitad de la respuesta máxima.

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

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

La EC_{50} corresponde a la concentración de ligando (L) que produce la mitad de la respuesta máxima. K_d también se define como la concentración de ligando que produce la mitad de la respuesta máxima, por lo que ambos son iguales como señala la ecuación (5').

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

Se debe calcular y trabajar con una K_d aparente ($K_d \text{ app}$) ya que se trabaja con valores de dilución y se desconoce la concentración de ligando (compuesto) en las muestras.

$$K_d = [L]_{EC_{50}}$$

$$K_d \text{ app} = \frac{1}{[L]_{EC_{50}}} = \frac{1}{K_d}$$

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

$$K_d \text{ app} = \frac{1}{1/f_d \times (1/A_{rel} - 1)} \quad (6')$$

Finalmente, como se suele desconocer los compuestos con actividad estrogénica en las muestras y se desea comparar los resultados entre ellos y con los obtenidos en otros ensayos, los resultados se expresan en equivalentes (EEQ). Estos representan la concentración de ligando de referencia con la que se obtendría la misma respuesta que la que presenta la muestra analizada. Estos equivalentes se calculan teniendo en cuenta la EC_{50} de los patrones utilizados (72,7308 ng/L para E2) y la dilución en la que se obtiene la EC_{50} de la muestra.

$$EEQ = EC_{50 \text{ patrón}} \times K_d \text{ app}$$

3.5. Ensayos de Citotoxicidad

3.5.1. Líneas celulares

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

3.5.2. Medio de cultivo

El medio empleado para el mantenimiento de las células y el ensayo de citotoxicidad ha sido DMEM (4,5 g de D-glucosa/L) suplementado con 20% de suero fetal bovino, 2% de penicilina/estreptomicina y 1% de L-glutamina.

3.5.3. Condiciones de crecimiento celular y del ensayo

Las células crecen, tras su descongelación, en una incubadora a 37 °C y en una atmósfera con 5% de CO_2 . Previamente, se preparan los cultivos de las células en placas Petri tratadas, se dejan crecer en la incubadora y, al alcanzar la subconfluencia se procede a una tripsinización, con el fin de preparar una suspensión celular de $1 \cdot 10^5$ células/mL.

3.5.4. Procedimiento del ensayo

Se ensayan diluciones seriadas (1:1 a 1:512) preparadas en metanol a partir de la solución madre (muestras complejas concentradas; apartado 3.3.). Se trabaja siempre en condiciones de esterilidad, en cabina de flujo laminar.

El ensayo de citotoxicidad se lleva a cabo en placas transparentes de fondo plano de 96 pocillos tratadas especialmente para cultivo de células. Se dispensan 100 μ L de la suspensión celular en cada pocillo (excepto los pocillos de la primera columna que se llenan con PBS; control negativo). Se realizan 8 réplicas de control positivo y 4 de cada una de las diluciones de ensayo. Después de 24 horas de incubación se añaden a cada pocillo 5 μ L de la dilución correspondiente y se incuba de nuevo. A las 24 horas se dispensan en cada pocillo 30 μ L de una solución 6,6 μ M de resazurin (Alamar Blue). Finalmente, se incuban las placas durante 4 horas y se mide la fluorescencia (Ex560/Em590) en el lector Tecan Infinite M200. Con los datos de fluorescencia se

calculan los porcentajes de viabilidad celular, tomando el crecimiento de los controles como referencia (100 % de viabilidad).

3.5.5. Análisis estadístico de los resultados

Los resultados obtenidos expresados porcentajes de viabilidad celular se analizan mediante ANOVA con el programa Statgraphics Plus (v. 5.1), con el objetivo de determinar diferencias significativas entre las distintas diluciones de las muestras y los controles. A partir del análisis ANOVA se calcula el valor LID (mínima dilución sin efecto) de cada ensayo. Para obtener el valor MID (dilución que produce el 50% de respuesta) y sus intervalos de confianza del 95 %, se realiza un análisis Probit utilizando el programa SPSS (v. 16.0).

4. Resultados y Discusión

4.1. Actividad estrogénica de las muestras

Proceso de tratamiento de datos

Se muestra, a continuación, un ejemplo del proceso de obtención de resultados y tratamiento de los mismos tras realizar el ensayo de disrupción endocrina RYA. A partir de los datos de fluorescencia, medidos en cada uno de los pocillos de la placa de ensayo a lo largo del tiempo, se obtienen las correspondientes rectas de regresión, cuyas pendientes representan la medida de la actividad del enzima β -galactosidasa. En La Figura 4 se muestra el gráfico correspondiente a dichas rectas.

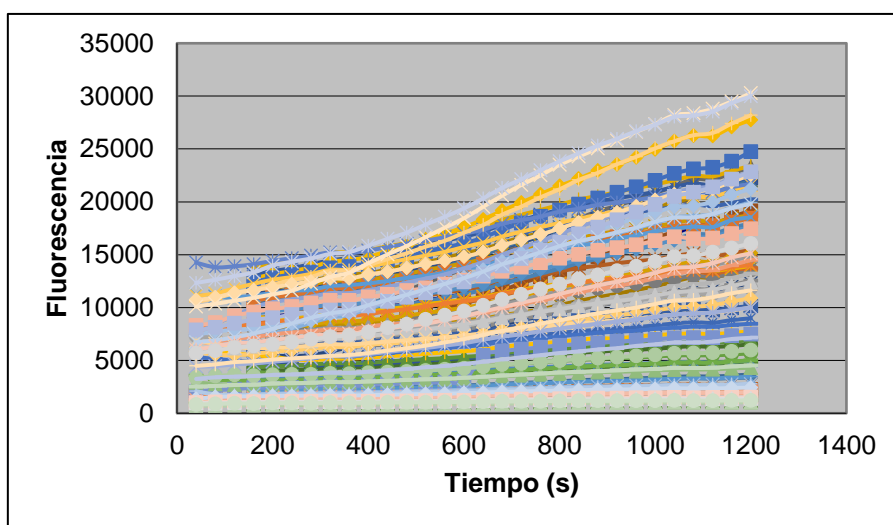


Figura 4. Rectas de regresión: Fluorescencia vs. Tiempo.

A partir de los valores de las pendientes de cada recta (actividad del enzima β -galactosidasa) se obtiene la Actividad Relativa (A_{rel}) de las muestras siguiendo la ecuación 1' (punto 3.4.5. del apartado Material y Métodos), utilizando las A_{max} y A_{min} a partir de los controles positivo y negativo, respectivamente. La Figura 5 representa la Actividad relativa, real y teórica, de una muestra con sus cuatro réplicas.

A partir de esta Actividad relativa es posible calcular los equivalentes (EEQ) que representan la concentración de ligando de referencia (E2) necesaria para obtener la misma respuesta que la que tiene la muestra analizada. El valor de EC_{50} es 72,73 ng/L para E2.

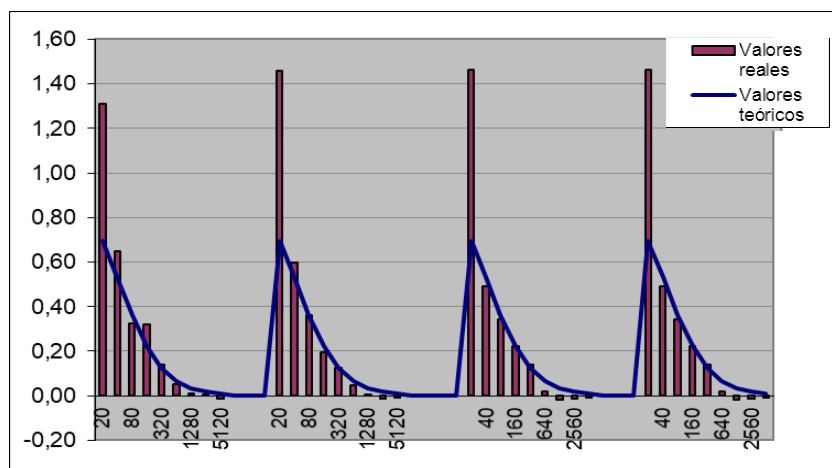


Figura 5. Actividad relativa de una muestra representativa.

4.1.1. Actividad estrogénica de las muestras de agua tratadas mediante Foto-Fenton

En la Tabla 5 se muestran los valores de EEQ de E2 obtenidos para las muestras tratadas mediante Foto-Fenton y la constante de disociación (K_d) asociada a la muestra de agua analizada.

Mediante el ensayo RYA y los valores de EEQ es posible evaluar el grado de toxicidad de las muestras de agua ya que éstos equivalen a la concentración de ligando de referencia (E2) con la que se obtendría la misma respuesta. De manera que valores mayores de EEQ suponen una mayor toxicidad de la muestra analizada.

Tabla 5. Actividad estrogénica de las muestras tratadas con Foto-Fenton.

Muestra	K_d	EEQ (ng/L)
FF-1-Inicial	9,6	0,7 ^a
FF-1-45min	91,2	6,6 ^b
FF-1-180min	52,8	7,0 ^b
FF-2-Inicial	54,5	3,9 ^a
FF-2-45min	45,7	3,3 ^a
FF-2-180min	68,7	5,0 ^b

^{a,b}: Cambio de superíndice indica que existen diferencias significativas ($p > 0,05$)

Los resultados indican que todas las muestras han sido positivas para la medida de la actividad estrogénica, tanto en el experimento FF-1 como en el experimento FF-2. Destaca un aumento significativo de la actividad de las muestras a lo largo del tratamiento para ambos experimentos (Test de múltiple rango y diferencia mínima significativa de Fisher). La diferente composición del agua (agua de grifo y agua simulada de EDAR) ha resultado en diferencias en la actividad estrogénica, tal y como se observa en las muestras iniciales de cada experimento.

En la Figura 6 se observa las medias de actividad estrogénica, para cada muestra y experimento, y los intervalos al 95% de confianza.

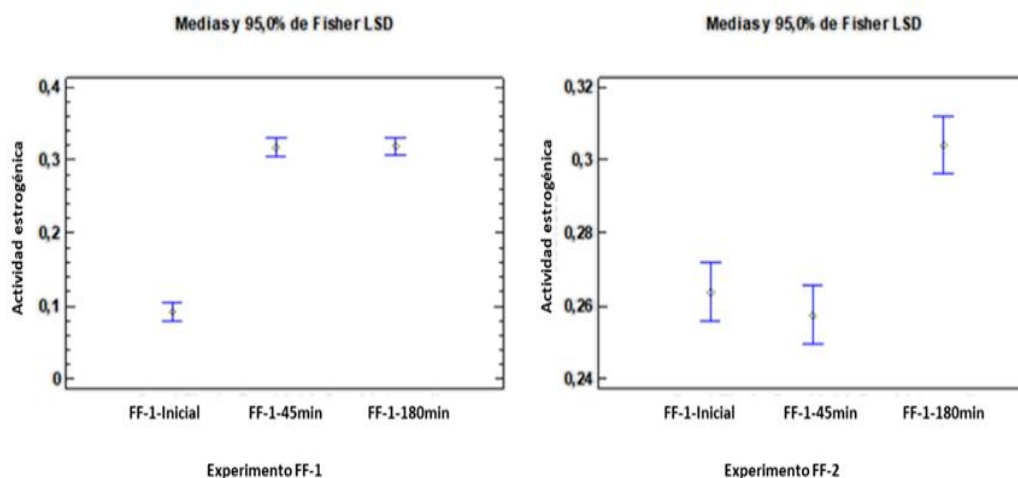


Figura 6. Gráfico de medias e intervalos al 95% de muestras para los tratamientos de Foto-Fenton.

El proceso foto-Fenton no ha resultado efectivo ya que no se alcanza una detoxificación completa de las muestras. Esto coincide con los gráficos de seguimiento de contaminantes a lo largo del proceso de foto-Fenton (Anexo 3, Figura 3.1) donde se observa que la eliminación de los cuatro compuestos no ha sido total. Se aprecia una disminución en la concentración de los compuestos al final del tratamiento, siendo ésta mayor para diclofenaco y pentaclorofenol, pero la concentración de terbutrina y clorfenvinfos continúa siendo muy elevada.

El aumento repentino de EEQ en las muestras intermedia y final del FF-1 y la muestra final de FF-2 podría deberse a la eliminación casi por completo del compuesto diclofenaco, el cual estaría ejerciendo un efecto antagónico sobre el resto de los compuestos, lo que hace que la muestra inicial tenga menor actividad. La detoxificación del diclofenaco a tiempos iniciales supondría un aumento de la actividad estrogénica con el paso del tiempo. Este aumento de la actividad también puede ser causado por los posibles productos intermedios, subproductos que se forman durante el proceso. En algunos casos, se ha encontrado que la toxicidad de la muestra crece durante el tratamiento debido a la formación de intermediarios tóxicos. Es importante tener en cuenta que diferentes procesos darán diferentes productos intermedios (Oller *et al.*, 2011). La degradación parcial de los compuestos durante el transcurso del ensayo podría conllevar la generación de otros subproductos que aumentan la actividad estrogénica de la muestra.

4.1.2. Actividad estrogénica de las muestras de agua tratadas mediante Ozonización

En la Tabla 6 se muestran los valores de EEQ obtenidos para las muestras tratadas mediante ozonización, así como la constante de disociación (K_d) asociada a las muestras de agua analizadas.

Tabla 6. Actividad estrogénica de las muestras tratadas con Ozonización.

Muestra	K _d	EEQs (ng/L)
Oz-Inicial	390,1	28,4 ^a
Oz-1-30min	31,4	2,3 ^b
Oz-1-90min	4,0	0,3 ^b
Oz-Inicial	390,1	28,4 ^a
Oz-2-30min	3,6	0,3 ^a
Oz-2-120min	141,6	10,3 ^b
Oz-Inicial	390,1	28,4 ^a
Oz-3-40min	94,5	6,9 ^a
Oz-3-120min	56,1	4,1 ^a

^{a,b}: Cambio de superíndice indica que existen diferencias significativas ($p > 0,05$)

En este caso, de manera distinta a lo que ocurre con las muestras tratadas con foto-Fenton, sí que se observa una reducción de EEQ a lo largo del tiempo, siendo las muestras no tratadas (tiempo inicial) las de mayor actividad estrogénica. Se observa una disminución significativa de EEQ en los tres experimentos realizados, observando la mayor reducción en el experimento Oz-1. Se considera, por lo tanto, este tratamiento como el más efectivo a la hora de tratar aguas contaminadas con este tipo de contaminantes. Cabe destacar el aumento repentino de EEQ en el experimento Oz-2. En éste se observa una reducción considerable a tiempo intermedio, pero un aumento significativo a tiempo final.

La Figura 7 muestra las medias de actividad estrogénica, para cada muestra y experimento, y los intervalos al 95% de confianza.

Las diferencias apreciadas en cuanto a EEQ en los tres experimentos pueden deberse a las distintas condiciones en los que éstos se llevaron a cabo. Los experimentos Oz-1 y Oz-2 resultaron en un descenso inicial de la actividad estrogénica mayor que el experimento Oz-3 (alcanzaron EEQ menores a tiempo intermedio). El hecho de que las dos primeras muestras estuvieran bajo condiciones de oscuridad pudo ser un factor decisivo en este hecho. El uso de Fe³⁺ y H₂O₂ como catalizadores no se vio reflejado en los resultados, ya que el experimento Oz-1, tratado sin éstos, fue el más eficiente.

Murk *et al.* (2002) afirman que con una concentración de 0,3 ng/L de EEQ se producen efectos adversos sobre la puesta de huevos en peces al estimular la producción de vitelogenina; cantidades entre 2 y 10 ng/L producen efectos sobre el desarrollo sexual y machos inmaduros, respectivamente, en diversas especies de peces. Los valores detectados en las muestras estudiadas en el presente trabajo están a niveles semejante e incluso superiores a los descritos en la bibliografía.

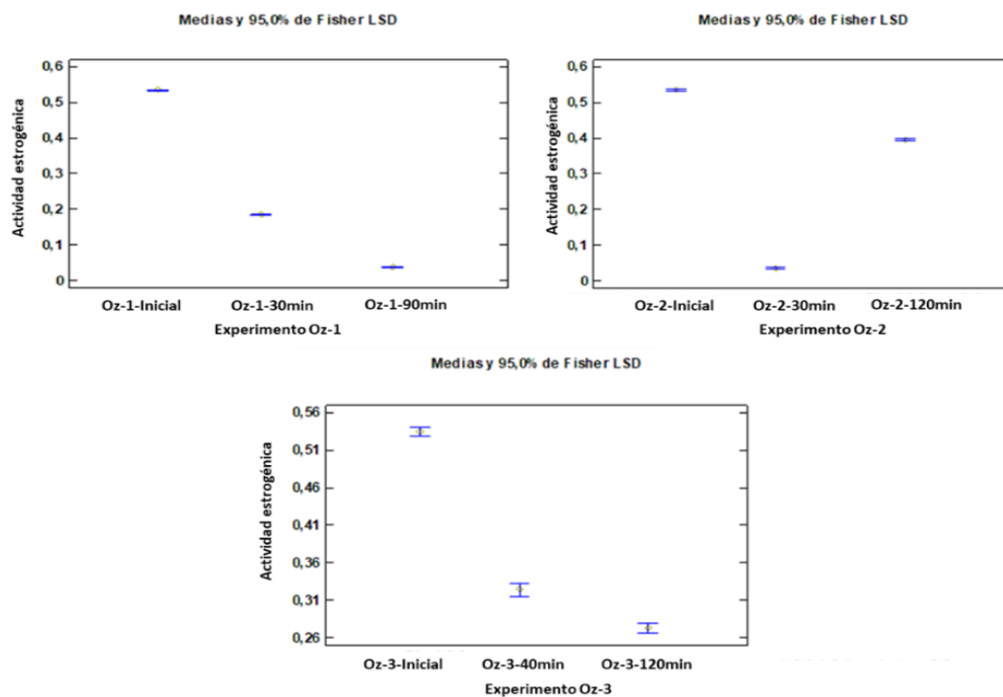


Figura 7. Gráfico de medias e intervalos al 95% para las muestras de los distintos tratamientos de Ozonización

Existen, a su vez, diferencias en la matriz utilizada en los tratamientos de foto-Fenton y ozonización. En Foto-Fenton se utilizaron aguas diluidas que contenían los compuestos, mientras que los procesos de ozonización se llevaron a cabo en aguas simuladas de EDAR. Esta diferencia pudo también ser clave a la hora de reducir la actividad estrogénica de las muestras.

Sumado a esto, según los gráficos de seguimiento de contaminantes a lo largo del proceso de ozonización (Anexo 3, 3.2) también destaca la eficacia del experimento Oz-1, en el que se alcanza un mayor grado de eliminación de los contaminantes. Se observa al mismo tiempo cómo, mediante el tratamiento con ozono, se consigue eliminar de manera más eficiente la terbutrina y el clorfenvinfos, compuestos difíciles de eliminar mediante tratamientos foto-Fenton.

Como ya se ha mencionado, el presente estudio forma parte de un Proyecto de investigación coordinado. Calomarde (2017) realizó un estudio de actividad estrogénica de los compuestos que forman parte de la mezcla detectando mayor actividad estrogénica para los compuestos clorfenvinfos y la terbutrina, coincidiendo con los compuestos de mayor dificultad para ser degradados en los tratamientos. Apenas existe en la bibliografía estudios en los que se investigue la actividad estrogénica de estos compuestos mediante el ensayo RYA. Vinggaard *et al.* (1999) estudiaron la actividad estrogénica del clorfenvinfos y del pentaclorofenol sobre células cancerígenas no detectando una actividad estrogénica significativa. Dorsey y Tchounwou (2004) demostraron que el fungicida pentaclorofenol estimula la producción de vitelogenina en peces bagre machos, la cual se utiliza como indicador de exposición a estrógenos. Un estudio sobre la terbutrina (Stevens *et al.*, 1994) mostró que el compuesto tenía capacidad para

aumentar la incidencia de tumores mamarios en ratas, demostrando alteraciones en el control neuroendocrino.

4.2. Actividad citotóxica de las muestras

4.2.1. Actividad citotóxica de las muestras de agua tratadas mediante Foto-Fenton

Las aguas tratadas mediante foto-Fenton, tanto para el experimento FF-1 como para el FF-2, no mostraron actividad citotóxica significativa, las células expuestas a las diferentes muestras presentan porcentajes de viabilidad cercanos al 100% en todas las diluciones (Anexo 1, apartado 1.1 y 1.2). El hecho de que las muestras tratadas con foto-Fenton no resultaran tóxicas, pero el ensayo RYA constatará el efecto negativo de las muestras en los dos experimentos llevados a cabo, conlleva que los ensayos de citotoxicidad por sí solos no son suficientes para concluir la toxicidad o actividad de una muestra.

4.2.2. Actividad citotóxica de las muestras de agua tratadas mediante ozonización

En la Figura 8 se muestra el porcentaje de viabilidad de las células HEK y N2a obtenidos tras los ensayos de las muestras sometidas a ozonización. Tal y como se observa, en general, las células se comportan de forma diferente frente a las mismas muestras. Destaca la eficacia del tratamiento Oz-3 que lleva a una detoxificación en la muestra final, siendo ésta mayor para las células HEK.

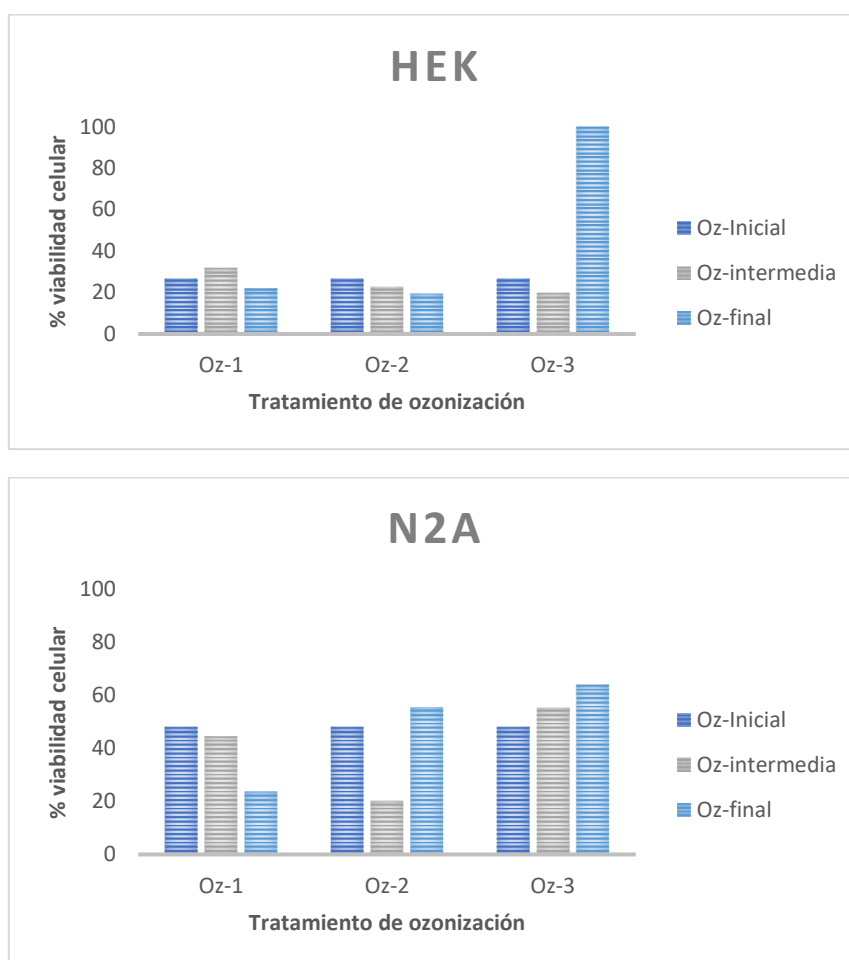


Figura 8. Actividad citotóxica de las muestras tratadas mediante ozonización.

Mediante el análisis Probit de la totalidad de los resultados obtenidos (% de viabilidad celular frente diluciones muestra) (Anexo 2, apartados 2.1, 2.2 y 2.3) se obtiene el valor MID que corresponde a la dilución de muestra con la que se obtiene el 50% de respuesta. Estos valores se listan en la Tabla 7.

Tabla 7. Valores MID (intervalo de confianza al 95%) para tratamiento de Ozonización.

Muestra	HEK	N2a
Oz-Inicial	1:2,2 (1:2,7 – 1:1,7)	1:1,4 (1:1,2 – 1:1,1)
Oz-1-30min	1:2 (1:2,5 – 1:1,6)	1:1,5 (1:1,8 – 1:1,1)
Oz-1-90min	1: 2,5 (1:2,9 – 1:2,1)	1:2,5 (1:3,7 – 1:1,5)
Oz-Inicial	1:2,2 (1:2,7 – 1:1,7)	1:1,4 (1:1,2 – 1:1,1)
Oz-2-30min	1:3 (1:3,4 – 1:2,5)	1:3,6 (1:4 – 1:3,3)
Oz-2-120min	1:2,1 (1:2,7 – 1:1,6)	1:0,5 (1:0,7 – 1:0,1)
Oz-Inicial	1:2,2 (1:2,7 – 1:1,7)	1:1,4 (1:1,2 – 1:1,1)
Oz-3-40min	1:2,4 (1:2,6 – 1:2,1)	1:0,7 (1:0,9 – 1:0,6)
Oz-3-120min	-*	1:1,4 (1:1,8 – 1:1)

* no se alcanza el 50% de respuesta

El MID oscila entre los valores de dilución 1:2 a 1:3 para las células HEK, y entre 1:0,5 y 1:3,6 para las células N2a.

Teniendo en cuenta que este tipo de muestras son tomadas como modelos, para valorar la toxicidad de las muestras y la efectividad de los tratamientos no sólo hay que tener en cuenta el valor MID (equivalente a la EC₅₀) sino los valores umbrales como el LID ya que nos indican a partir de qué diluciones tienen lugar los primeros efectos tóxicos. Mediante el análisis ANOVA se han determinado los valores LID (Tabla 8), dilución de la muestra a partir de la cual se observan efectos significativos.

Tabla 8. Valores LID para tratamiento de Ozonización.

Muestra	HEK	N2a
Oz-Inicial	1:8	1:64
Oz-1-30min	1:32	1:64
Oz-1-90min	1:16	1:8
Oz-Inicial	1:8	1:64
Oz-2-30min	1:32	1:64
Oz-2-120min	1:8	1:8
Oz-Inicial	1:8	1:64
Oz-3-40min	1:16	1:16
Oz-3-120min	1:1	1:64

Aunque la toxicidad de las muestras no ha sido muy elevada, tal y como indican los valores MID, comprendidos entre las diluciones 1:1 y 1:3, los valores LID indican aparición de efectos a diluciones más altas, señalando un mayor peligro sobre el medio ambiente

En un Trabajo Fin de Grado (Álvarez, 2017), realizado dentro del mencionado Proyecto de investigación, se probó la citotoxicidad de los compuestos que forman la muestra frente a las mismas células, detectándose mayor citotoxicidad para los compuestos clorfenvinfos y terbutrina para los dos tipos de células. Además, el pentaclorofenol mostró una actividad citotóxica semejante a la del clorfenvinfos para las células N2a. No existen estudios similares en la bibliografía con los que contrastar nuestros resultados.

Las muestras y tratamientos estudiados en el presente trabajo han sido objeto de estudio en otro Trabajo Fin de Grado realizado paralelamente (Devesa, 2019). Con ambos trabajos se revisa de forma más completa la toxicidad de las muestras y el estudio de la eficacia de los tratamientos mediante una batería de ensayos de toxicidad. Se ha encontrado diferencias significativas en la respuesta biológica de los organismos ensayados (*Daphnia magna*, *Aliivibrio fischeri* y *Pseudokirchneriella subcapitata*) así como una mayor toxicidad en las muestras sometidas a foto-Fenton (FF-2). Aunque los tratamientos foto-Fenton y ozonización han sido eficaces en la detoxificación, ésta no fue alcanzada totalmente.

5. Conclusiones

- Los tratamientos foto-Fenton no resultaron efectivos desde el punto de vista de actividad estrogénica ya que las muestras finales presentaron mayor actividad que las iniciales. Los tratamientos de ozonización resultaron más efectivos, eliminando la actividad estrogénica de las muestras iniciales, siendo el tratamiento en oscuridad (Oz-1) el más eficiente.
- Los ensayos de citotoxicidad muestran que las células responden de modo diferente a los tratamientos, detectándose únicamente actividad citotóxica en las muestras tratadas mediante ozonización, siendo el tratamiento con luz (Oz-3) el más eficiente.
- Durante los Procesos de Oxidación Avanzada (foto-Fenton y ozonización) se generan diferentes subproductos (Oller *et al.*, 2011) lo que explicaría la variabilidad observada en los ensayos de toxicidad realizados en el presente estudio.
- Para una evaluación ambiental más precisa, se hace necesario ampliar la batería de ensayos de toxicidad debido a la diferente sensibilidad de organismos (Devesa, 2019) y células ensayadas.
- La eliminación de contaminantes presentes en las aguas residuales mediante Procesos de Oxidación Avanzada, actualmente, resulta costosa. Una forma de optimizar estos tratamientos para su aplicación en aguas residuales es llevar a cabo ensayos para determinar la toxicidad en las diferentes etapas de las que constan dichos tratamientos.

6. Bibliografía

- **Ahmed, M.B.; Zhou, J.L.; Ngo, H.H.; Guo, W.** (2015). Adsorptive removal of antibiotics from water and wastewater: progress and challenges. *Science of the Total Environment* 532, 112-126.
- **Álvarez, C.** (2017). Evaluación de los riesgos ambientales de contaminantes de preocupación emergente en la Unión Europea. Trabajo Final de Grado en Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia.
- **Anjali, R.; Shanthakumar, S.** (2019). Insights on the current status of occurrence and removal of antibiotics in wastewater by advanced oxidation processes. *Journal of Environmental Management* 246, 51-62.
- **Bai, X.; Lutz, A.; Carroll, R.; Keteles, K.; Dahlin, K.; Murphy, M.; Nguyen, D.** (2018). Occurrence, distribution, and seasonality of emerging contaminants in urban watersheds. *Chemosphere* 200, 133-142.
- **Calomarde, C.** (2017). Valoración ecotoxicológica y actividad estrogénica de contaminantes de preocupación emergente o de riesgo significativo contenidos en la Directiva 2013/39/CE. Trabajo Final de Grado en Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia.
- **Céspedes, R.; Lacorte, S.; Raldúa, D.; Ginebreda, A.; Barceló, D.; Piña, B.** (2005). Distribution of endocrine disruptors in the Llobregat River basin (Catalonia, NE Spain). *Chemosphere* 61, 1710-1719.
- **Céspedes, R.; Petrovic, M.; Raldúa, D.; Saura, U.; Piña, B.; Lacorte, S.; Barceló, D.** (2004). Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378(3), 697–708.
- **Chichizola, C.** (2003). Disruptores Endocrinos. Efectos en la Reproducción. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo* 40, 172-188.
- **Colborn, T.; Clemet, C.** (1992). Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection. *Princeton Scientific Publications* 9–15.
- **Deng, Y.; Zhao, R.** (2015). Advanced Oxidation Processes (AOPs) in Wastewater Treatment. *Current Pollution Reports* 1, 167-176.
- **Devesa, I.** (2019). Evaluación ecotoxicológica de aguas contaminadas tratadas mediante procesos de oxidación avanzada. Trabajo Fin de Grado en Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia.
- **Diamanti-Kandarakis, E.; Bourguignon, J.P.; Giudice, L.C.; Hauser, R.; Prins, G.S.; Soto, A.M.; Zoeller, R.T.; Gore, A.C.** (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Reviews* 30, 294-342.
- **Dorsey, W. C., & Tchounwou, P. B.** (2004). Pentachlorophenol-induced cytotoxic, mitogenic, and endocrine-disrupting activities in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *International journal of environmental research and public health* 1(2), 90-99.
- **Fernández-Alba, A.R.; Hernando, D.; Agüera, A.; Cáceres, J.; Malato, S.** (2002a). Toxicity assays: a way for evaluating AOPs efficiency. *Water Research* 36, 4255-4262.
- **Fernández-Alba, A.R.; Hernando, M.D.; Díaz, G.; Chisti, Y.** (2002b). Comparative evaluation of the effects of pesticides in acute toxicity luminescence bioassays. *Analytica Chimica Acta* 451, 195-202.

- **Freshney, R.I. (2011).** Culture of Animal Cells: A Manual of basic technique and specialized applications (6th Ed.). John Wiley and Sons Ltd.
- **García-Reyero, N.; Grau, E.; Castillo, M.; López de Alda, M.; Barceló, D.; Piña, B. (2001).** Monitoring of endocrine disruptors in surface waters by the yeast recombinant assay. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(6), 1152-1158.
- **Gatica E.; Possetto D.; Reynoso A.; Natera J.; Miskoski S1.; De Gerónimo E.; Bregliani M.; Pajares A.; Massad W. (2019).** Photo-Fenton and Riboflavin-photosensitized Processes of the Isoxaflutole Herbicide. *Photochem Photobiol* 95(3), 901-908.
- **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.
- **Guillette, LJ Jr. (1995).** Endocrine disrupting environmental contaminants and developmental abnormalities in embryos. *Human Ecological Risk Assess* 1, 25-36.
- **Guillette, LJ Jr. (2000).** Contaminant-induced endocrine disruption in wildlife. *Growth Hormone & IGF Research* 10, 45-50.
- **Haave, M.; Ropstad, E.; Derocher, A.; Lie, E.; Dahl, E.; Wiig, O.; Skaare, J.; Jenssen, B. (2003).** Polychlorinated biphenyls and reproductive hormones in female polar bears at Svalbard. *Environmental Health Perspective* 111, 431-436.
- **Hoigné, J.; Bader, H. (1977).** Ozonation of Water: Selectivity and Rate of Oxidation of Solutes. *Ozone: Science and Engineering* 1, 73-85.
- **Inyinbor, A.; Adekola, F.; Olatunji, G. (2016)** Liquid phase adsorption of Rhodamine B onto acid treated *Raphia hookeri* epicarp: Kinetics, isotherm and thermodynamics studies. *South African Journal of Chemistry* 69, 218-226.
- **Kasprzyk-Hordern, B.; Dinsdale, R.M.; Guwy, A.J. (2008)** The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Research* 42, 3498-3518.
- **Klavarioti M.; Mantzavinos D.; Kassinos D. (2009).** Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environmental International* 35, 402-417.
- **Kolpin, D.W.; Furlong, E.T.; Meyer, M.T.; Thurman, E.M.; Zaugg, S.D.; Barber, L.B.; Buxton, H.T. (2002).** Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999–2000: A National Reconnaissance. *Environmental Science and Technology* 36 (6), 1202-1221.
- **Kumar, A.; Pal, D. (2018).** Antibiotic resistance and wastewater: Correlation, impact and critical human health challenges. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 6, 52-58.
- **Lapworth, D.J.; Baran, N.; Stuart, M.E.; Ward, R.S. (2012).** Emerging organic contaminants in groundwater: a review of sources, fate and occurrence. *Environmental Pollution* 163, 287-303.
- **Masten, S.J.; Davies, F.R. (1994).** The Use of Ozonation to Degrades Organic Contaminants in Wastewaters. *Environmental Science and Technology* 28(4), 180-185.
- **Milow, B.; Blanco, J.; Fernandez, P.; Malato, S.; Richter, C.; Funken, K.H.; Sattler, C. (1999).** Photocatalytic detoxification of contaminated water. Global Symposium on Recycling, Waste Treatment and Clean Technology, Proceedings 3, 1989-1998.
- **Monneret, C. (2017).** What is and endocrine disruptor? *Comptes Rendus Biologies* 340, 403-405.

- **Murk, A.J.; Legler, J.; Van Lipzig, M.M.H.; Meerman, J.H.N.; Belfroid, A.C.; Spenkelink, A.; Van Der Burg, B.; Rijs, G.B.J.; Vethaak, D.** (2002). Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three *in vitro* bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(1), 16–23.
- **Noguerol, T.N.** (2007). Desenvolupament i aplicació de bioassaigs per a la detecció i quantificació de xenobiòtics amb llevats recombinants. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona.
- **Noguerol, T.N.; Boronat, S.; Jarque, S.; Barceló, D.; Piña, B.** (2006). Detection of hormone receptor ligands in yeast by fluorogenic methods. *Talanta* 69, 351-358.
- **Oller, I.; Malato, S.; Sánchez-Pérez, J.A.** (2011). Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination--a review. *Science of the Total Environment* 409(20), 4141–4166.
- **Pandey, S.** (2006). Water pollution and health. *Kathmandu University medical journal (KUMJ)* 4, 128-134.
- **Pérez M.; Penuela G.; Maldonado M.; Malato O.; Fernández-Ibañez P.; Oller I.; Gernjak W.; Malato S.** (2006). Degradation of pesticides in water using solar advanced oxidation processes. *Appl Catal B-Environ* 64, 272-281.
- **Petrie, B.; Barden, R.; Kasprzyk-Hordern, B.** (2015). A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Research* 72, 3–27.
- **Rampersad, S.N.** (2012). Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)* 12, 12347–12360.
- **Richardson, S.D.; Ternes, T.A.** (2018). Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry* 90, 398-428.
- **Riva, F.; Castiglioni, S.; Fattore, E.; Manenti, A.; Davoli E.; Zuccato, E.** (2018). Monitoring emerging contaminants in the drinking water of Milan and assessment of the human risk. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 221, 451-457.
- **Roda, A.; Mirasoli, M.; Michelini, E.; Magliulo, M., Simoni, P.; Guardigli, M., Curini, R.; Sergi, M.; Marino, A.** (2006). Analytical approach for monitoring endocrine-disrupting compounds in urban wastewater treatment plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385(4), 742-752.
- **Ronco A.; Díaz M.C.; Pica Y.** (2004). Conceptos generales. En: Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Centro Internacional de Inv. Desarrollo, Canadá - IMTA, 17-22.
- **Sanchis, S.** (2012). Eliminación de compuestos emergentes mediante sistemas biológicos y su acoplamiento con procesos de oxidación avanzada. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- **Sauvé, S.; Desrosiers, M.** (2014). A review of what is an emerging contaminant. *Chemistry Central Journal* 8, 15. doi: 10.1186/1752-153X-8-15
- **Sharma, S.; Bhattacharya, A.** (2017). Drinking water contamination and treatment techniques. *Applied Water Science* 3, 1043-1067.
- **Singh, M.; Gupta, A.** (2016). Water pollution: sources, effects and control. *Centre for Biodiversity, Department of Botany, Nagaland University.*
- **Stevens, J. T., Breckenridge, C. B., Wetzel, L. T., Gillis, J. H., Luempert Iii, L. G., & Eldridge, J. C.** (1994). Hypothesis for mammary tumorigenesis in Sprague-Dawley rats exposed to

certain triazine herbicides. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues* 43(2), 139-153.

- **Svenson, A.; Allard, A.S.; Ek, M.** (2003). Removal of estrogenicity in Swedish municipal sewage treatment plants. *Water Research* 37, 4433–4443.
- **Swartz, C. H.; Reddy, S.; Benotti, M. J.; Yin, H.; Barber, L.B.; Brownawell, B.J.; Rudel, R.A.** 2006. Steroid estrogens, nonylphenol ethoxylate metabolites, and other wastewater contaminants in groundwater affected by a residential septic system on Cape Cod, MA. *Environmental Science and Technology* 40, 4894-4902.
- **Vinggaard, A. M., Breinholt, V., & Larsen, J. C.** (1999). Screening of selected pesticides for oestrogen receptor activation in vitro. *Food Additives & Contaminants* 16(12), 533-542.

Anexos

Anexo 1. Porcentajes de viabilidad de células expuestas a muestras tratadas mediante Foto-Fenton

1.1. Muestras experimento 1 (FF-1)

Células HEK		Tiempo de tratamiento		
Dilución	FF-1-inicial	FF-1-45 min	FF-1-180 min	
1:1	105,0 ± 2,8	103,5 ± 2,6	109,4 ± 3,0	
1:2	105,8 ± 1,3	99,3 ± 1,6	106,2 ± 2,9	
1:4	95,7 ± 4,4	98,1 ± 3,1	103,1 ± 2,3	
1:8	100,0 ± 5,7	98,3 ± 0,8	101,2 ± 2,6	
1:16	98,6 ± 1,2	97,6 ± 1,7	98,3 ± 0,5	
1:32	99,2 ± 1,7	97,2 ± 1,4	99,7 ± 3,0	
1:64	94,4 ± 3,2	96,9 ± 2,2	98,1 ± 2,0	
1:128	95,9 ± 1,9	100,6 ± 4,9	97,3 ± 2,7	
1:256	96,8 ± 1,6	97,8 ± 2,0	97,3 ± 2,8	
1:512	96,4 ± 0,8	95,9 ± 1,2	97,4 ± 4,2	
1:1024	95,8 ± 3,0	97,2 ± 1,8	97,8 ± 3,3	

Células N2a		Tiempo de tratamiento		
Dilución	FF-1-inicial	FF-1-45 min	FF-1-180 min	
1:1	106,0 ± 3,0	107,6 ± 3,9	110,8 ± 2,0	
1:2	100,9 ± 2,7	106,5 ± 1,0	107,9 ± 3,7	
1:4	99,9 ± 2,4	102,2 ± 1,5	104,8 ± 3,1	
1:8	99,5 ± 1,6	100,9 ± 3,0	103,7 ± 2,3	
1:16	99,3 ± 2,8	100,0 ± 2,2	103,1 ± 2,3	
1:32	95,4 ± 1,3	101,4 ± 2,1	101,4 ± 2,0	
1:64	96,8 ± 2,5	102,1 ± 0,6	99,3 ± 5,6	
1:128	97,1 ± 3,9	98,0 ± 3,1	101,7 ± 1,4	
1:256	99,1 ± 0,9	101,2 ± 1,5	104,0 ± 3,0	
1:512	100,8 ± 0,5	103,0 ± 1,3	97,3 ± 1,4	
1:1024	101,5 ± 0,7	102,7 ± 2,9	98,3 ± 2,1	

1.2. Muestras experimento 2 (FF-2)

Células HEK		Tiempo de tratamiento		
Dilución	FF-2-inicial	FF-2-45 min	FF-2-180 min	
1:1	102,4 ± 3,3	103,8 ± 2,3	108,5 ± 2,5	
1:2	102,7 ± 0,5	99,0 ± 2,4	108,1 ± 0,8	
1:4	98,4 ± 3,7	99,4 ± 2,4	105,1 ± 1,7	
1:8	101,2 ± 0,4	100,3 ± 2,5	103,1 ± 1,0	
1:16	100,1 ± 2,4	101,6 ± 1,4	102,3 ± 0,5	
1:32	103,8 ± 0,6	99,4 ± 2,1	102,8 ± 0,3	
1:64	100,7 ± 1,2	100,1 ± 0,5	102,3 ± 0,9	
1:128	100,7 ± 1,2	104,0 ± 1,3	100,4 ± 0,1	
1:256	101,0 ± 1,5	101,3 ± 1,1	99,1 ± 4,9	
1:512	101,4 ± 0,4	98,3 ± 3,8	97,8 ± 5,0	
1:1024	97,5 ± 3,6	100,7 ± 1,1	96,3 ± 5,4	

Células N2a		Tiempo de tratamiento		
Dilución	FF-2-inicial	FF-2-45 min	FF-2-180 min	
1:1	102,9 ± 2,4	109,0 ± 2,3	110,7 ± 1,8	
1:2	101,6 ± 0,6	107,6 ± 1,1	110,7 ± 0,1	
1:4	102,1 ± 0,5	105,1 ± 2,3	107,4 ± 1,6	
1:8	100,8 ± 1,5	104,8 ± 3,0	107,8 ± 0,8	
1:16	101,2 ± 2,4	106,0 ± 0,6	105,4 ± 1,0	
1:32	101,5 ± 1,7	104,7 ± 3,5	105,5 ± 1,4	
1:64	99,3 ± 3,3	105,7 ± 3,2	105,9 ± 1,0	
1:128	101,7 ± 2,1	104,9 ± 1,6	103,3 ± 1,3	
1:256	100,9 ± 3,3	103,6 ± 1,6	105,1 ± 2,2	
1:512	101,8 ± 1,4	106,8 ± 2,3	101,5 ± 4,6	
1:1024	103,3 ± 1,2	104,4 ± 2,0	103,1 ± 5,7	

Anexo 2. Porcentajes de viabilidad de células expuestas a muestras tratadas mediante O3

2.1. Muestras complejas experimento 1 (Oz-1)

Células HEK		Tiempo de tratamiento		
Dilución	Oz-1-inicial	Oz-1-30 min	Oz-1-90 min	
1:1	26,74 ± 0,73	31,70 ± 3,87	21,99 ± 0,95	
1:2	38,58 ± 2,92	58,21 ± 6,91	47,72 ± 5,27	
1:4	77,60 ± 5,00	71,43 ± 3,52	58,42 ± 7,93	
1:8	94,93 ± 14,91	69,20 ± 17,84	84,43 ± 6,58	
1:16	105,06 ± 15,27	81,07 ± 19,57	87,05 ± 12,87	
1:32	87,98 ± 14,32	107,62 ± 17,42	104,23 ± 5,73	
1:64	103,45 ± 9,22	111,07 ± 9,03	99,37 ± 10,86	
1:128	105,33 ± 18,90	114,57 ± 20,57	109,24 ± 1,45	
1:256	98,25 ± 4,92	100,97 ± 13,79	108,83 ± 2,92	
1:512	126,06 ± 24,21	109,18 ± 13,22	112,28 ± 3,32	

Células N2a		Tiempo de tratamiento		
Dilución	Oz-1-inicial	Oz-1-30 min	Oz-1-90 min	
1:1	48,07 ± 1,81	44,49 ± 3,49	23,72 ± 1,33	
1:2	51,67 ± 4,69	52,50 ± 17,33	54,96 ± 8,41	
1:4	67,08 ± 3,79	68,39 ± 7,72	71,54 ± 8,08	
1:8	68,58 ± 4,33	73,44 ± 2,99	68,83 ± 4,17	
1:16	73,74 ± 1,57	71,82 ± 3,82	60,84 ± 6,62	
1:32	82,35 ± 1,55	76,34 ± 8,91	69,19 ± 8,98	
1:64	97,64 ± 16,57	96,17 ± 3,70	85,94 ± 11,85	
1:128	101,84 ± 14,62	109,47 ± 6,29	85,33 ± 15,72	
1:256	103,91 ± 8,05	103,22 ± 5,17	84,15 ± 12,11	
1:512	85,69 ± 4,23	91,31 ± 4,01	77,48 ± 12,22	

2.2. Muestras complejas experimento 2 (Oz-2)

Células HEK		Tiempo de tratamiento		
Dilución	Oz-2-inicial	Oz-2-30 min	Oz-2-120 min	
1:1	26,74 ± 0,73	22,46 ± 1,20	19,48 ± 0,82	
1:2	38,58 ± 2,92	33,08 ± 3,13	48,56 ± 8,23	
1:4	77,60 ± 5,00	61,99 ± 6,48	83,60 ± 12,68	
1:8	94,93 ± 14,91	85,64 ± 10,02	80,97 ± 18,27	
1:16	105,06 ± 15,27	81,83 ± 4,20	86,25 ± 15,05	
1:32	87,98 ± 14,32	93,58 ± 5,91	68,71 ± 4,42	
1:64	103,45 ± 9,22	82,96 ± 12,73	97,16 ± 16,53	
1:128	105,33 ± 18,90	98,42 ± 11,50	111,90 ± 25,87	
1:256	98,25 ± 4,92	94,87 ± 7,19	98,69 ± 23,68	
1:512	126,06 ± 24,21	101,72 ± 5,06	106,71 ± 6,18	

Células N2a		Tiempo de tratamiento		
Dilución	Oz-2-inicial	Oz-2-30 min	Oz-2-120 min	
1:1	48,07 ± 1,81	20,22 ± 0,36	55,51 ± 2,86	
1:2	51,67 ± 4,69	36,56 ± 3,31	74,05 ± 4,89	
1:4	67,08 ± 3,79	57,95 ± 2,56	71,47 ± 1,61	
1:8	68,58 ± 4,33	68,51 ± 5,78	68,03 ± 6,55	
1:16	73,74 ± 1,57	71,52 ± 4,61	80,87 ± 9,30	
1:32	82,35 ± 1,55	79,28 ± 4,15	89,62 ± 18,38	
1:64	97,64 ± 16,57	85,61 ± 3,92	87,13 ± 13,09	
1:128	101,84 ± 14,62	98,20 ± 8,23	90,80 ± 11,94	
1:256	103,91 ± 8,05	109,32 ± 5,34	95,31 ± 16,65	
1:512	85,69 ± 4,23	91,51 ± 10,35	79,31 ± 5,31	

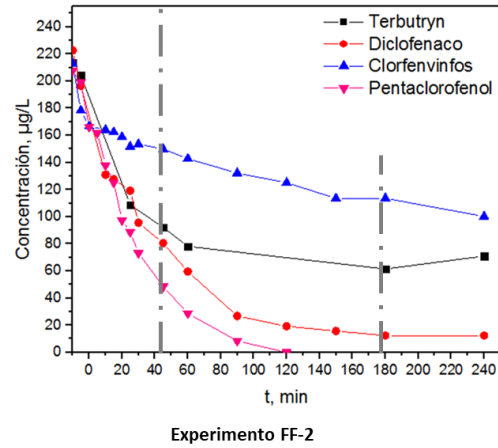
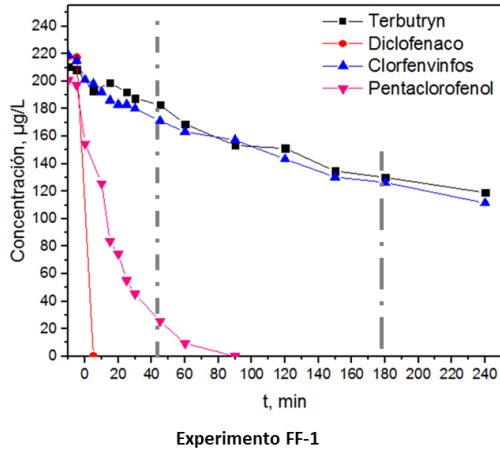
2.3. Muestras complejas experimento 3 (Oz-3)

Células HEK		Tiempo de tratamiento		
Dilución	Oz-3-inicial	Oz-3-45 min	Oz-3-180 min	
1:1	26,74 ± 0,73	19,68 ± 1,37	141,91 ± 16,02	
1:2	38,58 ± 2,92	49,11 ± 14,79	126,02 ± 25,24	
1:4	77,60 ± 5,00	71,77 ± 6,72	103,47 ± 8,39	
1:8	94,93 ± 14,91	88,60 ± 5,38	112,85 ± 10,37	
1:16	105,06 ± 15,27	82,88 ± 21,00	103,50 ± 17,87	
1:32	87,98 ± 14,32	105,52 ± 7,59	127,15 ± 2,66	
1:64	103,45 ± 9,22	87,43 ± 23,21	119,11 ± 17,67	
1:128	105,33 ± 18,90	99,36 ± 18,29	103,70 ± 11,21	
1:256	98,25 ± 4,92	91,44 ± 42,58	112,23 ± 12,90	
1:512	126,06 ± 24,21	114,89 ± 9,52	123,48 ± 20,34	

Células N2a		Tiempo de tratamiento		
Dilución	Oz-3-inicial	Oz-3-45 min	Oz-3-180 min	
1:1	48,07 ± 1,81	55,31 ± 1,52	64,07 ± 5,76	
1:2	51,67 ± 4,69	70,73 ± 4,18	54,74 ± 1,95	
1:4	67,08 ± 3,79	73,16 ± 3,85	61,67 ± 7,35	
1:8	68,58 ± 4,33	80,27 ± 1,66	72,49 ± 5,96	
1:16	73,74 ± 1,57	95,72 ± 7,63	76,84 ± 7,88	
1:32	82,35 ± 1,55	112,52 ± 5,27	87,94 ± 7,93	
1:64	97,64 ± 16,57	100,04 ± 6,09	100,24 ± 3,79	
1:128	101,84 ± 14,62	117,78 ± 11,93	108,07 ± 4,71	
1:256	103,91 ± 8,05	120,87 ± 3,57	109,00 ± 2,91	
1:512	85,69 ± 4,23	99,28 ± 3,34	102,51 ± 10,75	

Anexo 3. Gráficas de seguimiento de los contaminantes (Cedidas por el grupo de investigación de la PSA) a lo largo del proceso de foto-Fenton

3.1. Gráficas de seguimiento de los contaminantes a lo largo del proceso de foto-Fenton



3.2. Gráficas de seguimiento de los contaminantes a lo largo del proceso de ozonización

