

**UNIVERSIDAD DE ALCALÁ**

Departamento de Química Analítica, Química Física e Ingeniería Química



**EFFECTOS SINÉRGICOS EN EL  
ANÁLISIS ECOTOXICOLÓGICO DEL  
IBUPROFENO. APROXIMACIÓN  
CUANTITATIVA DEL RIESGO  
AMBIENTAL**

**TESIS DOCTORAL**

Victor González Naranjo

2013





**UNIVERSIDAD DE ALCALÁ**

Departamento de Química Analítica, Química Física e Ingeniería Química



**EFFECTOS SINÉRGICOS EN EL  
ANÁLISIS ECOTOXICOLÓGICO DEL  
IBUPROFENO. APROXIMACIÓN  
CUANTITATIVA DEL RIESGO  
AMBIENTAL**

**TESIS DOCTORAL**

Victor González Naranjo

2013



**KARINA BOLTES ESPÍNOLA, Profesor Ayudante Doctor de Ingeniería Química del Departamento de Química Analítica, Química Física e Ingeniería Química de la Universidad de Alcalá e IRENE DE BUSTAMANTE GUTIÉRREZ, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Geografía y Geología de la Universidad de Alcalá,**

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo descrito en la presente memoria, titulado “Efectos sinérgicos en el análisis ecotoxicológico del ibuprofeno. Aproximación cuantitativa del riesgo ambiental”, ha sido realizada por D. Víctor González Naranjo bajo nuestra dirección. Asimismo, autorizan su presentación para que sea defendido como Tesis Doctoral

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firman el presente en Alcalá de Henares a 29 de julio de 2013.

Karina Boltés Espínola

Irene de Bustamante Gutiérrez



**ALBERTO ESCARPA MIGUEL, Profesor Titular de Universidad de Química Analítica y Director del Departamento de Química Analítica, Química Física e Ingeniería Química de la Universidad de Alcalá,**

**CERTIFICA:**

Que el trabajo descrito en la presente memoria, titulado “Efectos sinérgicos en el análisis ecotoxicológico del ibuprofeno. Aproximación cuantitativa del riesgo ambiental”, ha sido realizado por D. Víctor González Naranjo bajo la dirección de la Dra. Karina Boltes Espinola del Área de Ingeniería Química, con la codirección de la Dra. Irene de Bustamante Gutiérrez del Departamento de Geografía y Geología. Asimismo, autorizo su presentación para que sea defendido como Tesis Doctoral.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presente en Alcalá de Henares a 29 de julio de 2013.

Alberto Escarpa Miguel





Escuela de Posgrado de la Universidad de Alcalá

Programa de Doctorado en Hidrología y Gestión de Recursos Hídricos

**TESIS DOCTORAL**

**EFFECTOS SINÉRGICOS EN EL  
ANÁLISIS ECOTOXICOLÓGICO DEL  
IBUPROFENO. APROXIMACIÓN  
CUANTITATIVA DEL RIESGO  
AMBIENTAL**

Memoria presentada para optar al título de Doctor por la Universidad de Alcalá por:

**Víctor González Naranjo**

Dirigida por:

**Karina Boltes Espínola**

**Irene de Bustamante Gutiérrez**

Departamento de Química Analítica, Química Física e Ingeniería Química de la

Universidad de Alcalá

Departamento de Geografía y Geología de la Universidad de Alcalá

Alcalá de Henares, 2013





## *Agradecimientos*

---

En primer lugar, agradezco de la forma más sincera a Karina Boltés Espínola y a Irene de Bustamante Gutiérrez, directoras de esta Tesis Doctoral, su dedicación e implicación durante estos tres años de trabajo. Tanto personal como profesionalmente ha sido una gran fortuna contar con su apoyo. A Irene, en particular, por mostrar plena confianza en mí y agotar cualquier posibilidad que estuviera en su mano para que esto fuera posible. Y a Karina por la aceptación de este reto desde un principio y el apoyo incondicional que me ha mostrado, viendo yo recompensado cada segundo de mi trabajo de manera inmediata.

Al Instituto IMDEA Agua por darme la posibilidad de comenzar este camino académico y darle continuidad. A los compañeros, doctorandos y doctores, por su colaboración, apoyo y amistad que han hecho tan enriquecedor, tanto en lo profesional como en lo personal, cada uno de los días que hemos compartido. Y añadir una mención especial a María, Virtu y Ángel, los compañeros con los que a diario he compartido dudas, impresiones, ideas e ilusiones.

A Paco y Carolina, técnicos del laboratorio del Instituto IMDEA Agua, por la amabilidad con que fui recibido, la facilidad que me dan en todo momento para el desarrollo de mi trabajo, por su implicación en mi proyecto, y por el aprendizaje continuo que supone el trabajar a su lado.

A todo el personal del Departamento de Química Analítica, Química Física e Ingeniería Química, por el recibimiento y acogida recibidos. Por la colaboración tanto de las técnicas de laboratorio como de los compañeros doctorandos, y la ayuda prestada durante todas las horas de investigación en los laboratorios.

A todos los participantes del programa CONSOLÍDER-TRAGUA, en especial al equipo de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, ya que fueron los responsables de mi comienzo en el camino de la investigación.

Finalmente, al departamento de Geografía y Geología de la Universidad de Alcalá, por sus instalaciones y facilidades en los comienzos de mis trabajos como investigador predoctoral.

## **Agradecimientos a proyectos**

Agradecer a las siguientes entidades y proyectos la financiación de esta Tesis Doctoral:

- El Instituto IMDEA Agua <http://www.imdea.org>
- CSD2006-00044 (CONSOLIDER TRAGUA). Ministerio de Ciencia e Innovación. Investigador principal: Eloy García Calvo. Universidad de Alcalá.
- CGL2009-13168-C01 (REAGUAM). Ministerio de Ciencia e Innovación. Investigadora principal: Irene de Bustamante. Universidad de Alcalá.
- P2009/AMB-1588 (REMTAVARES). Ministerio de Ciencia e Innovación. Investigador principal: Eloy García Calvo. Instituto IMDEA Agua.
- CCG10-UAH/AMB-5899 (DETOXSOIL). Universidad de Alcalá y Comunidad de Madrid. Investigadora principal. Karina Boltes Espínola. Universidad de Alcalá e Imdea Agua.

## *Resumen*

---

Los microcontaminantes orgánicos, ya sean emergentes o prioritarios, se encuentran en multitud de muestras ambientales a causa, fundamentalmente, de la baja eficiencia de las plantas de tratamiento de aguas residuales en su eliminación. Pueden aparecer tanto en las aguas superficiales debido a los vertidos de los efluentes de estas plantas, como en el suelo y en las aguas subterráneas debido al uso de estos efluentes para el riego de cultivos y a las prácticas de abonado con purines o con lodos de depuradora. Consecuentemente, el estudio de la presencia de estos compuestos en el medio ambiente se hace necesario para conocer la presión que ésta supone. Dentro del grupo que engloba estos contaminantes, se ha seleccionado un medicamento de elevado consumo a nivel mundial, el ibuprofeno, el cual no aparece como un contaminante individual en el medio, sino que se encuentra combinado con otros compuestos. Partiendo de esta hipótesis, en esta Tesis Doctoral se ha planteado, en primer lugar, estimar la movilidad del ibuprofeno en el suelo para determinar su disponibilidad en distintos medios naturales y determinar los comportamientos sinérgicos del compuesto en suelo y agua cuando aparece mezclado con otros contaminantes orgánicos, para finalmente cuantificar el riesgo ambiental asociado a este contaminante emergente en medio terrestre y acuático. La movilidad del ibuprofeno se estudió mediante ensayos de adsorción y desorción, definiendo así una fijación moderada para el compuesto en el suelo y una adsorción reversible, lo cual demuestra que puede encontrarse disponible tanto en el propio suelo como en las masas de agua que pueda alcanzar por lixiviación. La toxicidad en agua, analizada para las mezclas de ibuprofeno con PFOA (ácido perfluorooctanoico), atrazina y triclosán sobre la microalga verde *Pseudokirchneriella subcapitata*, mostró tendencias al sinergismo cuando el medicamento se hallaba presente. En el caso del suelo, la toxicidad fue determinada para el ibuprofeno y el PFOA, actuando de manera individual y en su combinación binaria, sobre la planta superior *Sorghum bicolor*. Se estudiaron los efectos sobre la elongación de las raíces en los primeros días de crecimiento y sobre la emisión de fluorescencia de la clorofila *a*. El perfil toxicológico predominante fue también la sinergia. Una vez definida la

toxicidad para las distintas combinaciones de contaminantes trabajadas y sobre el organismo acuático y el organismo terrestre, se cuantificaron los riesgos ambientales mediante el cálculo de los cocientes de riesgo (HQ, Hazard Quotient). Las concentraciones toxicológicas a utilizar se obtuvieron mediante tres métodos: Adición de Concentración, Acción Independiente y el Índice de Combinación. Tras analizar los resultados se pudo concluir que el ibuprofeno es un compuesto móvil en el suelo, por lo que es necesario estudiar su toxicología en medios acuáticos y terrestres; que en ambos medios se presentan sinergias cuando este medicamento se encuentra combinado con otros contaminantes emergentes y prioritarios y que por tanto, el uso de un modelo capaz de tener en cuenta en el cálculo de las toxicidades estas sinergias, como es el Índice de Combinación aquí empleado, es necesario para obtener de manera precisa la información toxicológica de estas mezclas. Y finalmente, que el análisis de los procesos fotosintéticos de una planta superior, como la fluorescencia de la clorofila *a*, es una herramienta fácil, económica y eficaz para el cálculo de riesgos ambientales en el suelo.

## *Abstract*

---

The organic micropollutants, emerging or priority, have been found in a lot of environmental samples, mainly due to they are not completely removed in the wastewater treatment plants. They appear in surface waters because of the discharges of effluents from these plants, and in soils and groundwater due to the use of reclaimed water in crop irrigation or due to the application of sewage sludge and manures like fertilizers on agricultural soils. Consequently, is necessary to know the environmental contamination which their presence supposes. In the group of these pollutants, ibuprofen, a pharmaceutical with high worldwide consumption, has been selected. It does not only appear alone in the environment, but also appear combined with other compounds. From this hypothesis, in this Thesis has been proposed, first, estimate the ibuprofen mobility in the soil to determine its availability in different natural media, determinate the synergic behaviors which take place in soil and water when ibuprofen is mixed with other organic compounds, and finally to quantify the environmental risk of this emerging pollutant in aquatic and terrestrial environments. The mobility of the ibuprofen was studied by carrying out adsorption and desorption experiments, which showed a moderate fixation in soil and a reversible adsorption, demonstrating its availability in the soil and in the groundwater by lixiviation. The water toxicity, analyzed for mixes of ibuprofen, PFOA (perfluorooctanoic acid), atrazine and triclosan on the green microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*, showed synergistic trends when the compound was present in the studied combinations. In the soil, the toxicity was determined for ibuprofen and PFOA, individually and combined between them, on the high plant *Sorghum bicolor*. The root elongation and the emission of the chlorophyll *a* fluorescence were studied. The main toxicological profile was the synergy. When all the toxicities were defined on both organisms, the environmental risks were quantified by calculating the Hazard Quotients, HQ. The toxicological concentrations were calculated by applying three different methods: Concentration Addition, Independent Action and the Combination Index. We concluded that the ibuprofen is a mobile compound in soils, so the toxicity in aquatic and terrestrial environments should be studied; in both

environments the synergistic behavior occurs when ibuprofen is combined with emerging or priority pollutants, and, therefore, the application of a model which takes into account the synergic behavior in the toxicity calculation, as the Combination Index used in this work, is necessary. And finally, that the photosynthetic processes analysis in a high plant, as the chlorophyll *a* fluorescence, is an easy, economic and efficient tool to assess the environmental risk in soils.

## Índice de contenidos

---

Agradecimientos	I
Resumen	III
Abstract	V
Capítulo 1. Introducción y objetivos	1
1.1 Toxicología de contaminantes orgánicos en el medio ambiente	3
1.2 Presencia de contaminantes orgánicos en el medio ambiente	7
1.3 Métodos para la evaluación de la toxicidad de mezclas de contaminantes	17
1.4 Evaluación del riesgo ambiental de mezclas de contaminantes	23
1.5 Objetivos	27
1.6 Bibliografía	29
Capítulo 2. Movilidad del ibuprofeno en el suelo	39
2.1 Introducción y objetivos	41
2.2 Materiales y métodos	44
2.3 Resultados y discusión	48
2.4 Conclusiones	52
2.5 Bibliografía	53
Capítulo 3. Ecotoxicología del ibuprofeno en agua: efectos sobre el crecimiento de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	57
3.1 Introducción y objetivos	59
3.2 Materiales y métodos	65
3.3 Resultados y discusión	71
3.4 Conclusiones	77
3.5 Bibliografía	78
Capítulo 4. Ecotoxicología del ibuprofeno en suelo: efectos sobre la elongación de las raíces de <i>Sorghum bicolor</i>	83
4.1 Introducción y objetivos	85
4.2 Materiales y métodos	88
4.3 Resultados y discusión	91
4.4 Conclusiones	98
4.5 Bibliografía	99
Capítulo 5. Ecotoxicología del ibuprofeno en suelo: efectos sobre la fluorescencia de la clorofila <i>a</i> de <i>Sorghum bicolor</i>	103
5.1 Introducción y objetivos	105
5.2 Materiales y métodos	110
5.3 Resultados y discusión	112
5.4 Conclusiones	123
5.5 Bibliografía	124

Capítulo 6. Riesgo ambiental del ibuprofeno en medios acuáticos y terrestres	129
6.1 Introducción y objetivos	131
6.2 Análisis de datos	149
6.3 Resultados y discusión	150
6.4 Conclusiones	160
6.5 Bibliografía	161
Capítulo 7. Conclusiones generales	185



## Índice de tablas

<b>Tabla 2.1.</b> Características de los cuatro suelos utilizados en los experimentos de adsorción y desorción.	45
<b>Tabla 2.2.</b> Parámetros de adsorción de ibuprofeno en los cuatro suelos empleados en el experimento.	50
<b>Tabla 2.3.</b> Parámetros de desorción de ibuprofeno en los cuatro suelos empleados en el experimento.	51
<b>Tabla 3.1.</b> Valores de $EC_{50}$ para el ibuprofeno, el PFOA, la atrazina y el triclosán para distintos organismos fotosintéticos.	63
<b>Tabla 3.2.</b> Composición del medio de cultivo del alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> .	66
<b>Tabla 3.3.</b> Combinaciones de los cuatro contaminantes (ibuprofeno, PFOA, atrazina y triclosán) ensayadas sobre el alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> .	66
<b>Tabla 3.4.</b> Diseño experimental para la determinación de los parámetros dosis-respuesta de los compuestos individuales sobre <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> .	67
<b>Tabla 3.5.</b> Diseño experimental para la determinación del efecto tóxico combinado de ibuprofeno, PFOA, atrazina y triclosán sobre <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> .	69
<b>Tabla 3.6.</b> Parámetros de la relación dosis-efecto para los tóxicos individuales y las mezclas de éstos sobre el alga verde <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> y los valores medios de los Índices de Combinación (CI) para las mezclas a tres niveles de efecto.	72
<b>Tabla 4.1.</b> Características del suelo utilizado en el ensayo sobre la planta superior <i>Sorghum bicolor</i> .	88
<b>Tabla 4.2.</b> Características del eluato (1:10) del suelo utilizado en el ensayo sobre la microalga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> .	88
<b>Tabla 4.3.</b> Diseño experimental para la determinación del efecto toxicológico del ibuprofeno y el PFOA sobre la germinación de las semillas y la elongación de las raíces de la planta superior <i>Sorghum bicolor</i> .	89
<b>Tabla 4.4.</b> Diseño experimental para la determinación del efecto toxicológico del ibuprofeno y el PFOA en su combinación binaria sobre la germinación de las semillas y la elongación de las raíces de la planta superior <i>Sorghum bicolor</i> .	89
<b>Tabla 4.5.</b> Parámetros de la relación dosis-efecto de los compuestos individuales, ibuprofeno y PFOA, y la mezcla binaria sobre <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> y <i>Sorghum bicolor</i> .	93
<b>Tabla 5.1.</b> Diseño experimental para la determinación de los parámetros dosis-respuesta de ibuprofeno y PFOA sobre la fotosíntesis del <i>Sorghum bicolor</i> .	110
<b>Tabla 5.2.</b> Diseño experimental para la determinación de los parámetros dosis-respuesta para la mezcla binaria de ibuprofeno y PFOA sobre la fotosíntesis del <i>Sorghum bicolor</i> .	111
<b>Tabla 5.3.</b> Valores medios de las medidas de fluorescencia y los parámetros determinados con ellos para el ibuprofeno y el PFOA a las distintas concentraciones ensayadas.	115
<b>Tabla 5.4.</b> Valores medios de las medidas de fluorescencia y los parámetros determinados con ellos para la mezcla de ibuprofeno y PFOA a las distintas concentraciones ensayadas.	115

<b>Tabla 5.5.</b> Parámetros de la relación dosis-efecto de los compuestos individuales, ibuprofeno y PFOA, y la mezcla binaria para $\Phi_{PSII}$ y $qP$ en <i>Sorghum bicolor</i> .	118
<b>Tabla 6.1.</b> Concentraciones de ibuprofeno detectadas en muestras de agua superficial y efluente de planta depuradora de aguas residuales.	135
<b>Tabla 6.2.</b> Concentraciones de PFOA detectadas en muestras de agua superficial y efluente de planta depuradora de aguas residuales.	137
<b>Tabla 6.3.</b> Concentraciones de atrazina detectadas en muestras de agua superficial y efluente de planta depuradora de aguas residuales.	140
<b>Tabla 6.4.</b> Concentraciones de triclosán detectadas en muestras de agua superficial y efluente de planta depuradora de aguas residuales.	143
<b>Tabla 6.5.</b> Concentraciones de ibuprofeno detectadas en muestras de suelo y sedimento.	146
<b>Tabla 6.6.</b> Concentraciones de PFOA detectadas en muestras de suelo y sedimento.	147
<b>Tabla 6.7.</b> Valores de las menores concentraciones sin efecto para la inhibición del 10% de la población del organismo <i>P. subcapitata</i> (PNEC) obtenidas mediante los métodos del Índice de Combinación (CI), Adición de Concentración (CA) y Acción Independiente (IA) y concentraciones ambientales usadas para el cálculo de los cocientes de riesgo (HQ) para ibuprofeno, PFOA, atrazina y triclosán y las combinaciones binarias, ternarias y cuaternaria. I: Ibuprofeno; P: PFOA; A: Atrazina y T: Triclosán.	151
<b>Tabla 6.8.</b> Valores de las menores concentraciones sin efecto para la inhibición del 50% de la población del organismo <i>P. subcapitata</i> (PNEC) obtenidas mediante los métodos del Índice de Combinación (CI), Adición de Concentración (CA) y Acción Independiente (IA) y concentraciones ambientales usadas para el cálculo de los cocientes de riesgo (HQ) para ibuprofeno, PFOA, atrazina y triclosán y las combinaciones binarias, ternarias y cuaternaria. I: Ibuprofeno; P: PFOA; A: Atrazina y T: Triclosán.	152
<b>Tabla 6.9.</b> Valores de las menores concentraciones sin efecto para la inhibición del 90% de la población del organismo <i>P. subcapitata</i> (PNEC) obtenidas mediante los métodos del Índice de Combinación (CI), Adición de Concentración (CA) y Acción Independiente (IA) y concentraciones ambientales usadas para el cálculo de los cocientes de riesgo (HQ) para ibuprofeno, PFOA, atrazina y triclosán y las combinaciones binarias, ternarias y cuaternaria. I: Ibuprofeno; P: PFOA; A: Atrazina y T: Triclosán.	152
<b>Tabla 6.10.</b> Valores de las menores concentraciones sin efecto para la inhibición del 10% de la población del organismo <i>S. bicolor</i> (PNEC) obtenidas mediante los métodos del Índice de Combinación (CI), Adición de Concentración (CA) y de Acción Independiente (IA), determinadas sobre la inhibición de la elongación de raíces, la eficiencia fotosintética y el decaimiento fotoquímico, y concentraciones ambientales usadas para el cálculo de los cocientes de riesgo (HQ) para ibuprofeno y PFOA y la combinación de ambos.	156
<b>Tabla 6.11.</b> Valores de las menores concentraciones sin efecto para la inhibición del 50% de la población del organismo <i>S. bicolor</i> (PNEC) obtenidas mediante los métodos del Índice de Combinación (CI), Adición de Concentración (CA) y de Acción Independiente (IA), determinadas sobre la inhibición de la elongación de raíces, la eficiencia fotosintética y el decaimiento fotoquímico, y concentraciones ambientales usadas para el cálculo de los cocientes de riesgo (HQ) para ibuprofeno y PFOA y la combinación de ambos.	157

**Tabla 6.12.** Valores de las menores concentraciones sin efecto para la inhibición del 90% de la población del organismo *S. bicolor* (PNEC) obtenidas mediante los métodos del Índice de Combinación (CI), Adición de Concentración (CA) y de Acción Independiente (IA), determinadas sobre la inhibición de la elongación de raíces, la eficiencia fotosintética y el decaimiento fotoquímico, y concentraciones ambientales usadas para el cálculo de los cocientes de riesgo (HQ) para ibuprofeno y PFOA y la combinación de ambos.

## Índice de figuras

<b>Figura 1.1.</b> Niveles de toxicidad marcados por la Directiva Europea 93/67/EC en función de los valores de $EC_{50}$ en mg/L para una determinada sustancia.	6
<b>Figura 1.2.</b> Estructura del ibuprofeno.	11
<b>Figura 1.3.</b> Estructura del PFOA.	12
<b>Figura 1.4.</b> Estructura de la atrazina.	14
<b>Figura 1.5.</b> Estructura del triclosán.	15
<b>Figura 2.1.</b> Parcela de la PECC para la realización de ensayos sobre reutilización en riego agrícola (zona de muestreo).	44
<b>Figura 2.2.</b> Isotermas de adsorción de ibuprofeno ajustadas al modelo de Langmuir, Freundlich e Isoterma Lineal para el suelo A (a), suelo B (b), suelo C (c) y suelo D (d), e isotermas de desorción de ibuprofeno ajustadas al modelo de Freundlich para el suelo A (e), suelo B (f), suelo C (g) y suelo D (h).	49
<b>Figura 3.1.</b> <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (USEPA, 2010).	65
<b>Figura 3.2.</b> Índices de Combinación para las mezclas binarias que contienen ibuprofeno. La línea continua a $CI = 1$ representa aditividad.	73
<b>Figura 3.3.</b> Índices de Combinación para las mezclas ternarias que contienen ibuprofeno. La línea continua a $CI = 1$ representa aditividad.	73
<b>Figura 3.4.</b> Índices de Combinación para la mezcla cuaternaria (ibuprofeno, PFOA, atrazina y triclosán). La línea continua a $CI = 1$ representa aditividad.	74
<b>Figura 3.5.</b> Poligonogramas correspondientes a la mezcla cuaternaria (ibuprofeno, PFOA, atrazina y triclosán) para tres niveles de efecto: a) $fa = 0,1$ ; b) $fa = 0,5$ y c) $fa = 0,9$ . El grosor de las líneas representan la intensidad del efecto; las líneas discontinuas representan antagonismo y las líneas continuas representan sinergia.	75
<b>Figura 4.1.</b> Efecto toxicológico sobre las raíces de <i>Sorghum bicolor</i> al aplicar al suelo, de izquierda a derecha, 0 mg/kg de ibuprofeno, 70 mg/kg de ibuprofeno y 700 mg/kg de ibuprofeno.	92
<b>Figura 4.2.</b> Efecto toxicológico sobre las raíces de <i>Sorghum bicolor</i> al aplicar al suelo, de izquierda a derecha, 0 mg/kg de PFOA, 20 mg/kg de PFOA y 200 mg/kg de PFOA.	92
<b>Figura 4.3.</b> Efecto toxicológico sobre las raíces de <i>Sorghum bicolor</i> al aplicar al suelo, de izquierda a derecha, (0 mg ibuprofeno + 0 mg PFOA)/kg, (75 mg ibuprofeno + 30 mg PFOA)/kg y (1.200 mg ibuprofeno + 400 mg PFOA)/kg.	95
<b>Figura 4.4.</b> Índices de Combinación para la mezcla binaria de ibuprofeno y PFOA sobre la planta superior <i>Sorghum bicolor</i> (o) y la microalga verde <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> ( $\Delta$ ). La línea continua a $CI = 1$ representa aditividad.	95
<b>Figura 5.1.</b> Transformación de la radiación solar absorbida por los organismos fotosintéticos. El 80% es transformado en energía químicamente útil, el 18% es disipado en forma de calor y el 2% es re-emitido como fluorescencia.	106
<b>Figura 5.2.</b> Valores de fluorescencia determinados a partir de la curva de inducción de fluorescencia o cinética de Kautsky.	107
<b>Figura 5.3.</b> Efecto toxicológico sobre las hojas de <i>Sorghum bicolor</i> al aplicar al suelo, de izquierda a derecha, 0 mg/kg de ibuprofeno, 300 mg/kg de ibuprofeno y 600 mg/kg de ibuprofeno.	113

<b>Figura 5.4.</b> Efecto toxicológico sobre las hojas de <i>Sorghum bicolor</i> al aplicar al suelo, de izquierda a derecha, 0 mg/kg de PFOA, 75 mg/kg de PFOA y 150 mg/kg de PFOA.	113
<b>Figura 5.5.</b> Efecto toxicológico sobre las hojas de <i>Sorghum bicolor</i> al aplicar al suelo, de izquierda a derecha, (0 mg ibuprofeno + 0 mg PFOA)/kg, (330 mg ibuprofeno + 75 mg PFOA)/kg y (660 mg ibuprofeno + 150 mg PFOA)/kg.	113
<b>Figura 5.6.</b> Curvas de inducción de fluorescencia (cinéticas de Kautsky) para las distintas concentraciones de ibuprofeno (a), PFOA (b) y la mezcla de ambos compuestos (c).	114
<b>Figura 5.7.</b> Valores medios del rendimiento fotoquímico operacional del PSII, $\Phi_{PSII}$ , para las distintas concentraciones de ibuprofeno (a), PFOA (b) y la mezcla de ambos compuestos (c) y valores medios del decaimiento fotoquímico, $qP$ , para las distintas concentraciones de ibuprofeno (d), PFOA (e) y la mezcla de ambos compuestos (f). Las barras de error se corresponden con las desviaciones estándar de las tres repeticiones por muestra.	116
<b>Figura 5.8.</b> Índices de Combinación para la mezcla binaria de ibuprofeno y PFOA para $\Phi_{PSII}$ (a) y $qP$ (b) en <i>Sorghum bicolor</i> . La línea continua a $CI = 1$ representa aditividad.	122
<b>Figura 6.1.</b> Perfiles de los cocientes de riesgo (HQ) determinados a partir de los valores de $EC_{10}$ (calculados mediante los métodos del Índice de Combinación (CI), Adición de Concentración (CA) y Acción Independiente (IA)) en agua superficial (a) y efluente de depuradora (b) para las mezclas que contienen ibuprofeno.	154
<b>Figura 6.2.</b> Perfiles de los cocientes de riesgo (HQ) determinados a partir de los valores de $EC_{50}$ (calculados mediante los métodos del Índice de Combinación (CI), Adición de Concentración (CA) y Acción Independiente (IA)) en agua superficial (a) y efluente de depuradora (b) para las mezclas que contienen ibuprofeno.	154
<b>Figura 6.3.</b> Perfiles de los cocientes de riesgo (HQ) determinados a partir de los valores de $EC_{90}$ (calculados mediante los métodos del Índice de Combinación (CI), Adición de Concentración (CA) y Acción Independiente (IA)) en agua superficial (a) y efluente de depuradora (b) para las mezclas que contienen ibuprofeno.	154
<b>Figura 6.4.</b> Perfiles de los cocientes de riesgo (HQ) determinados a partir de los valores de $EC_{10}$ (calculados mediante los métodos del Índice de Combinación (CI), Adición de Concentración (CA) y Acción Independiente (IA)) en suelo (a) y sedimento (b) para la inhibición de la elongación de raíces, la eficiencia fotosintética y el decaimiento fotoquímico.	159
<b>Figura 6.5.</b> Perfiles de los cocientes de riesgo (HQ) determinados a partir de los valores de $EC_{50}$ (calculados mediante los métodos del Índice de Combinación (CI), Adición de Concentración (CA) y Acción Independiente (IA)) en suelo (a) y sedimento (b) para la inhibición de la elongación de raíces, la eficiencia fotosintética y el decaimiento fotoquímico.	159
<b>Figura 6.6.</b> Perfiles de los cocientes de riesgo (HQ) determinados a partir de los valores de $EC_{90}$ (calculados mediante los métodos del Índice de Combinación (CI), Adición de Concentración (CA) y Acción Independiente (IA)) en suelo (a) y sedimento (b) para la inhibición de la elongación de raíces, la eficiencia fotosintética y el decaimiento fotoquímico.	159



# **Capítulo 1**

Introducción y objetivos





# CAPÍTULO 1

## Introducción y objetivos

### 1.1 Toxicología de contaminantes orgánicos en el medio ambiente

La ecotoxicología puede ser definida como la ciencia que estudia todos los efectos bioquímicos adversos ocasionados por agentes potencialmente tóxicos sobre organismos vivos, incluyendo los “organismos no objetivo” (organismos que se ven afectados por un tóxico no diseñado para ello) y sus interacciones entre organismos y las especies del medio estudiado (Beasley, 1993; Hoffman *et al.*, 2003). Los agentes tóxicos pueden producirse deliberadamente (pesticidas, drogas de abuso, medicamentos, compuestos de uso industrial, cosméticos) o accidentalmente (subproductos no deseados en procesos industriales, metabolitos, residuos sólidos y líquidos). La contaminación ambiental puede proceder de una fuente definida (fuentes de contaminación puntuales), como efluentes de plantas de tratamiento de aguas o vertederos, o de una fuente difusa, con áreas de afección no definidas (fuentes de contaminación difusa), como el lavado de pesticidas y otros compuestos añadidos en tierras de cultivo o los residuos gaseosos de los automóviles.

Los ecosistemas, tanto acuáticos como terrestres, están sometidos a un estrés ambiental cada vez mayor en todo el mundo debido a las actividades de origen antropogénico. Humedales, lagos, ríos, terrenos de cultivo y estuarios, entre otros, se degradan continuamente debido a la carga de contaminantes que reciben, tales como metales, sales, compuestos sintéticos, productos de combustión, etc. (Baird *et al.*, 2004). Estos contaminantes son degradados o transformados en otros compuestos, normalmente menos tóxicos que los originales, mediante distintos procesos. La fotodegradación, por ejemplo, implica una transformación de los compuestos por oxidación que puede reducir la toxicidad. Pero algunas sustancias pueden sufrir una transformación a productos más tóxicos para los organismos, como por ejemplo, por procesos de fotoactivación. Sin embargo, el hecho de que un contaminante se encuentre en el medio ambiente no significa necesariamente que los

organismos entren en contacto con él. Por tanto, los contaminantes y los receptores deben coexistir en el tiempo y en el espacio para que exista un riesgo potencial. La disponibilidad del contaminante en el medio hace referencia a la proporción de sustancia que es absorbida por el intestino, la piel u otro portal de entrada al torrente sanguíneo y otros tejidos donde pueda causar una reacción fisiológica en un organismo (Levengood y Beasley, 2007).

La ecotoxicología, como respuesta a esta problemática, ha estado durante largo tiempo dedicada a la determinación de la concentración de los contaminantes en el medio ambiente, pero escasamente se ha enfocado al conocimiento de los mecanismos y efectos que producen estos compuestos sobre los seres vivos. Y es aquí hacia donde se están dirigiendo la mayoría de los esfuerzos en los avances de este campo de la ciencia. La investigación ecotoxicológica normalmente se extiende más allá de los efectos sobre la salud de los individuos, examinando como estos cambios se manifiestan a niveles tanto de población como de ecosistema.

Para la evaluación de la toxicidad de las mezclas es necesario, en primer lugar, conocer bien los efectos de las sustancias actuando de manera individual, aplicando, por ejemplo, la normativa europea REACH (Regulation EC 1907/2006). Esta regulación está principalmente enfocada a la acción individual de los compuestos, pero sirve de orientación para la evaluación del riesgo de mezclas a partir de las propiedades individuales de sus componentes. En definitiva, es necesario una mayor compilación y sistematización de la información relacionada con la toxicidad de las mezclas, así como de las situaciones de exposición a ellas. Más allá de las listas de contaminantes prioritarios, definidas para ciertas áreas, se hace necesario el conocimiento de las mezclas presentes en el medio ambiente. Y consecuentemente, un mayor conocimiento sobre los efectos sinérgicos que tienen lugar, pudiendo, únicamente así, estimar estos comportamientos de las mezclas de tóxicos y avanzar en la protección del medio ambiente (Kortenkamp *et al.*, 2009).

## Ensayos ecotoxicológicos

Existen multitud de ensayos desarrollados para la obtención de resultados numéricos que determinen los efectos toxicológicos de los contaminantes en el medio ambiente. En estos tests se emplean diferentes organismos, llamados organismos diana, y distintos marcadores. Los marcadores hacen referencia a una propiedad medida en el organismo a lo largo del experimento, la cual debe verse afectada por la sustancia cuya toxicidad está siendo analizada. Estos ensayos son llevados a cabo mediante la adición de concentraciones conocidas del contaminante al organismo y la medición de algún efecto o respuesta del marcador seleccionado, que cambiará en función de la dosis y el tiempo de contacto o exposición.

El efecto está directamente relacionado con dos variables, la dosis y el tiempo, aunque en general se contempla únicamente la relación dosis-efecto. Ésta se estudia en cada escenario, pudiendo ser determinada para diferentes organismos y diferentes marcadores. En la mayoría de casos, se trata de un efecto gradual. Gráficamente se aproxima a una hipérbola que muestra un incremento en el efecto cuando existe un aumento en la dosis, hasta llegar a un máximo en la dosis donde la curva se vuelve asintótica. Pero en la mayoría de ocasiones esta curva se desvía de la hipérbola para dar una forma sigmoïdal. Si es el logaritmo de la dosis lo que se representa, se obtiene una recta a partir de la cual se puede obtener la toxicidad de la sustancia. Otra forma de estudiar la respuesta, aunque empleada en menor medida, es mediante la estimación de la probabilidad de que se produzca (Repetto y Repetto, 2010).

A partir de estas representaciones gráficas se calcula la concentración de efecto medio,  $EC_{50}$ , correspondiente a la concentración del contaminante necesaria para afectar al 50% de la población. Se trata del valor empleado más ampliamente a la hora de evaluar la toxicidad de una sustancia (en la figura 1.1 se pueden observar los rangos marcados por la directiva europea a partir de los cuáles se determina el nivel de toxicidad).

Aunque también se calculan otros valores, como las  $EC_i$  (siendo  $i$  los distintos porcentajes de población afectada, principalmente  $EC_{10}$ ,  $EC_{20}$ , y  $EC_{90}$ ), la concentración letal  $LC_{50}$  (lethal concentration), concentración a la cual la mitad de las especies muere, y la concentración sin efecto observable, NOEC (non-observed effect concentration), correspondiente a la mayor concentración a la cual no se aprecia ningún efecto en el organismo.

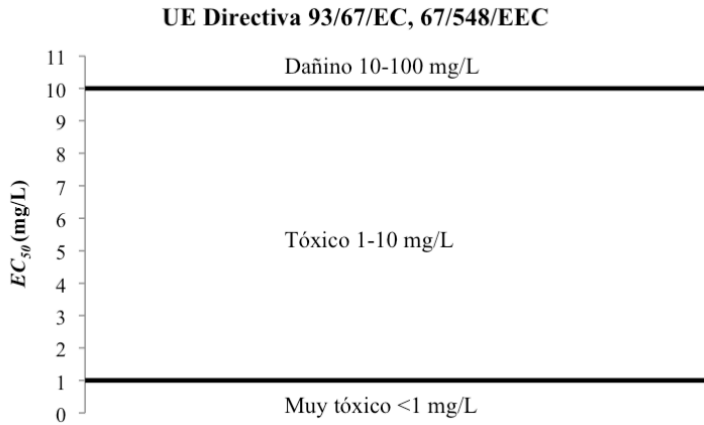


Figura 1.1. Niveles de toxicidad marcados por la Directiva Europea 93/67/EC en función de los valores de  $EC_{50}$  en mg/L para una determinada sustancia.

## 1.2 Presencia de contaminantes orgánicos en el medio ambiente

La eficacia de las plantas de tratamiento de aguas residuales en la eliminación de microcontaminantes orgánicos es limitada, sobre todo cuando se llevan a cabo tratamientos secundarios como los filtros biológicos y los procesos con fangos activados (Gómez *et al.*, 2007). Y esto, inevitablemente, contribuye enormemente a la contaminación de las masas de agua receptoras de los efluentes de estas plantas (Martínez-Bueno *et al.*, 2012), llegando a detectarse estos contaminantes en el agua potable (Kim *et al.*, 2007; Stackelberg *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2007). La zona no saturada es también susceptible de sufrir esta contaminación en el caso de reutilizar los efluentes para riego o de emplear los lodos de depuradora como fertilizantes (Kinney *et al.*, 2006). Prácticas que, por otra parte, se han incrementado debido a la escasez de agua, ya que la agricultura supone aproximadamente el 70% del consumo de agua dulce (Zimmerman *et al.*, 2008); en estos casos, los contaminantes son continuamente introducidos en el medio ambiente, por lo que no es necesario que se trate de sustancias persistentes para producir afecciones a los ecosistemas que los reciben (Petrović *et al.*, 2003). Incluso a bajas concentraciones, la aparición de estos contaminantes puede suponer efectos adversos crónicos en la salud, especialmente en lugares altamente contaminados y particularmente cuando la mezcla de estos contaminantes orgánicos produce efectos combinados (Schnell *et al.*, 2009).

La presencia de estos contaminantes orgánicos (emergentes y prioritarios) en el medio ambiente se ha convertido en un tema de creciente preocupación por lo que se está dedicando mucho esfuerzo al estudio de este fenómeno y las consecuencias que pueda tener. Dentro del grupo de los contaminantes emergentes, tanto los fármacos y productos de cuidado e higiene personal (PPCPs: Pharmaceuticals and Personal Care Products) ampliamente utilizados por la población, como los compuestos químicos de uso industrial, son los más investigados. Esto se debe, por un lado, a la frecuencia de su aparición en matrices ambientales, y por otro, a sus efectos, hasta hace pocos desconocidos y que han demostrado ser bastante nocivos para muchos organismos.

Estos efectos tienen lugar incluso a concentraciones muy bajas del orden de los ng/L, detectadas en muestras ambientales (Hayes *et al.*, 2002 a, b y c; Gagné *et al.*, 2006; Hua *et al.*, 2006).

Estudios previos han mostrado amplios rangos de niveles traza para los compuestos más frecuentemente detectados en agua residual, efluentes de plantas de tratamiento y aguas superficiales. Por su parte, la capacidad de eliminación se ve afectada por varios parámetros, como las propiedades físico-químicas de los compuestos, los procesos de tratamiento y las condiciones ambientales (Carballa *et al.*, 2004; Nakada *et al.*, 2006). Y si finalmente los contaminantes alcanzan el medio ambiente, algunos de ellos pueden quedar adsorbidos por los sedimentos, transformados a otros compuestos por procesos abióticos o bióticos, volatilizados o degradados por fotólisis (Tixier *et al.*, 2003; Vieno *et al.*, 2005; Castiglioni *et al.*, 2006). Las concentraciones en las aguas naturales son mucho menores que en los efluentes. Pero teniendo en cuenta el incremento del uso de estas sustancias y sus propiedades (la mayoría son xenobióticos, disruptores endocrinos, no biodegradables, tóxicos o persistentes), la preocupación no debe disminuir.

### **Productos de cuidado e higiene personal**

El grupo de los productos de cuidado e higiene personal lo conforman compuestos usados para producir jabones, lociones, pastas de dientes, fragancias, cremas solares, etc. Se producen para consumo humano o veterinario, formando parte de multitud de fungicidas y desinfectantes de uso industrial (Daughton y Ternes, 1999). Además, se consumen en grandes cantidades y son altamente persistentes, bioactivos y potencialmente bioacumulativos (Peck, 2006; Mackay y Barnhouse, 2010). Dentro de este grupo, el **triclosán**, un antimicrobiano, destaca por su elevado consumo y por ser considerado un contaminante muy persistente en el medio ambiente.

### **Productos farmacéuticos**

Los fármacos son un gran grupo de compuestos usados para la lucha contra enfermedades, evitar embarazos no deseados o enfrentarse al estrés, entre otras funciones, especialmente diseñados para ser biológicamente activos. Por

tanto, tanto los propios fármacos, como sus metabolitos presentes en el medio ambiente, suponen un riesgo potencial para los organismos del medio que los recibe. Basado en datos toxicológicos y concentraciones ambientales disponibles en la bibliografía, los riesgos por toxicidad aguda son improbables, pero los efectos crónicos no pueden descartarse (Carlsson *et al.*, 2006; Fent *et al.*, 2006; Hernando *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2007; Grung *et al.*, 2008). Una proporción importante de los medicamentos consumidos en el mundo, y consecuentemente encontrados en las aguas residuales, son los antiinflamatorios, destacando entre ellos el **ibuprofeno**.

### **Productos de uso industrial**

En el grupo de los contaminantes de uso industrial destacan los compuestos perfluorinados (PFCs), con multitud de aplicaciones industriales debido a su estabilidad térmica (Prevedouros *et al.*, 2006) y que han sido recientemente encontrado en medios acuáticos (Schultz *et al.*, 2006; Loganathan *et al.*, 2007; Nakayama *et al.*, 2007; Konwick *et al.*, 2008). Son ampliamente consumidos, persistentes, bioacumulativos, con demostrada toxicidad en animales y alta ecotoxicidad, y con evidencias que sugieren efectos adversos en la salud humana (Lau *et al.*, 2007). Los principales compuestos dentro de este grupo son el ácido de perfluorooctano sulfónico (PFOS) y el **ácido perfluorooctanoico (PFOA)**, productos finales de la descomposición de compuestos alquilo fluorados (3M, 2000 y 2001).

### **Pesticidas**

Otro importante grupo de contaminantes lo conforman los pesticidas, sustancias o mezclas de sustancias generadas para prevenir, destruir, repeler o mitigar plantas o animales indeseados. Se ha experimentado un gran aumento en su consumo durante las dos últimas décadas, debido a los cambios en las prácticas agrícolas y la implantación de la agricultura intensiva. Consecuentemente, su presencia en el medio ambiente ha aumentado también. La contaminación por pesticidas tiene lugar principalmente en las aguas subterráneas y en las superficiales por recarga de los acuíferos o escorrentías superficiales, habiéndose encontrado incluso en agua de lluvia (Planas *et al.*, 2006). La **atrazina**, un herbicida organoclorado muy utilizado

en la agricultura, se encuentra en la lista de contaminantes prioritarios. En España, la legislación ha fijado un máximo de 1 µg/L para aguas continentales (RD 995/2000), ya que ha sido identificado como una amenaza potencial para los “organismos no objetivo” en los ecosistemas acuáticos (Graymore *et al.*, 2001; Hayes *et al.*, 2002 a, b y c; Kumari *et al.*, 2009).

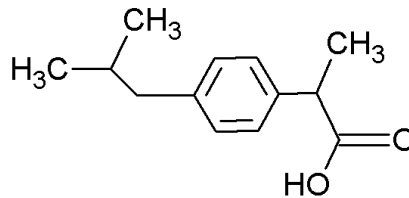
Teniendo en cuenta las afecciones que la aparición de los microcontaminantes orgánicos en el medio ambiente conlleva y los escasos trabajos que se han realizado hasta ahora con el fin de determinar la toxicidad de éstos, tanto en medio acuático como en medio terrestre, se ha elegido un compuesto de cada uno de los cuatro grandes grupos aquí presentados. La selección se ha elaborado atendiendo a factores como la frecuencia de aparición en muestras ambientales y los datos toxicológicos existentes hasta la fecha, poniendo de manifiesto la necesidad de su estudio y la relevancia de los resultados que se puedan obtener. Siguiendo estos criterios, los cuatro contaminantes que se han escogido son: ibuprofeno, PFOA, atrazina y triclosán. Para el estudio de la toxicidad de estas cuatro sustancias, es necesario conocer sus principales características, que se presentan a continuación.

### *Ibuprofeno*

El ibuprofeno es uno de los antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos más demandados, cuyas dosis terapéuticas recomendadas son relativamente altas, entre 200 y 1.200 mg/día (Poiger *et al.*, 2003). Su producción anual se estima en varias toneladas, correspondiéndose con un elevado consumo a nivel global (Buser *et al.*, 1999). Comercialmente, este fármaco está disponible como ácido propanoico 2-(4-isobutilfenil). Se trata de un ácido orgánico con valores de pK<sub>a</sub> alrededor de 5,2 (McAvoy, 1990), por lo que pertenece al grupo de los fármacos ácidos (SRC, 2003). En un esfuerzo por elaborar una lista común de medicamentos relacionados con el ciclo del agua, se ha incluido al ibuprofeno en la clase 1, lo que lo sitúa en el grupo de alta prioridad (Puijker, 2004).



Este medicamento se excreta en un grado bastante significativo, entre un 70 y un 80% de la dosis terapéutica como compuesto original, libre o conjugado, o como sus metabolitos. Estos son el hidroxibuprofeno, el carboxibuprofeno y el ácido carboxihidrático, los cuales no sólo presentan una gran toxicidad aguda, sino que también se sospecha que pueden actuar como disruptores endocrinos en humanos y animales (Hutt y Caldwell, 1983; Arriaga *et al.*, 2008). Esto lo convierte en uno de los medicamentos más encontrados en muestras medioambientales de todo el mundo, debido también a su persistencia ante los procesos de biodegradación y su solubilidad en agua (Buchberger, 2007; Martínez-Bueno *et al.*, 2012).



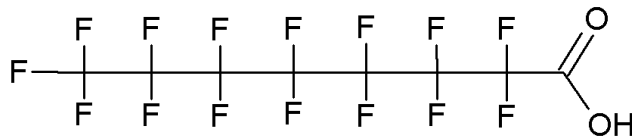
<i>Fórmula molecular</i>	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>
<i>Peso molecular (g/mol)</i>	206,28
<i>Color/Forma</i>	Blanco / Sólido cristalino estable

Figura 1.2. Estructura del ibuprofeno.

Distintos experimentos de laboratorio con aguas naturales muestran que la fototransformación es un proceso que afecta ínfimamente al ibuprofeno, por lo que la biodegradación es la única vía de eliminación del compuesto (Buser *et al.*, 1999). Por otro lado, sus propiedades físico-químicas sugieren una alta movilidad en el agua, donde es parcialmente adsorbido por los suelos y los sedimentos debido a su coeficiente de partición octanol-agua, logK<sub>OW</sub>, de 3,97 (Avdeef, 1993). La volatilización desde la superficie del agua no juega un papel importante ya que presenta una constante de Henry de 1,5x10<sup>-7</sup> atm m<sup>3</sup>/mol. Por su parte, la bioconcentración en organismos acuáticos esperada es baja, con un factor de bioconcentración de 3 (<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~f4BVto:1>). La evaluación del riesgo ambiental que supone la presencia del ibuprofeno en el medio ambiente es complicada a causa de la falta de datos ecotoxicológicos y a la dificultad de detectarlo en las muestras ambientales.

### Ácido perfluorooctanoico (PFOA)

El ácido perfluorooctanoico, conocido como PFOA, es un compuesto orgánico fluorinado que pertenece al grupo de los ácidos carboxílicos perfluorinados con una cadena principal de ocho carbonos. Se produce y consume en multitud de productos comerciales y procesos industriales desde hace más de 60 años (Lindstrom *et al.*, 2011). Debido a sus propiedades físico-químicas específicas, especialmente su estabilidad térmica y su baja energía libre de superficie (Kissa, 2001), el PFOA presenta numerosos usos, como emulsionante en la producción de fluoropolímeros y fluoroelastómeros, revestimiento antiadherente en utensilios de cocina, membrana impermeable de ropa transpirable, protector de cableado eléctrico, protección ante agentes químicos y el fuego en tuberías, tratamiento de superficies o protección de papel para envases (Cornelis *et al.*, 2012). La preocupación medioambiental sobre esta sustancia se debe a su persistencia, tanto biótica como abiótica, su bioacumulación y magnificación, así como a su toxicidad crónica (Lehmler, 2005; Prevedouros *et al.*, 2006). Se ha sugerido que el PFOA puede ser además generado por ciertos precursores durante el tratamiento biológico de las aguas residuales (Murakami *et al.*, 2009).



Fórmula molecular	C <sub>8</sub> HF <sub>15</sub> O <sub>2</sub>
Peso molecular (g/mol)	414,09
Color/Forma	Blanco / Polvo

Figura 1.3. Estructura del PFOA.

El PFOA ha emergido como una nueva clase de contaminante a nivel global encontrándose frecuentemente en agua, aire, suelo, sedimento, alimentos, animales y humanos (Giesy y Kannan, 2002 y 2010; Higgins y Luthy, 2006; Houde *et al.*, 2006; Yeung *et al.*, 2006; Ahrens *et al.*, 2009). La extensa distribución geográfica de este contaminante se debe a tres causas principales: se descarga directamente al agua en la producción industrial; se genera en la degradación microbiana de otros compuestos perfluorinados; y se descarga en efluentes de plantas de tratamiento de aguas, ya que los procesos convencionales de lodos activados no lo eliminan de manera efectiva

(Boiteux *et al.*, 2012). Las aguas subterráneas, a su vez, pueden también contaminarse por lixiviados a través del suelo. Aunque posee una movilidad reducida en el medio edáfico, basándonos en su coeficiente de partición octanol-agua ( $\log K_{ow}$ ) de 6,3 (USEPA, 2009a), no se ha demostrado que sufra una adsorción muy alta en suelos con alto contenido en materia orgánica y arcilla. Y la volatilización desde las aguas superficiales tampoco es un proceso importante que elimine este compuesto, ya que presenta una presión de vapor de 0,525 mmHg a 25 °C (Hekster *et al.*, 2003). Los factores de bioconcentración medidos, entre 3,1 y 9,4, sugieren una bioconcentración media en los organismos acuáticos (<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~Goesaa:1>). En cuanto a su toxicidad, su persistencia frente a los procesos de degradación típicos y su bioconcentración hacen que posea un potencial de toxicidad en los organismos elevado (Giesy *et al.*, 2010). Se ha demostrado toxicidad aguda en invertebrados de agua dulce pero no en peces (Hekster y de Voogt, 2002; Hekster *et al.*, 2003). Y para los mamíferos, altas dosis pueden conducir a toxicidad hepática, inmunotoxicidad, neurotoxicidad e incluso a efectos en la conducta (Lange *et al.*, 2006). La evaluación del riesgo ambiental que supone el PFOA (poco estudiado), presenta un riesgo bajo en medios acuáticos, aunque prácticamente sólo se ha evaluado en organismos marinos (Mhadhbi *et al.*, 2012).

### *Atrazina*

La atrazina (6-cloro-N-etil-N'-(1-metiletil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina) es un herbicida del grupo de las triazinas usado en multitud de cultivos, como el maíz, el sorgo y la caña de azúcar (USEPA, 2001). El uso de este herbicida en EEUU ha superado las 32.000 toneladas por año en los últimos 15 años (Donaldson *et al.*, 2002; Aspelin, 2003; Gianessi y Reigner, 2006; USEPA, 2006). Normalmente se aplica en situación de pre-emergencia o antes de que los cultivos o las malas hierbas hayan germinado, y actúa mediante la inhibición del transporte de electrones del fotosistema II, por lo que resulta ser un disruptor de la fotosíntesis (Roberts, 1998). Este compuesto persiste ante situaciones adversas como el frío y la sequedad y en ambientes de pH estable, por lo que ha sido prohibido en muchos países de climas fríos con

texturas finas de suelos. En el año 2000, la legislación española fijó para aguas continentales una concentración máxima de 1 µg/L para cuatro pesticidas, entre los que se encontraba la atrazina.

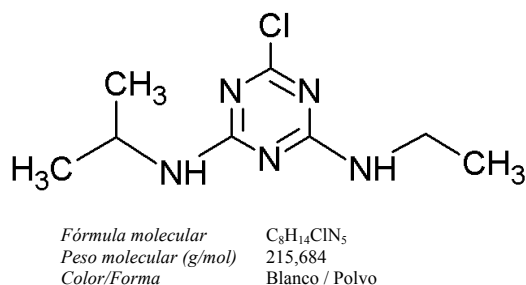


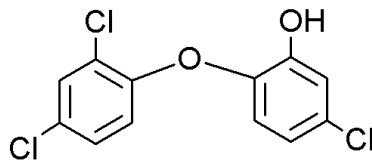
Figura 1.4. Estructura de la atrazina.

A causa del uso de la atrazina como herbicida de pre y post-emergencia, puede aparecer en el medio ambiente debido a su introducción inmediata sobre el terreno o por lixiviación a través del perfil del suelo a causa de la lluvia o riegos sucesivos. Se ha demostrado su movilización en suelos bajo condiciones de lluvias cuantiosas, por lavado de las capas más superficiales, lo que supone la contaminación tanto de las aguas superficiales como de las aguas subterráneas (WHO, 1990). La velocidad de degradación de la atrazina en medios acuáticos es variable, encontrando vidas medias entre 3 y 12 días en muestras sedimento/agua (Jones *et al.*, 1982), con una constante de disociación pK<sub>a</sub> de 1,60 (McBean, 2008-2010). Puede ser adsorbida por el suelo y los sedimentos, ya que presenta un coeficiente de partición octanol-agua (logK<sub>OW</sub>) de 2,61 (Hansch *et al.*, 1995). En las aguas superficiales puede sufrir fotólisis bajo el efecto de la radiación solar, lo cual disminuye su concentración, pero la volatilización no es un proceso determinante, ya que presenta un constante de Henry de 2,6x10<sup>-9</sup> atm m<sup>3</sup>/mol. El rango del factor de bioconcentración va desde <0,27 a 100 (detectado en peces), determinándose entre baja y moderada para organismos acuáticos (<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~9rAYEk:1>). La toxicidad hasta ahora estudiada demuestra que no se trata de un compuesto tóxico para los mamíferos y las aves, pero si lo es para peces e invertebrados acuáticos (USDA, 2006). Estudios más recientes indican que puede inducir anomalías en el desarrollo de anfibios, reptiles y peces a concentraciones menores de 0,1 µg/L (Hayes *et al.*, 2002 a, b y c y 2004; Tavera-Mendoza *et*

*al.*, 2002; Sullivan y Spence, 2003) y puede alcanzar los niveles de afección a la población en comunidades acuáticas a concentraciones entre 10 y 20 µg/L (USDA, 2006). Estos datos demuestran la potencial amenaza para los “organismos no objetivo”, sobre todo en ecosistemas acuáticos (Graymore *et al.*, 2001; Hayes *et al.*, 2002 a, b y c; Kumari *et al.*, 2009), tales como algas y artrópodos, que son las especies más vulnerables.

### Triclosán

El triclosán [5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)-fenol] es un agente antimicrobiano de amplio espectro y desinfectante introducido hace 40 años. En general se usa como preservativo sintético y agente antimicrobiano en un amplio rango de productos de cuidado e higiene personal de uso diario, como jabones de mano, cremas para la piel, pastas de dientes o desodorantes, con concentraciones entre el 0,1 y el 0,3%. Se emplea también en la producción de polímeros y fibras para aportar propiedades antibacterianas a estos materiales (Cuderman y Heath, 2007), así como en la producción de prendas deportivas, calzado, alfombras o juguetes de plástico actuando como biocida. Su actividad se basa en la inhibición de la enzima enoil-acil reductasa (ENR), bloqueando la biosíntesis de proteínas (Levy *et al.*, 1999). Todo ello contribuye a la dispersión de este compuesto en el medio ambiente. En Europa, se producen anualmente unas 350 toneladas de triclosán para aplicaciones comerciales (Singer *et al.*, 2002), mientras que en EEUU más de 300 toneladas por año se vierten a la red de saneamiento (Halden y Paull, 2005), por lo que su consumo se encuentra regulado tanto por la Environmental Protection Agency (EPA) como por la Food Drug Administration (FDA).



Fórmula molecular	C <sub>12</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
Peso molecular (g/mol)	289,54
Color/Forma	Blanco / Polvo

Figura 1.5. Estructura del triclosán.

La eficiencia en la eliminación del triclosán mediante fangos activados en las plantas de tratamiento de aguas residuales es aproximadamente del 96%, mientras que la eliminación con sistemas de filtración está entre el 58 y el 86% (McAvoy *et al.*, 2002). Esto produce la aparición de este contaminante en el medio ambiente por la descarga de efluentes a las aguas superficiales y la aplicación de fangos de depuradora sobre el terreno (Ying y Kookana, 2007). A esto hay que añadir la persistencia que presenta bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Ying *et al.*, 2007). Por otro lado, la baja solubilidad del triclosán en agua (unos 10 mg/L a 20 °C) y su coeficiente de partición octanol-agua ( $\log K_{OW}$ ) de 4,76 (NITE, 2012), sugieren que se reparte fácilmente entre la fase acuosa y la materia orgánica, tanto en el suelo como en los sedimentos, a los cuales queda adsorbido. La constante de Henry, de  $2,1 \times 10^{-8}$  atm m<sup>3</sup>/ mol, indica que su volatilización no es un proceso relevante para su eliminación de las masa de agua (<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~VyevNz:1>). Debido a todas estas propiedades y a su elevado consumo, se ha encontrado en muestras ambientales procedentes de distintos compartimentos, como aguas superficiales y subterránea (Singer, 1999). Esto, unido a su degradación a otros compuestos tóxicos, junto con su elevado potencial de bioacumulación en el medio acuático, han hecho que el triclosán se convierta en un problema medioambiental de gran relevancia (Balmer *et al.*, 2004; Chau *et al.*, 2008; DeLorenzo *et al.*, 2008). Además, se ha demostrado que tiene una gran toxicidad para las algas y algunas especies de peces, particularmente en las fases tempranas de su desarrollo (Tatarazako *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2008; Chalew y Halden, 2009; USEPA, 2009b), lo que implica la existencia de riesgos potenciales para los organismos acuáticos a las concentraciones detectadas.

### 1.3 Métodos para la evaluación de la toxicidad de mezclas de contaminantes

La toxicidad ambiental de los microcontaminantes orgánicos ha sido extensamente estudiada, pero los métodos aplicados generalmente analizan esta toxicidad para los compuestos de manera individual. Sin embargo, estos contaminantes aparecen como mezclas complejas, cuyas toxicidades varían en función de la complejidad de la propia combinación. Por tanto, tanto los estudios ecotoxicológicos como los diseños de estrategias para la evaluación del riesgo ambiental, pueden estar subestimando los valores de los riesgos ecológicos asociados a estas sustancias (Kortenkamp *et al.*, 2009). Aunque las concentraciones de los contaminantes sean bajas, al encontrarse mezclados pueden tener efectos ecotoxicológicos mucho mayores de los esperados (Brain *et al.*, 2004). Recientemente, a consecuencia de esto, se han empezado a desarrollar numerosos estudios enfocados a la evaluación toxicológica de las mezclas de contaminantes, definiéndose tres tipos básicos de acción de mezcla. Podemos encontrar sustancias de acción similar (adición dosis-concentración), sustancias de acción no similar (acción independiente) y sustancias con interacciones (Loewe y Muischnek, 1926; Bliss, 1939; Plackett y Hewlett, 1948 y 1952).

#### Mezclas de acción similar

En general, se acepta que las mezclas de compuestos con modo de acción toxicológica similar actúan de acuerdo al modelo de adición dosis-concentración. Sus efectos pueden estimarse de manera directa a partir de la respuesta de los componentes actuando individualmente (adición de las respuestas) o como la suma de las respuestas biológicas (adición de los efectos). Este modelo se considera realista ya que los valores de toxicidad predichos se encuentran en el orden de magnitud de los resultados experimentales (Altenburger *et al.*, 2004). Normalmente, las dosis o concentraciones de los compuestos son añadidas después de ser multiplicadas por un factor de escala que tiene en cuenta las diferencias en la potencia de las sustancias actuando de manera individual.

Tanto para fármacos de la misma clase, como para mezclas de pesticidas, se han realizado ensayos de toxicidad en agua y se ha demostrado que el modelo de adición proporciona buenas predicciones de toxicidad (Deneer, 2000; Brian *et al.*, 2007; Kortenkamp, 2008).

Para la aplicación del modelo de acción similar, conocido como el modelo de Adición de Concentración (Concentration Addition, *CA*) se utiliza la siguiente expresión:

$$EC_{mix} = \left( \sum_i^n \frac{p_i}{EC_{xi}} \right)^{-1} \quad (1.1)$$

$EC_{mix}$  efecto a la concentración total de la mezcla

$EC_{xi}$  concentración de cada componente de la mezcla que da ese mismo nivel de efecto cuando es aplicado de manera individual

$p_i$  fracción molar de cada uno de los componentes

### **Mezclas de acción no similar**

Alternativamente al modelo de adición, se presenta el concepto de acción independiente, el cual asume una acción distinta de la mezcla de tóxicos que interacciona con los diferentes sitios de las moléculas objetivo, llevando a un mismo punto final desde el punto de vista toxicológico mediante vías distintas para un mismo organismo (Bliss, 1939). Consecuentemente, las mezclas de compuestos de acción independiente no suponen un riesgo mientras las dosis o concentraciones de los componentes permanezcan por debajo de sus niveles de efecto tóxico individuales. Walter *et al.* (2002) y Faust *et al.* (2003) demostraron que, para mezclas multi-componente de sustancias con mecanismos de acción completamente diferente, el modelo de no aditividad es adecuado para describir su toxicidad, asumiendo el principio de acción independiente.



Para este modelo de acción no similar, también denominado modelo de Acción Independiente (Independent Action, *IA*), la toxicidad de la mezcla en términos de la probabilidad de afección debida a cada componente se puede expresar como:

$$p_M = 1 - (1 - p_1)(1 - p_2) \dots (1 - p_n) \quad (1.2)$$

$p_M$  respuesta debida a la mezcla

$p_1, p_2, \dots, p_n$  respuestas debidas a cada uno de los componentes presentes en una concentración específica

Esta ecuación puede escribirse también como (Altenburger *et al.*, 2004):

$$E(c_{mix}) = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - E(c_i)) \quad (1.3)$$

$E(c_{mix})$  efecto a la concentración total de la mezcla ( $c_{mix}$ )

$E(c_i)$  efectos de los componentes a la concentración en que se hallan en la mezcla

Pudiendo expresarse a su vez como:

$$E(c_{mix}) = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - p_i(c_{mix})) \quad (1.4)$$

$p_i$  fracción molar de cada uno de los componentes

$c_{mix}$  concentración total de la mezcla

### Mezclas de sustancias con interacciones

El efecto combinado de dos o más compuestos puede ser mayor o menor que el esperado al basarse en el principio de adición (mezclas con sustancias de acción similar). Esto se debe a las posibles interacciones que tienen lugar, que pueden ser principalmente de tres tipos: toxicocinéticos (interacciones entre los compuestos en su actuación toxicológica, causa común de las desviaciones de la aditividad), metabólicos (compuestos que modifican el

metabolismo de los otros compuestos de la mezcla) y toxicodinámicos (interacciones entre las respuestas biológicas producidas). Dan como resultado comportamientos sinérgicos, potenciados, supraaditivos, antagonistas, inhibidores, subaditivos o infraaditivos (SCHER, SCCS, y SCENIHR, 2012). Muchos estudios han mostrado, además, diferentes tipos de sinergia: sinergia que comienza alrededor de los niveles de efecto de los compuestos individuales, sinergia a bajas dosis y sinergias que producen una respuesta mayor que la aditiva a la menor dosis con efecto negativo para cada componente (Moser *et al.*, 2005 y 2006; Christiansen *et al.*, 2009; Boobis *et al.*, 2011).

#### *Combination Index (CI)-isobologram method*

La mayoría de ensayos de ecotoxicidad se han destinado a obtener información para los niveles de la dinámica de población. En toxicología, los ensayos muestran la probabilidad de que un individuo sea afectado, mientras que en ecotoxicología, los ensayos están enfocados a determinar la fracción afectada de la población del organismo objetivo. Se considera, además, que los efectos de una sustancia tóxica sobre la dinámica de la población son el resultado de los efectos sobre los individuos. En cuanto a la población, el concepto de sinergia implica a los efectos combinados hacia los distintos grupos taxonómicos y las consecuencias indirectas en la estructura y el funcionamiento de la comunidad. Para la determinación de la respuesta de un organismo a la exposición de un tóxico puede ser empleada la ecuación de efecto medio. Esta ecuación es una derivación matemática (mediante deducción e inducción) de la ley de acción de masas aplicada al estado estacionario de equilibrio para diferentes secuencias de reacciones y mecanismos y distintos tipos de inhibición (Chou y Talalay, 1984):

$$\frac{f_a}{1-f_a} = \left( \frac{D}{EC_{50}} \right)^m \quad (1.5)$$

$f_a$  fracción de población afectada por cierta dosis

$D$  dosis o concentración del tóxico

$EC_{50}$  potencialidad del efecto

$m$  parámetro que da la forma de la curva descrita

La  $EC_{50}$ , como se explicó en el apartado 1.1, es la concentración requerida para detectar un efecto negativo en el 50% de la población (50% de inhibición del marcador elegido). Para la determinación de estos parámetro, en lugar de ajustar los datos experimentales a una curva fijada, se representa la curva que mejor se ajusta a los datos del ensayo. Y a partir de ésta se calculan la  $EC_{50}$ , la potencialidad y la forma simultáneamente, dando la misma importancia a todos los datos empíricos. Una vez obtenidos los parámetros, se calcula el efecto combinado sobre la población expuesta al tóxico de acuerdo con la ecuación del Índice de Combinación (CI)-isoblograma (Chou y Talalay, 1984), que es independiente del mecanismo de acción y de la ruta de exposición (Chou, 2006):

$${}^n(CI)_x = \sum_{j=1}^n \left[ \frac{D_j}{(D_x)_j} \right] = \sum_{j=1}^n \frac{(D_x)_{1-n} \left[ \frac{[D]_j}{\sum_1^n [D]} \right]}{(D_m)_j \left[ \frac{(f_{ax})_j}{1-(f_{ax})_j} \right]^{\frac{1}{m_j}}} \quad (1.6)$$

${}^n(CI)_x$  índice de combinación para  $n$  sustancias al nivel de efecto del  $x$  %

$(D_x)_{1-n}$  suma de las dosis de  $n$  sustancias que produce el  $x$  % de inhibición en la combinación

$[D_j] / \sum_1^n [D]$  proporción de la dosis de cada sustancia que produce este  $x$  % de inhibición en la combinación

$(D_m)_j \{ (f_{ax})_j / [1 - (f_{ax})_j] \}^{1/m_j}$  dosis de cada sustancia en solitario que produce el  $x$  % de la inhibición

Los valores obtenidos para este índice indican los efectos de cada combinación de contaminantes:

$CI = 1$  indica aditvismo

$CI < 1$  indica sinergia

$CI > 1$  indica antagonismo

Además, se representan unos gráficos poligonales (poligonogramas), donde las líneas continuas representan sinergia, las líneas finas representan aditivismo y las líneas discontinuas representa antagonismo. Se pueden producir para mezclas a partir de 3 componentes, siendo triangulares, cuadrados, pentagonales, etc. El grosor de las líneas representa la intensidad de los efectos. Los poligonogramas pueden considerarse como la representación gráfica de todos los componentes de la mezcla, y proporcionan resultados visuales para comprender el complejo comportamiento de las mezclas en los distintos organismos estudiados (Chou *et al.*, 1994; Chou, 1998).

## 1.4 Evaluación del riesgo ambiental de mezclas de contaminantes

La evaluación del riesgo ambiental de las sustancias contaminantes se determina para conocer el impacto potencial de estas sustancias en el medio ambiente y los efectos en la estructura y funcionamiento de los ecosistemas. Por tanto, puede describirse como un proceso de análisis y evaluación de la posibilidad de aparición de efectos adversos causado por contaminantes ambientales (USEPA, 1998). La utilidad de estos procedimientos es muy diversa, usándose principalmente para conocer los efectos de los compuestos farmacológicos. Son aplicados, por ejemplo, para la determinación de fármacos que necesitan ser más investigados o que requieren mayores regulaciones, o para predecir el impacto de nuevos medicamentos liberados al medio ambiente. El método más convencional empleado para la determinación de este riesgo ecológico incluye la determinación de un “cociente de riesgo”, conocido como HQ (Hazard Quotient), que compara efectos estimados con concentraciones de exposición. Recientemente se están desarrollando enfoques probabilísticos, los cuales determinan la probabilidad de que una concentración exceda las concentraciones de efecto más esperadas (Solomon *et al.*, 2000; Chen, 2005; Wang *et al.*, 2008 y 2009; Iwai y Noller, 2010). Y también, aunque mucho menos aplicado, encontramos las Curvas de Respuesta Principal (Principal Response Curves).

### Cocientes de riesgo (HQ)

Se trata de un enfoque determinístico que consiste en la relación entre concentraciones ambientales, predichas o medidas (predicted environmental concentration-PEC y measured environmental concentration-MEC, respectivamente), con concentraciones sin efecto predichas (predicted no-effect concentration-PNEC). Para el cálculo de estos factores se tienen en cuenta cuatro puntos fundamentales:

- Identificación del riesgo
- Evaluación de la relación Dosis (concentración)-Respuesta
- Evaluación de las concentraciones de exposición
- Caracterización del riesgo

La cuantificación de este índice se realiza de acuerdo con la ecuación 1.7:

$$HQ = \frac{MEC}{PNEC} \quad (1.7)$$

Los valores obtenidos para este cociente determinarán el nivel de riesgo para el organismo empleado en el medio para el cual se han tomado los valores de exposición (EMEA, 2006):

HQ < 0,1 indica que no existe riesgo

0,1 < HQ < 1 indica que puede existir un riesgo

1 > HQ > 10 indica que existe un riesgo moderado

HQ > 10 indica que existe un riesgo alto

A la hora de extrapolar los valores de este índice para un ecosistema entero, se debe asumir que:

- La sensibilidad del ecosistema dependerá del organismo más sensible
- La protección de la estructura del ecosistema protege la función de la comunidad

Los valores de PNEC son normalmente calculados basándose en concentraciones críticas, como  $EC_{50}$ ,  $LC_{50}$  y NOEC (Palma *et al.*, 2004; Verro *et al.*, 2009a), y en general se divide por un factor de 1.000 (Sanderson *et al.*, 2003; EMEA, 2006; Von der Ohe *et al.*, 2011). El uso de este factor, conservativo y proteccionista, se recomienda al considerar la posibilidad de existir otras especies acuáticas más sensibles que las usadas (EC, 2003; Tauxe-Wuersch *et al.*, 2005). Los valores de PEC se calculan atendiendo a las velocidades de aplicación, la persistencia, el lixiviado, la escorrentía, la adsorción y la bioacumulación (Verro *et al.*, 2009b; Wang *et al.*, 2009) o directamente a partir de datos de monitoreo ambiental (MEC). Los valores de PEC estimados mediante procesos de monitoreo ambiental proporcionan una medida real, teniendo en cuenta la concentración residual, la respuesta hidrológica y las heterogeneidades del medio (ECOFRAM, 1999).

## Métodos probabilísticos

Los métodos probabilísticos proporcionan estimaciones cuantitativas del riesgo ecológico basándose en la distribución de las concentraciones de exposición en el medio ambiente y la distribución de los valores de toxicidad (Solomon y Sibley, 2002; Hela *et al.*, 2005). Se asume, generalmente, que los valores de  $LC_{50}$  tanto para los test sobre especies como sobre comunidades pueden entenderse como ensayos aleatoriamente independientes de una distribución log-logística (Kooijman, 1987). Se emplea un cociente, el  $HC_5$  (concentración de peligro para el 5% de las especies), en un ecosistema, que es calculado siguiendo el modelo presentado en la ecuación 1.8, basada en la distribución de la sensibilidad de las especies con el fin de proteger al 95 % de éstas (Aldenberg y Slob, 1993; Steen *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2008).

$$HC_5 = \exp(x_m - k_L s_m) \quad (1.8)$$

donde  $m$  es el número de especies del test,  $x_m$  es la media de los niveles de efecto ln-transformados ( $LC_{50}$  o  $EC_{50}$ ),  $s_m$  es la desviación estándar de los niveles efectos ln-transformados y  $k_L$  es la constante de extrapolación. El valor de esta constante de extrapolación se calcula como describieron Aldenberg y Slob (1991). Y la evaluación de riesgo se estima siguiendo la ecuación 1.9:

$$ERQ = \frac{MEC}{HC_5} \quad (1.9)$$

Otra manera de estimar probabilísticamente el riesgo ambiental es mediante el uso de la ecuación 1.10, donde la probabilidad ( $P$ ) se define como especies aleatorias del ecosistema que se verán afectadas por las concentraciones ambientales ( $C$ ) (Steen *et al.*, 1999), siendo el resto de factores los presentados para la ecuación 1.8. Los resultados obtenidos informan del porcentaje de especies que pueden ser afectadas por la sustancia analizada:

$$P = \left\{ 1 + \exp \left[ \frac{x_m - \ln C}{k_L / \ln(95/5) s_m} \right] \right\}^{-1} \quad (1.10)$$

## **Curvas de Respuesta Principal**

Otro método, aunque mucho menos empleado, es el llamado método de las Curvas de Respuesta Principal, especialmente diseñado para el análisis de datos de experimentos con microcosmos. Es una técnica multivariable aplicada para obtener un diagrama que muestra las diferencias en la composición de especies entre los regímenes de tratamiento y los controles a medida que se desarrolla en el tiempo (Van der Brink y Ter Braak, 1998 y 1999). Únicamente proporciona información previa sobre la toxicidad de los contaminantes y el riesgo que esta supone, pero no se trata de un método de estimación cuantitativa para determinar un riesgo ecológico.



## 1.5 Objetivos

La presencia de microcontaminantes orgánicos en el medio ambiente puede conllevar un riesgo ambiental, cuya intensidad dependerá, a su vez, de la existencia o no de interacciones entre compuestos. Partiendo de que el ibuprofeno es un medicamento de elevado consumo y consecuentemente la contaminación ambiental es inevitable, en este estudio se plantean los siguientes objetivos:

1. Estimación de la movilidad del ibuprofeno en el suelo y su consecuente disponibilidad en distintos compartimentos ambientales.
2. Determinación de los distintos comportamientos sinérgicos existentes entre el ibuprofeno y otros microcontaminantes orgánicos, emergentes y prioritarios, tanto en suelo como en agua.
3. Cuantificación del riesgo ambiental en medio acuático y terrestre debido a la presencia del ibuprofeno y a las sinergias con otros compuestos.

Para lograr estos objetivos generales es necesaria la progresiva consecución de una serie de objetivos específicos, que se han definido a lo largo del trabajo y están expuestos en los capítulos 2 a 6. De estos capítulos, y hasta el momento, se han publicado los siguientes trabajos:

### **Capítulo 2. Movilidad del ibuprofeno en suelo**

González-Naranjo, V., Boltes, K., Biel, M. (2013). *Mobility of ibuprofeno, a persistent active drug, in soils irrigated with reclaimed water*. Plant, Soil and Environment. 59, 68-73.

### **Capítulo 3. Ecotoxicología del ibuprofeno en agua: efectos sobre el crecimiento de *Pseudokirchneriella subcapitata***

Boltes, K., González-Naranjo, V. (2013). *Ecological risk assessment of ibuprofen in aquatic environments: an approach for complex mixture of contaminants*. Ibuprofen: Clinical Pharmacology, Medical Uses and Adverse Effects. Nova Publishers. pp. 85-158.

**Capítulo 4. Ecotoxicología del ibuprofeno en suelo: efectos sobre la elongación de las raíces de *Sorghum bicolor***

González-Naranjo, V., Boltes, K. (2013). *Toxicity of ibuprofeno and perfluorooctanoic acid for risk assessment of mixtures in aquatic and terrestrial environments*. International Journal of Environmental Science and Technology. En revisión.

**Capítulo 5. Ecotoxicología del ibuprofeno en suelo: efectos sobre la fluorescencia de la clorofila *a* de *Sorghum bicolor***

González-Naranjo, V., Boltes, K. (2013). *Chlorophyll *a* fluorescence analysis for risk assessment of ibuprofen and perfluorooctanoic acid mixtures in terrestrial environments*. En preparación.

## 1.6 Bibliografía

- 3M (2000). Biodegradation study of PFOS. USEPA Administrative Record Number AR226-0057.
- 3M (2001). Executive Summary of Biodegradation Studies. USEPA Administrative Record AR226-1030a107.
- Ahrens, L., Felizeter, S., Ebinghaus, R. (2009). Spatial distribution of polyfluoroalkyl compounds in seawater of the German Bight. *Chemosphere*. 76, 179-184.
- Aldenberg, T. Slob, W. (1991). RIVM Report of Confidence Limits for Hazardous Concentrations Based on Logistically Distributed Noec Toxicity Data. National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, The Netherlands.
- Aldenberg, T. Slob, W. (1993). Confidence limits for hazardous concentrations based on logistically distributed noec toxicity data. *Ecotoxicological and Environmental Safety*. 25, 48-63.
- Altenburger, R., Walter, H., Grote, M. (2004). What contributes to the combined effect of a complex mixture?. *Environmental Science and Technology*. 38, 6353-6362.
- Arriaga, F., Palma, R.A., Pêtrier, C., Esplugas, S., Gimenez, J., Pulgarin, C. (2008). Ultrasonic treatment of water contaminated with ibuprofen, *Water Research*. 42, 4243-4248.
- Aspelin, A.L. (2003). Pesticide usage in the United States: trends during the 20th century. CIPM Technical Bulletin 105. Office of Pesticides Programs, USEPA, Washington, D.C.
- Avdeef, A. (1993). pH-metric log-p .2. refinement of partition-coefficients and ionization-constants of multiprotic substances. *Journal of Pharmaceuticals Sciences*. 82, 183-190.
- Baird, D., Christian, R.R., Peterson, C.H., Johnson, G.A. (2004). Consequences of hypoxia on estuaries ecosystem function: energy diversion from consumers to microbes. *Ecological Applications*. 14, 805-822.
- Balmer, M.E., Poiger, T., Droz, C., Romanin, K., Bergqvist, P.A., Müller, M.D., Buser, H.R. (2004). Occurrence of methyl triclosan, a transformation product of the bactericide triclosan, in fish from various lakes in Switzerland. *Environmental Science and Technology*. 38, 390-395.
- Beasley, V.R. (1993). Ecotoxicology and ecosystem health: roles for veterinarians; goals for the Envirovet program. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 203, 617-628.
- Bliss, C.I. (1939). The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of Applied Biology*. 26, 585-615.
- Boiteux, V., Dauchy, X., Rosin, C., Munoz, J. (2012). National screening study on 10 perfluorinated compounds in raw and treated tap water in France. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 63, 1-12.
- Boobis, A.R., Budinsky, R., Collie, S., Crofton, K., Embry, M., Felter, S., Hertzberg, R., Kopp, D., Mihlan, G. Mumtaz, M., Price, P., Solomon, K., Teuschler, L., Yang, R., Zaleski, R. (2011) Critical analysis of literature on low-dose synergy for use in screening chemical mixtures for risk assessment. *Critical Reviews in Toxicology*. 41, 369-83.
- Brain, R.A., Johnson, D.J., Richards, S.M., Hanson, M.L., Sanderson, H., Lam, M.W., Young, C., Mabury, S.A., Sibley, P.K., Solomon, K.R. (2004). Microcosm evaluation of the

- effects of an eight pharmaceutical mixture to the aquatic macrophytes *Lemna gibba* and *Myriophyllum sibiricum*. *Aquatic Toxicology*. 70, 23-40.
- Brian, J.V., Harris, C.A., Scholze, M., Kortenkamp, A., Booy, P., Lamoree, M., Pojana, G., Jonkers, N., Marcomini, A., Sumpter, J.P. (2007). Evidence of estrogenic mixture effects on the reproductive performance of fish. *Environmental Science and Technology*. 41, 337-344.
- Buchberger, W.W. (2007). Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge. *Analytical Chimica Acta*. 593, 129-139.
- Buser, H.R., Poiger, T., Muller, M.D. (1999). Occurrence and environmental behavior of the chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewater. *Environmental and Science Technology*. 33, 2529-2535.
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., Llompart, M., Garcia-Jares, C., Rodriguez, I., Gomez, M., Ternes, T. (2004). Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Research*. 38, 2918-2926.
- Carlsson, C., Johansson, A.K., Alvan, G., Bergman, K., Kühler, T. (2006). Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. *Science of the Total Environment*. 364, 67-87.
- Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R., Pomati, F., Calamari, D., Zuccato, E. (2006). Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. *Environmental Science and Technology*. 40, 357-363.
- Chalew, T.E.A., Halden, R.U. (2009). Environmental exposure of aquatic and terrestrial biota to triclosan and triclocarban, *Journal of American Water Resources Association*. 45, 4-13.
- Chau, W.C., Wu, J., Cai, Z. (2008). Investigation of levels and fate of triclosan in environmental Waters from the analysis of gas chromatography coupled with ion trap mass spectrometry. *Chemosphere*. 73, S13-S17.
- Chen, C.S. (2005). Ecological risk assessment for aquatic species exposed to contaminants in Keelung River, Taiwan. *Chemosphere*. 61, 1142-1158.
- Chou, T.C., Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*. 22, 27-55.
- Chou, T.C., Motzer, R., Tong, Y., Bosl, G. (1994). Computerized quantitation of synergism and antagonism of taxol, topotecan and cisplatin against teratocarcinoma cell growth: A rational approach to clinical protocol design. *Journal of the National Cancer Institute*. 86, 1517-1524.
- Chou, T.C. (1998). Drug combinations: from laboratory to practice. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 132, 6-8.
- Chou, T.C. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Review*. 58, 621-681.
- Christiansen, S., Scholze, M., Dalgaard, M., Vinggaard, A.M., Axelstad, M., Kortenkamp, A., Hass, U. (2009). Synergistic disruption of external male sex organ development by a mixture of four antiandrogens. *Environmental Health Perspectives*. 117, 1839-1846.

- Cornelis, C., D'Hollander, W., Roosens, L., Covaci, A., Smolders, R., Van den Heuvel, R., Govarts, E., Van Campenhout, K., Reynders, H., Bervoets, L. (2012). First assessment of population exposure to perfluorinated compounds in Flanders, Belgium. *Chemosphere*. 86, 308-314.
- Cuderman, P., Heath, E. (2007). Determination of UV filters and antimicrobial agents in environmental water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 387, 1343-1350.
- Daughton, C.G., Ternes, T.A. (1999). Pharmaceuticals and personal care products on the environment: agents of subtle change?. *Environmental Health Perspectives*. 107, 907-938.
- DeLorenzo, M.E., Keller, J.M., Arthur, C.D., Finnegan, M.C., Harper, H.E., Winder, V.L., Zdankiewicz, D.L. (2008). Toxicity of the antimicrobial compound triclosan and formation of the metabolite methyl-triclosan in estuarine systems. *Environmental Toxicology*. 23, 224-232.
- Deneer, J.W. (2000). Toxicity of mixtures of pesticides in aquatic systems. *Pest Management Science*. 56, 516-520.
- Directiva 93/67/CEE de la Comisión, de 20 de julio de 1993, por la que se fijan los principios de evaluación del riesgo, para el ser humano y el medio ambiente, de las sustancias notificadas de acuerdo con la Directiva 67/548/CEE del Consejo (DO L 227 de 8.9.1993, p. 9).
- Donaldson, D., Kiely, T., Grube, A. (2002). Pesticide industry sales and usage: 1998 and 1999 market estimates. US Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs. EPA-733-R-02-001, pp. 33.
- EC (2003). Technical guidance document on risk assessment, TGD Part II. Technical Report, Institute for health and Consumer Protection, European Chemicals Bureau, European Commission (EC).
- ECOFRAM (1999). Ecological Committee on FIFRA Risk 3 Assessment Methods (ECOFRAM). ECOFRAM Aquatic Report.
- EMA (2006). European Chemical Agency. Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medicinal products for human use.
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M., Grimme, L.H. (2003). Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquatic Toxicology*. 63, 43-63.
- Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*. 76, 122-159.
- Gagné, F., Blaise, C., André, C. (2006). Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 64, 329-336.
- Gianessi, L., Reigner, N. (2006). Pesticide use in U.S. crop production: 2002—With comparison to 1992 & 1997 (Washington, DC: CropLife Foundation).
- Giesy, J.P., Kannan, K. (2002). Perfluorochemical surfactants in the environment. *Environmental Science and Technology*. 36, 146A-52A.
- Giesy, J.P., Naile, J.E., Khim, J.S., Jones, P.D., Newsted, J.N. (2010). Aquatic toxicology of

- perfluorinated chemicals. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 202, 1-52.
- Gómez, M.J., Martínez-Bueno, M.J., Lacorte, S., Fernández-Alba, A.R., Agüera, A. (2007). Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere*. 66, 993-1002.
- Graymore, M., Stagnitti, F., Allison, G. (2001). Impacts of atrazine on aquatic ecosystems. *Environmental International*. 26, 483-495.
- Grung, M., Källqvist, T., Sakshaug, S., Skurtveit, S., Thomas, K.V. (2008). Environmental assessment of Norwegian priority pharmaceuticals based on the EMEA guideline. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 71, 328-40.
- Halden, R.U., Paull, D.H. (2005). Co-occurrence of triclocarban and triclosan in U.S. water resources. *Environmental Science and Technology*. 39, 1420-1426.
- Hansch, C., Leo, A., Hoekman, D. (1995). Exploring QSAR, Volume 2: Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. Ed. ACS Professional Reference Book, Publisher: American Chemical Society. EEUU. pp. 48.
- Hayes, T.B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A., Vonk, A. (2002a). Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99, 5476-5480.
- Hayes, T.B., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C., Vonk, A. (2002b). Atrazine induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): Laboratory and field evidence. *Environmental Health Perspectives*. 111, 568-575.
- Hayes, T.B., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C., Vonk, A. (2002c). Herbicides: Feminization of male frogs in the wild. *Nature*. 419, 895-896.
- Hekster, F.M., de Voogt, P. (2002). Perfluoroalkylated Substances: Aquatic Environmental Assessment. Report RIKZ/2002.043. Prepared at the University of Amsterdam and RIKZ (The State Institute for Coast and Sea).
- Hekster, F.M., Laane, R.W., Voogt, P. (2003). Environmental and toxicity effects of perfluoroalkylated substances. *Reviews of Environment Contamination and Toxicology*. 179, 99-121.
- Hela, D.G., Lambropoulou, D.A., Kanstantinou, I.K., Albanis, T.A. (2005). Environmental monitoring and ecological risk assessment for pesticide contamination and effects in Lake Pamvotis, northwestern Greece. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24, 1548-1556.
- Hernando, M.D., Mezcuca, M., Fernández-Alba, A.R., Barceló, D. (2006). Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta*. 69, 334-42.
- Higgins, C.P., Luthy, R.G. (2006). Sorption of perfluorinated surfactants on sediment. *Environmental Science and Technology*. 40, 7251-7256.
- Hoffman, D.G., Rattner, B.A., Burton, G.A., Cairns, J. (2003). *Handbook of Ecotoxicology*. 2<sup>a</sup> ed. Ed. Hoffman, D.G., Lewis Publishers. EEUU. pp. 1290.

- Houde, M., Martin, J.W., Letcher, R.J., Solomon, K.R., Muir, D.C.G. (2006). Biological monitoring of polyfluoroalkyl substances: A review. *Environmental Science and Technology*. 40, 3463-3473.
- Hua, W.Y., Bennett, E.R., Maio, X.S., Metcalfe, C.D., Letcher, R.J. (2006). Seasonality effects on pharmaceuticals and s-triazine herbicides in wastewater effluent and surface water from the Canadian side of the upper Detroit River. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 25, 2356-2365.
- Hutt, A.J., Caldwell, J. (1983). The metabolic chiral inversion of 2-arylpropionic acids - a novel route with pharmacological consequences *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 35, 693-704.
- Iwai, C.B., Noller, B. (2010). Ecotoxicological assessment of diffuse pollution using biomonitoring tool for sustainable land use in Thailand. *Journal of Environmental Sciences*. 22, 858-863.
- Jones, T.W., Kemp, W.M., Stephenson, J.C., Means, J.C. (1982). Degradation of atrazine in estuarine water sediment systems and soils. *Journal of the Environmental Quality*. 11, 632-638.
- Kim, S.D., Cho, J., Kim, I.S., Vanderford, B.J., Snyder, S.A. (2007). Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water Research*. 41, 1013-1021.
- Kinney, C.A., Furlong, E.T., Werner, S.L., Cahill, I.D. (2006). Presence and distribution of wastewater-derived pharmaceuticals in soil irrigated with reclaimed water. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 25, 317-326.
- Kissa, E. (2001). *Fluorinated Surfactants and Repellents*, 2<sup>nd</sup> ed. Ed. Kissa, E. EEUU. pp. 615.
- Konwick, B.J., Tomy, G.T., Ismail, N., Peterson, J.T., Fauver, R.J., Higginbotham, D., Fisk, A.T. (2008). Concentrations and patterns of perfluoroalkyl acids in Georgia, USA surface waters near and distant to a major use source. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 27, 2011-2018.
- Kooijman, S.A.L.M. (1987). A safety factor for LC(50) values allowing for differences in sensitivity among species. *Water Research*. 21, 269-276.
- Kortenkamp, A. (2008). Low dose mixture effects of endocrine disruptors: implications for risk assessment and epidemiology. *International Journal of Andrology*. 31, 233-237.
- Kortenkamp, A., Backhaus, T., Faust, M. (2009). *State of the Art Report on Mixture Toxicity*. Final report.
- Kumari, N., Narayan, O.P., Rai, L.C. (2009). Understanding butachlor toxicity in *Aulosira fertilissima* using physiological, biochemical and proteomic approaches. *Chemosphere*. 77, 1501-1507.
- Lange, F.T., Schmidt, C., Brauch, H.J. (2006). Perfluoroalkylcarboxylates and - sulfonates: emerging contaminants for drinking water supplies? Rhine Water Works, Association of River Waterworks, The Netherlands.
- Lau, C., Anitole, K., Hodes, C., Lai, D., Pfahles-Hutchens, A., Seed, J. (2007). Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings. *Toxicological Sciences*. 99, 366-394.

- Lehmeler, H.J. (2005). Synthesis of environmentally relevant fluorinated surfactants - a review. *Chemosphere*. 58, 1471-1496.
- Levengood, J.M., Beasley, V.R. (2007). *Veterinary Toxicology*. Chapter 57. Principles of ecotoxicology. Ramesh C. Gupta. Elsevier. EEUU. pp. 689-708.
- Levy, C.W., Roujeinikova, A., Sedelnikova, S., Baker, P.J., Stuitje, A.R., Slabas, A.R., Rice, D.W., Rafferty, J.B. (1999). Molecular basis of triclosan activity. *Nature*. 398, 383-384.
- Lindstrom, A., Stryner, M., Delinsky, A., Nakayama, S., McMillan, L., Libelo, E.L., Neill, M., Thomas, L. (2011). Application of WWTP biosolids and resulting perfluorinated compound contamination of surface and well water in Decatur, Alabama, USA. *Environmental Science and Technology*. 45, 8015-8021.
- Loewe, S., Muischnek, H. (1926). Über Kombinationswirkungen. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*. 114, 313-326.
- Loganathan, B.G., Sajwan, K.S., Sinclair, E., Kumar, K.S., Kannan, K. (2007). Perfluoroalkyl sulfonates and perfluorocarboxylates in two wastewater treatment facilities in Kentucky and Georgia. *Water Research*. 41, 4611-4620.
- Mackay, D., Barnthouse, L. (2010). Integrated risk assessment of household chemicals and consumer products: addressing concern about triclosan. *Integrated Environmental Assessment and Management*. 6, 390-392.
- Martínez-Bueno, M.J., Gómez, M.J., Herrera, S., Hernando, M.D., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R. (2012). Occurrence and persistence of organic emerging contaminants and priority pollutants in five sewage treatment plants of Spain: Two years pilot Survey monitoring. *Environmental Pollution*. 164, 267-273.
- McAvoy, G.K. (1990). *AHFS Drug Information 90*. Bethesda, MD: American Society of Hospital Pharmacists, Inc, (Plus Supplements 1990). Ed. McAvoy, G.K. EEUU. pp. 1020.
- McAvoy, D.C., Schatowitz, B., Jacob, M., Hauk, A., Eckhoff, W.S. (2002). Measurement of triclosan in wastewater treatment systems. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21, 1323-1329.
- McBean, C. (2008-2010). *e-Pesticide Manual*. 15° ed. ver. 5.1, British Crop Protection Council. Atrazine (1912-24-9), Ed. McBean. Reino Unido.
- Mhadhbi, L., Rial, D., Perez, S., Beiras, R. (2012). Ecological risk assessment of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) in marine environment using *Isochrysis galbana*, *Paracentrotus lividus*, *Siriella armata* and *Psetta maxima*. *Journal of Environmental Monitoring*. 14, 1375-1382.
- Moser, V.C., Casey, M., Hamm, A., Cater, W.H. Jr., Simmons, J.E., Gennings, C. (2005). Neurotoxicological and statistical analyses of a mixture of five organophosphorus pesticides using a ray design. *Toxicological Sciences*. 86, 101-115.
- Moser, V.C., Simmons, J.E., Gennings, C. (2006). Neurotoxicological interactions of a fivepesticide mixture in preweanling rats. *Toxicological Sciences*. 92, 235-245.
- Murakami, M., Shinohara, H., Takada, H. (2009). Evaluation of wastewater and street runoff as sources of perfluorinated surfactants (PFSS). *Chemosphere*. 74, 487-493.
- Nakada, N., Tanishima, T., Shinohara, H., Kiri, K., Takada, H. (2006). Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during



- activated sludge treatment. *Water Research*. 40, 3297-3303.
- Nakayama, S., Strynar, M.J., Helfant, L., Egeghy, P., Ye, X.B., Lindstrom, A.B. (2007). Perfluorinated compounds in the Cape Fear Drainage Basin in North Carolina. *Environmental Science and Technology*. 41, 5271-5276.
- NITE (2012). Chemical Risk Information Platform (CHRIP). Biodegradation and Bioconcentration. Tokyo, Japan.
- Palma, G., Sanchez, A., Olave, Y., Encina, F., Palma, R., Barra, R. (2004). Pesticide levels in surface waters in agricultural-forestry basin in Sputhern Chile. *Chemosphere*. 57, 763-770.
- Peck, A.M. (2006). Analytical methods for the determination of persistent ingredients of personal care products in environmental matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 386, 907-939.
- Petrović, M., Gonzalez, S., Barceló, D. (2003). Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. 22, 685-696.
- Plackett, R.L., Hewlett, P.S. (1948) Statistical aspects of the independent joint action of poisons, particularly insecticides; the toxicity of a mixture of poisons. *Annals of Applied Biology*. 35, 347-58.
- Plackett, R.L., Hewlett, P.S. (1952). Quantal responses to mixtures of poisons. *Journal of the Royal Statistical Society Series B*. 14, 141-154.
- Planas, C., Puig, A., Rivera, J., Caixach, J. (2006). Analysis of pesticides and metabolites in Spanish surface waters by isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry with previous automated solid-phase extraction: Estimation of the uncertainty of the analytical results. *Journal of Chromatography A*. 1131, 242-252.
- Poiger, T., Buser, H., Müller, M.D., Balmer, M.E., Buerge, I.J. (2003). Occurrence and fate of organic micropollutants in the environment: Regional mass balance and source apportioning in surface waters base don laboratory incubation Studies in soil and water, monitoring, and computer modeling. *Chimia*. 57, 492-498.
- Prevedouros, K, Cousins, I.T., Buck, R.C., Korzeniowski, S.H. (2006). Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates. *Environmental Science and Technology*. 40, 32-44.
- Puijker, L.M. (2004). Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Water Cycle. An international review. Ed. GWRC. Reino Unido. pp. 70.
- Regulation (EC) No 1907/2006. (2007). EU Commission & EU. Proposal for a regulation of the European parliament and the council on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, and amending Directive 67/548/EEC and (COM (2007) 355 final).
- Repetto, M., Repetto, G. (2010). *Toxicología Fundamental*. 4ª ed. Ed. Díaz de Santos. España. pp. 620.
- RD 995/2000 de 2 de junio de 2000. BOE 147, 20 de junio de 2000, pp. 21558.
- Roberts, T. (1998). *Metabolic Pathways of Agrochemicals, Part one: Herbicides and Plant Growth Regulators*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Sanderson, H., Johnson, D.J., Wilson, C.J., Brain, R.A., Solomon, K.R. (2003). Probabilistic hazard assessment of environmentally occurring pharmaceuticals toxicity to fish, daphnids and algae by ECOSAR screening. *Toxicology Letters*. 144, 383-395.

- Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E. (2007). Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater treatment plants. A case study: Seville city (Spain). *Environment International*. 33, 596-601.
- SCHER, SCCS, & SCENIHR (2012). Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures. Directorate-General for Health and Consumers. Unión Europea. pp. 50.
- Schnell, S., Bols, N.C., Barata, C., Porte, C. (2009). Single and combined toxicity of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) on the rainbow trout liver cell line RTL-W1. *Aquatic Toxicology*. 93, 244-252.
- Schultz, M.M., Barofsky, D.F., Field, J.A. (2006). Quantitative determination of fluorinated alkyl substances by large-volume-injection liquid chromatography tandem mass spectrometry-characterization of municipal wastewaters. *Environmental Science and Technology*. 40, 289-295.
- Singer, P.C. (1999). American Water Works Association: Impacts of ozonation on the formation of chlorination and chloramination by-products. Ed. Singer, P.C. EEUU. pp. 311.
- Singer, H., Muller, S., Tixier, C., Pillonel, L. (2002). Triclosan: occurrence and fate of a widely used biocide in the aquatic environment: field measurements in wastewater treatment plants, surface waters, and lake sediments. *Environmental Science and Technology*. 36, 4998-5004.
- Solomon, K.R., Giesy, J.P., Jones, P.D. (2000). Probabilistic risk assessment of agrochemicals in the environment. *Crop Protection*. 19, 649-655.
- Solomon, K.R., Sibley, P. (2002). New concepts in ecological risk assessment: where do we go from here?. *Marine Pollution Bulletin*. 44, 279-285.
- SRC PhysProp Database (2003). Interactive PhysProp Database Demo.
- Stackelberg, P.E., Gibs, J., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D., Lippincott, R.L. (2007). Efficiency of conventional drinking-water-treatment processes in removal of pharmaceuticals and other organic compounds. *Science of the Total Environment*. 377, 255-272.
- Steen, R.J.C.A., Leonards, P.E.G., Brinkman, U.A.T., Barceló, D., Tronczynski, J., Albinis, T.A., Cofino, W.P. (1999). Ecological risk assessment of agrochemicals in European estuaries. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 18, 1574-1581.
- Sullivan, K.B., Spence, K.M. (2003). Effects of sublethal concentrations of atrazine and nitrate on metamorphosis of the African clawed frog. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22, 627-635.
- Tatarazako, N., Ishibashi, H., Teshima, K., Kishi, K., Arizono, K. (2004). Effects of triclosan on various aquatic organisms. *Environmental Sciences: an International Journal of Environmental Physiology and Toxicology*. 11, 133-140.
- Tauxe-Wuersch, A., De Alencastro, L.F., Grandjean, D., Tarradellas, J. (2005). Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment. *Water Research*. 39, 1761-1772.
- Tavera-Mendoza, L., Ruby, S., Brousseau, P., Fournier, M., Cyr, D., Marcogliese, D. (2002). Response of the amphibian tadpole *Xenopus laevis* to atrazine during sexual differentiation of the ovary. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21, 1264-1267.
- Tixier, C., Singer, H.P., Oellers, S., Müller, S.R., (2003). Occurrence and fate of carbamazepine,

- clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. *Environmental Science and Technology*. 37, 1061-1068.
- USDA (2006). Agricultural Chemical Use Database. National Agricultural Statistics Service (NASS).
- USEPA (1998). Guidelines for Ecological Risk Assessment. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/630/R-95/002F.
- USEPA (2001). Pesticides Industry Sales and Usage-2000 and 2001 Market Estimates Report, Washington, DC.
- USEPA (2006). Decision documents for Atrazine. U.S. Environmental Protection Agency Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances.
- USEPA (2009a). Estimation Program Interface (EPI) Suite. Ver. 4.0. Jan.
- USEPA (2009b). Risk-Based Prioritization Document: Initial Risk-Based Prioritization of High Production Volume (HPV) Chemicals: Triclocarban, United States Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Van der Brink, P.J., Ter Braak, C.J.F. (1998). Multivariate analysis of stress in experimental ecosystems by Principal Response Curves and similarity analysis. *Aquatic Ecology*. 32, 161-178.
- Van den Brink, P.J., Ter Braak, C.J.F. (1999). Principal response curves: analysis of time-dependent multivariate responses of biological community to stress. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 18, 138-148.
- Verro, R., Finizio, A., Otto, S., Vighi, M. (2009a). Predicting pesticide environmental risk in intensive agricultural areas. II: Screening level risk assessment of complex mixtures in surface waters. *Environmental Science and Technology*. 43, 530-537.
- Verro, R., Finizio, A., Otto, S., Vighi, M. (2009b). Predicting pesticide environmental risk in intensive agricultural areas. I: Screening level risk assessment of individual chemicals in surface waters. *Environmental Science and Technology*. 43, 522-529.
- Vieno, N.M., Tuhkanen, T., Kronberg, L. (2005). Seasonal variation in the occurrence of pharmaceuticals in effluents from a sewage treatment plant and in the recipient water. *Environmental Science and Technology*. 39, 8220-8226.
- Von der Ohe, P.C., Dulio, V., Slobodnik, J., De Deckere, E., Kühne, R., Ebert, R.U., Ginebreda, A., De Cooman, W., Schüürmann, G., Brack, W. (2011). A new risk assessment approach for the prioritization of 500 classical and emerging organic microcontaminants as potential river basin specific pollutants under the European Water Framework Directive. *Science of the Total Environment*. 409, 2064-2077.
- Walter, H., Consolaro, F., Gramatica, P., Scholze, M., Altenburger, R. (2002). Mixture toxicity of priority pollutants at no observed effect concentrations (NOECs). *Ecotoxicology*. 11, 299-310.
- Wang, X., Bai, S.Y., Lu, X.G., Li, Q.F., Zhang, X.L., Yu, L. (2008). Ecological risk assessment of eutrophication in Songhua Lake, China. *Stochastic Environmental Research and Risk Assessment*. 22, 477-486.
- Wang, B., Yu, G., Huang, J., Yu, H., Wang, L. (2009). Tiered aquatic ecological risk assessment of organochlorine pesticides and their mixture in Jiangsu reach of Huaihe River, China. *Environmental Monitoring and Assessment*. 157, 29-42.

- WHO (1990). Atrazine: Health and Safety Guide, No. 47.1, Atrazine2Standards 1. Series. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
- Yang, L.H., Ying, G.G., Su, H.C., Stauber, J.L., Adams, M.S., Binet, M.T. (2008). Growth inhibiting effects of 12 antimicrobial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 27, 1201-1208.
- Ye, Z., Weinberg, H.S., Meyer, M.T. (2007). Trace analysis of trimethoprim and sulfonamide, macrolide, quinolone, and tetracycline antibiotics in chlorinated drinking water using liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 79, 1135-1144.
- Yeung, L.W.Y., So, M.K., Jiang, G., Taniyasu, S., Yamashita, N., Song, M., Wu, Y., Li, J., Giesy, J.P., Guruge, K.S., Lam, P.K.S. (2006). Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in human blood samples from China. *Environmental Science and Technology*. 40, 715-720.
- Ying, G.G., Kookana, R.S. (2007). Triclosan in wastewaters and biosolids from Australian wastewater treatment plants. *Environment International*. 33, 199-205.
- Ying, G.G., Yu, X.Y., Kookana, R.S. (2007). Biological degradation of triclocarban and triclosan in a soil under aerobic and anaerobic conditions and comparison with environmental fate modeling. *Environmental Pollution*. 150, 300-305.
- Zimmerman, J.B., Mihelcic, J.R., Smith, J. (2008). Global stressors on water quality and quantity. *Environmental Science and Technology*. 42, 4247-4254.

## **Capítulo 2**

Movilidad del ibuprofeno en el suelo



## CAPÍTULO 2

### Movilidad del ibuprofeno en el suelo

#### 2.1 Introducción y objetivos

El ibuprofeno ha sido encontrado en aguas superficiales (Rodríguez-Gil *et al.*, 2010; Calderón-Preciado *et al.*, 2011), efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (Rosal *et al.*, 2010; Gracia-Lor *et al.*, 2012; Martínez-Bueno *et al.*, 2012; Verlicchi *et al.*, 2012) agua subterránea (Gottschall *et al.*, 2012; Teijón *et al.*, 2010 a y b; Estévez *et al.*, 2012; Lapworth *et al.*, 2012) y suelos y sedimentos (Karnjanapiboonwong *et al.*, 2011; Vázquez-Roig *et al.*, 2011). Consecuentemente, la presencia de este contaminante en el medio ambiente ha sido ampliamente estudiada, incluyendo el análisis para su detección en la cadena alimenticia, donde ha sido detectado por varios autores (Calderón-Preciado *et al.*, 2012; Gentili *et al.*, 2012). Con el fin de determinar los efectos que este fármaco puede tener en el medio ambiente, es necesario analizar su comportamiento en el mismo. La persistencia que presenta bajo condiciones aeróbicas hace que se pueda comportar de un modo conservativo una vez que alcanza la zona no saturada. Existen estudios donde, a pesar de incorporar al suelo el ibuprofeno mediante riego, éste no se ha detectado en muestras de agua de la zona saturada (piezómetro) (de Bustamante *et al.*, 2012), lo que pone de manifiesto la importancia de los procesos que tienen lugar en el suelo. Puede estar sujeto a la degradación microbiana en los suelos superficiales (Winker *et al.*, 2010), aunque tanto la baja adsorción que tiene lugar, como los pequeños tiempos de residencia, sugieren que puede moverse rápidamente en el perfil del suelo (Lin y Gan, 2011). Por tanto, la contaminación de las aguas subterráneas puede tener lugar, dependiendo de las propiedades del suelo tales como la materia orgánica, el contenido en arcilla y el pH (Xu *et al.*, 2009; Behera *et al.*, 2012).

El transporte del ibuprofeno en los suelos es principalmente controlado por el equilibrio de adsorción-desorción, que a su vez dependerá de una serie de parámetros característicos del suelo, generalmente calculados a partir de las isotermas de adsorción, que estimarán la capacidad de adsorción del suelo y

los coeficientes de retardo, los cuales pueden ser utilizados en la modelación del transporte de este compuesto en el medio edáfico.

En la adsorción intervienen fuerzas de diferente naturaleza, física y química, por lo que nos encontramos con una distinción en el fenómeno: fisicisorción y quimisorción. En la práctica se hace casi imposible diferenciarlas entre sí, presentándose casos intermedios. Las superficies donde tiene lugar esta adsorción pueden ser externas o internas, siendo la externa el límite físico de las partículas del suelo. La quimisorción es debida a la formación de un enlace químico entre el contaminante y las partículas del suelo. Se trata, por tanto, de una verdadera reacción química. El enlace químico es de corto alcance y sólo lo formarán las moléculas en contacto directo con la superficie de las partículas del suelo situadas a distancia de enlace. Se formará una monocapa quimisorbida. Además, las interacciones son fuertes, dando más protagonismo a la heterogeneidad del suelo que en la fisicisorción. Pero, como la fisicisorción se presenta junto con la quimisorción, es muy común que sobre la monocapa quimisorbida se formen capas sucesivas fisicisorbidas, o incluso en la superficie de las partículas del suelo antes de encontrarse saturada por la monocapa. Existen varios modelos de isothermas de adsorción, siendo los principales la isoterma de Langmuir, la isoterma de Freundlich y la isoterma Lineal. El modelo de Langmuir supone que las moléculas se adsorben sobre la superficie hasta formar una monocapa completa (saturación), cesando la adsorción, y que esta superficie es homogénea; el modelo de Freundlich describe el fenómeno teniendo en cuenta las heterogeneidades de las superficies de adsorción. Y la isoterma Lineal supone que la adsorción es igual independientemente de las concentraciones del contaminante en la solución del suelo.

La precisión del modelo matemático que describa la adsorción, y por tanto, la precisión de los parámetros así determinados, dependerán de si el modelo conceptual seleccionado se ajusta al fenómeno que tiene lugar (Bolster y Hornberger, 2007). La adsorción supone, entonces, un importante mecanismo para la eliminación del ibuprofeno tanto en suelos como en fangos de depuradora y sedimentos (Nakada *et al.*, 2010; Karnjanapiboonwong *et al.*, 2011). Muchos estudios se han desarrollado con el objetivo de analizar este



comportamiento y determinar la capacidad de retención de este medicamento por parte del suelo, su movilidad y el transporte en diferentes matrices ambientales, habiéndose demostrado en trabajos previos que la adsorción del ibuprofeno sobre la superficie de las partículas del suelo es, como ya se ha dicho, bastante baja y generalmente menor que para otros contaminantes emergentes (Dobor *et al.*, 2012). Además de esta capacidad de retención por parte del suelo, hay que tener en cuenta el hecho de que la vida media del compuesto en el suelo puede ser elevada, encontrando valores en la bibliografía que van desde 10 días bajo condiciones aeróbicas hasta 50 días bajo condiciones anaeróbicas para suelos arenosos y francos (Lin y Gan, 2011). Por tanto, el ibuprofeno añadido al suelo mediante, por ejemplo, el riego con agua depurada o regenerada no es completamente eliminado y puede encontrarse biodisponible para los organismos del medio. Si además, como se ha dicho anteriormente, atendemos a que se ha encontrado frecuentemente ibuprofeno en distintos compartimentos del medio ambiente, es posible esperar riesgos para los ecosistemas a causa de este contaminante.

El objetivo de este trabajo fue, en primer lugar, comparar los tres modelos de adsorción principales aplicados a la adsorción de ibuprofeno en suelo para seleccionar el que mejor describa este proceso y, mediante los parámetros de adsorción y desorción que de éste se obtengan, estimar la movilidad del contaminante en el perfil del suelo, ya que esto supone obtener una herramienta más a la hora de evaluar el riesgo que la acumulación de este compuesto tóxico, así como su dispersión, suponen para el medio ambiente.

## 2.2 Materiales y métodos

Los experimentos de adsorción y desorción se han llevado a cabo en cuatro muestras de suelo (A, B, C y D) recogidas en una parcela experimental en la Planta Experimental de Carrión de los Céspedes, Sevilla (figura 2.1). La zona correspondiente se sitúa en una ladera suave y alomada posicionada entre el arroyo de Alcarrayón al SO y las cotas de La Pachón (147 m) y Olivar alto (134 m) situadas en Castilleja del Campo, al NE de Carrión de los Céspedes (Sevilla). Se trata de muestras superficiales, tomadas de 0 a 30 cm de profundidad. Todas fueron secadas al aire y tamizadas a través de un tamiz de 2 mm de luz de malla. Las principales propiedades fisico-químicas de los cuatro suelos se presentan en la tabla 2.1. La distribución del tamaño de partículas y la textura se determinaron mediante el método de Bouyoucos. El pH se midió en una suspensión suelo-agua 1:2,5 y la conductividad eléctrica en una suspensión suelo-agua 1:5. El porcentaje de carbonato cálcico equivalente,  $\text{CaCO}_3$ , fue medido usando un calcímetro de Bernard y el contenido en materia orgánica fue determinado con el método del dicromato de potasio.

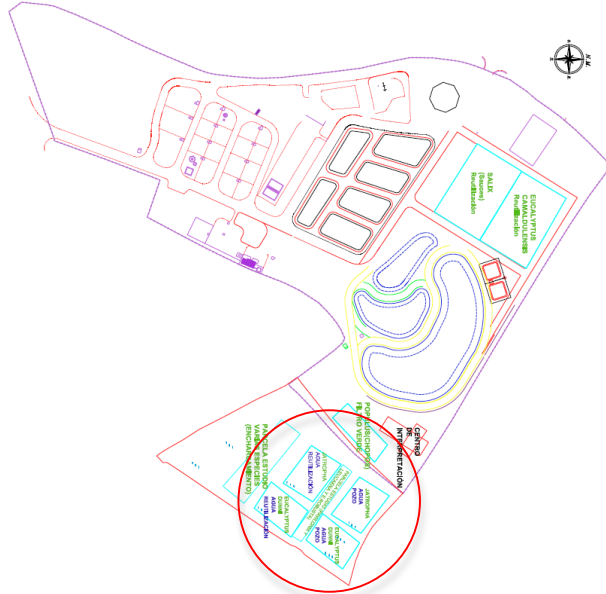


Figura 2.1. Parcela de la PECC para la realización de ensayos sobre reutilización en riego agrícola (zona de muestreo).

Los suelos A y B resultaron ligeramente alcalinos y los suelos C y D moderadamente alcalinos. El carbonato de calcio equivalente y la salinidad son bastante bajos para las cuatro muestras, mientras que el contenido de materia orgánica fue medio. Atendiendo al análisis granulométrico, se ha determinado que el suelo A es arcilloso, mientras que los suelos B, C y D son francos.

Tabla 2.1. Características de los cuatro suelos utilizados en los experimentos de adsorción y desorción.

	<i>Suelo A</i>	<i>Suelo B</i>	<i>Suelo C</i>	<i>Suelo D</i>
<i>pH</i>	7,63	7,85	7,95	8,01
<i>Conductividad eléctrica-1:5 (dS/m)</i>	0,20	0,20	0,24	0,14
<i>CaCO<sub>3</sub> (%)</i>	0,21	0,13	0,18	0,15
<i>Materia Orgánica (%)</i>	1,76	3,51	2,86	2,67
<i>Arena (%)</i>	42,50	47,50	45,00	37,50
<i>Limo (%)</i>	30,00	32,50	40,00	50,00
<i>Arcilla (%)</i>	27,50	20,00	15,00	12,50
<i>Textura</i>	Franco arcilloso	Franco	Franco	Franco

### Determinación de las isotermas de adsorción-desorción

Para determinar las isotermas de adsorción-desorción se preparó una solución de 1.000 mg/L de ibuprofeno, disolviendo 100 mg del compuesto en 1 mL de metanol en un matraz aforado de 100 mL y enrasando con agua miliQ. La cantidad total de metanol resultó menor al 0,1% (v/v), por lo que se evitaron los efectos co-solvente. Posteriormente se pasaron 5 gramos de suelo a botellas de vidrio ámbar, empleando vidrio para evitar la adhesión del ibuprofeno al plástico. Cada botella fue equilibrada con 25 mL de solución de ibuprofeno conteniendo 0, 0,5, 1, 2, 5 y 10 mg/L de ibuprofeno (concentración inicial para cada punto de la isoterma de adsorción), trabajando siempre por triplicado. El ibuprofeno se disolvió en una solución equimolar de CaCl<sub>2</sub> y NaCl 20 mM. Se incluyeron tres blancos (solución de ibuprofeno sin suelo) para verificar que el compuesto no era adsorbido por el vidrio. Los ensayos se llevaron a cabo a 25 °C, agitando durante 24 h en un agitador orbital. El contenido de cada una de las botellas fue centrifugado a 2.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se filtró a través de filtros de 0,45 µm de tamaño de poro y decantados en botellas de vidrio de 60 mL. El ensayo de desorción se desarrolló reemplazando el sobrenadante con solución de CaCl<sub>2</sub> y NaCl sin ibuprofeno después de dejar secar el suelo. Las botellas fueron nuevamente agitadas durante 24 h en un agitador orbital y el contenido centrifugado a 2.000 rpm durante 10 minutos. El nuevo sobrenadante fue a su

vez filtrado en un filtro de 0,45 µm de tamaño de poro y decantado en botellas de 60 mL.

Las concentraciones de ibuprofeno de todos los sobrenadantes, tanto del ensayo de adsorción como del de desorción, fueron medidas en un HPLC-UV (1200-Series, Agilent technologies) equipado con una columna C-18 de la marca Phenomenox (15 cm x 4,60 mm, 5 µm). El ibuprofeno fue eluido a un flujo de 2 mL/min en condiciones isocráticas con una mezcla de acetonitrilo y agua en una relación 37:63 con el pH ajustado a 2,5 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Las concentraciones se detectaron a 210 nm de absorbancia en un detector UV a un tiempo de retención de 27 min.

### Análisis de datos

Los datos experimentales de las isothermas de adsorción se ajustaron a los tres modelos principales que describen el fenómeno de la adsorción: Langmuir (2.1), Freundlich (2.2) y la Isotherma Lineal (2.3). Por un lado, se realizó la regresión no lineal para los modelos de Langmuir y Freundlich mediante el uso de la hoja de cálculo Solver Add-In function (Bolster y Hornberger, 2007), obteniendo así los parámetros de adsorción y desorción. La Isotherma Lineal se obtuvo mediante la regresión lineal con el software Excel. Por otro lado se calculó la eficiencia del modelo,  $E$  (2.4) (Nash y Sutcliffe, 1970):

$$c_{ads} = \frac{K_L c_{adsm\acute{a}x} c_{eq}}{1 + K_L c_{eq}} \quad (2.1) \quad c_{ads} = K_F c_{eq}^n \quad (2.2) \quad c_{ads} = K_d c_{eq} \quad (2.3)$$

donde la  $c_{ads}$  es la concentración adsorbida (mg/kg),  $c_{adsm\acute{a}x}$  es la capacidad máxima de adsorción (mg/kg),  $K_L$  (L/mg) y  $K_F$  [(mg/kg)/(mg/L)<sup>n</sup>] son los coeficientes de adsorción y desorción de Langmuir y Freundlich respectivamente,  $c_{eq}$  es la concentración en equilibrio (mg/L),  $n$  es la constante de linealidad (adimensional) y  $K_d$  el coeficiente de distribución sólido-agua.

$$E = 1 - \frac{\sum_{i=1}^N w_i (c_{ads_i} - c_{ads-mod-i})^2}{\sum_{i=1}^N (w_i c_{ads_i} - c_{ads-media-i})^2} \quad (2.4)$$

donde  $N$  es el número de observaciones,  $w_i$  el peso de la variable,  $c_{ads_i}$  es el  $i$ -ésimo valor medido de la variable dependiente,  $c_{ads-mod-i}$  es el  $i$ -ésimo valor de la variable dependiente predicha por el modelo y  $c_{ads-media-i}$  es la media pesada de los valores medidos. La inclusión del peso,  $w_i$ , empleando en este estudio la definición  $w=1/(c_{ads})^2$ , supone el asumir que la incertidumbre del dato será proporcional a dato en sí mismo.

La histéresis aparente del proceso de adsorción-desorción fue cuantificada para cada una de las isothermas usando el índice de histéresis  $H$  (2.5), definido por Huang *et al.* (1998):

$$H = \frac{(c_{des})_{media}}{(c_{ads})_{media}} \quad (2.5)$$

donde  $(c_{des})_{media}$  y  $(c_{ads})_{media}$  son la media de los valores de la concentración desorbida y adsorbida respectivamente para cada punto de la isoterma.

El coeficiente de distribución de carbono orgánico,  $K_{CO}$  (2.6), fue calculado a partir de la  $K_d$  y la fracción de carbono orgánico para cada suelo ( $f_{CO}$ ), como se muestra en la siguiente ecuación, expresada en L/kg (Schwarzenbach *et al.*, 2003):

$$K_{CO} = \frac{K_d}{f_{CO}} \quad (2.6)$$

### 2.3 Resultados y discusión

Los ensayos control que se realizaron mostraron que la degradación del ibuprofeno no tuvo lugar y tampoco fue adsorbido por el vidrio durante el experimento, por lo que se puede concluir que las concentraciones de trabajo se conservaron a lo largo de todo el ensayo. En el cromatograma correspondiente a la solución de suelo con la solución de  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{NaCl}$  utilizada en los experimentos, no se encontró ningún pico para el tiempo de retención de ibuprofeno bajo las condiciones cromatográficas empleadas, por lo que no se obtendrán interferencias en la medida del compuesto.

#### Adsorción

Las isotermas de adsorción de ibuprofeno se presentan en la figura 2.2, y en la tabla 2.2 se resumen los parámetros correspondientes a esta adsorción. Se aplicaron las ecuaciones no lineales de los modelos de Langmuir y Freundlich con el Solver Add-In function así como la ecuación de Isoterma Lineal. Con el fin de comparar el ajuste de nuestros datos experimentales con los datos obtenidos mediante estas ecuaciones, se estudió la eficiencia del modelo,  $E$ , como describió Trakal *et al.* (2011), quien igualmente lo empleó para la comparación de modelos de adsorción en suelos. Estos resultados también pueden verse en la tabla 2.2. Los valores de  $E$  se encontraron entre 0,430 y 0,986 para Freundlich, desde -3,036 a 0,999 para Langmuir y desde -0,285 a 0,999 para la Isoterma Lineal. De acuerdo a estos resultados, el modelo que mejor se ajusta a la descripción de la adsorción de ibuprofeno en suelos es el de Freundlich, ya que tiene el valor de  $E$  más próximo a la unidad (eficiencia total del modelo) y para ninguno de los suelos resultó negativo. Este modelo es, efectivamente, el más utilizado para describir este fenómeno (Chen *et al.*, 1999; Chefetz *et al.*, 2008; Dordio *et al.*, 2009). Los valores menores de 1 obtenidos para el modelo de Langmuir y el modelo de Isoterma Lineal indican que se obtendría una mejor predicción tomando la media de los valores medidos que usando el modelo. Esto se debe a que la varianza residual, descrita por el numerador de la expresión, es mayor que la varianza de los datos, descrita por el denominador (Nash y Sutcliffe, 1970). Aunque el modelo de Langmuir no describa completamente el fenómeno, se observó que

el suelo con mayor capacidad de adsorción, con un valor de 76,6 mg/kg, es el B, siendo el que mayor contenido en materia orgánica presenta (3,51%), mientras que el suelo D, con el menor valor de capacidad máxima de adsorción, 5,3 mg/kg, se corresponde con el de menor contenido en arcilla, un 12,50%. El de segundo mayor valor en capacidad de adsorción es el suelo C, con el mayor contenido en arcilla, un 27,50%. Estos resultados se corresponden con lo esperado, ya que tanto la materia orgánica como el contenido en arcilla de un suelos están directamente relacionados con la adsorción de contaminantes (Xu *et al.*, 2010), aunque varios estudios han demostrado que el contenido en arcilla no juega un papel tan decisivo (Lin y Gan, 2011).

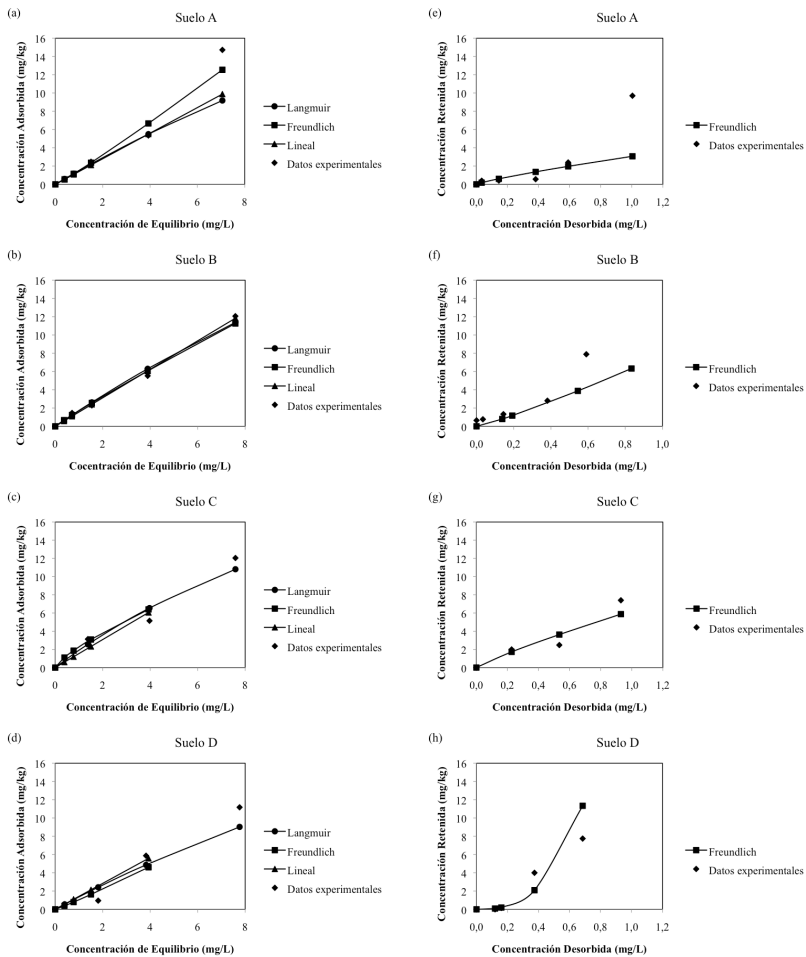


Figura 2.2. Isothermas de adsorción de ibuprofeno ajustadas al modelo de Langmuir, Freundlich e Isotherma Lineal para el suelo A (a), suelo B (b), suelo C (c) y suelo D (d), e isothermas de desorción de ibuprofeno ajustadas al modelo de Freundlich para el suelo A (e), suelo B (f), suelo C (g) y suelo D (h).

Se puede ver a partir de los parámetros obtenido mediante el modelo de Freundlich que la adsorción es baja, como indica la constante de Freundlich,  $K_{Fads}$ , con valores entre 1,05 y 2,26, similares a los presentados por Styszko *et al.* (2010) para la adsorción de ibuprofeno en sedimentos. Los resultados para  $n_{ads}$ , comprendidos entre 0,76 y 1,08, indicaron que el proceso era casi lineal, de acuerdo a los estudios de Xu *et al.* (2009) para suelos con similares propiedades físico-químicas.

Tabla 2.2. Parámetros de adsorción de ibuprofeno en los cuatro suelos empleados en el experimento.

Suelo	Adsorción								
	Langmuir			Freundlich			Lineal		
	$c_{ads\max}$	$K_L$	$E$	$n$	$K_F$	$E$	$K_d$	$E$	$K_{CO}$
A	59,2	0,026	0,999	1,08	1,52	0,840	1,40	0,999	173,21
B	76,6	0,023	0,996	0,93	1,71	0,986	1,56	0,998	217,92
C	38,2	0,052	-3,036	0,76	2,26	0,790	1,54	-0,285	238,17
D	5,3	0,264	0,982	1,07	1,05	0,430	1,42	0,950	139,75

El coeficiente de distribución sólido-agua (tabla 2.2),  $K_d$ , resultó muy similar para las cuatro muestras, con un rango de 1,40 a 1,56 L/kg. Estos valores indican que la adsorción aumenta cuando las concentraciones de equilibrio aumentan, y por tanto, existen diferencias entre las constantes de Freundlich y  $K_d$ , debido a la no linealidad de las isothermas. Esto se debe probablemente a la mayor afinidad al agua que al suelo cuando las concentraciones del soluto son bajas. Lin y Gan (2011) encontraron valores menores para esta constante de distribución, cuyos valores fueron próximos a 1 para la adsorción de ibuprofeno en dos suelos. Son valores similares a los presentados por Radjenović *et al.* (2009) para lodos primarios y secundarios, y 100 veces menores que los observados por Hörsing *et al.* (2011) en sus estudios de adsorción de ibuprofeno en lodos. Los valores de  $K_{CO}$  fueron moderados en todos los casos (tabla 2.2), desde 139,75 L/kg para el suelo D hasta 238,17 L/kg para el suelo C, similar a lo observado en bibliografía para sedimentos arenosos (Scheytt *et al.*, 2005) y mayor que anteriores resultados para suelos (Xu *et al.*, 2009). Esto indica que el ibuprofeno es moderadamente fijado al suelo.



## Desorción

Las isotermas de desorción de ibuprofeno se muestran también en la figura 2.2. Se puede observar que el último punto medido para los suelos A y B son mayores que los predichos por el modelo de Freundlich. Esto demuestra que el modelo sobreestima la desorción para estos niveles de concentración. Para este proceso (los resultados están presentados en la tabla 2.3), las constantes de Freundlich toman valores mayores, con un rango comprendido entre 3,66 y 32,56, mostrando una retención más fuerte de ibuprofeno en las partículas del suelo en la desorción que en la adsorción. Esta desorción resultó, además, no lineal, con valores de  $n_{des}$  de 0,84 para el suelo A y de 2,79 para el suelo D, sugiriendo unas distribuciones diferentes de los lugares de adsorción, como Soukup *et al.* (2004) encontraron para la adsorción en suelo de otro contaminante orgánico, el isoxaflutole. Los bajos niveles de histéresis, con valores del índice de histéresis  $H$  entre 0,42 y 0,66 indicaron que la adsorción del ibuprofeno es reversible, teniendo lugar esta histéresis durante la desorción. Por tanto, el ibuprofeno podría lixiviar a través del perfil del suelo y contaminar el agua subterránea o estar biodisponible para los diferentes organismos de este ecosistema.

Tabla 2.3. Parámetros de desorción de ibuprofeno en los cuatro suelos empleados en el experimento.

<i>Desorción</i>		
<i>Freundlich</i>		
<i>n</i>	<i>K<sub>F</sub></i>	<i>H</i>
0,84	3,66	0,52
1,15	7,80	0,43
0,87	6,26	0,42
2,79	32,56	0,66

## 2.4 Conclusiones

El proceso de adsorción-desorción de ibuprofeno en suelos ha sido estudiado en cuatro suelos agrícolas. Los resultados obtenidos han mostrado que el modelo de Freundlich es mejor que el de Langmuir y que la Isoterma Lineal para describir esta adsorción, y por tanto el fenómeno de adsorción-desorción puede ser explicado mediante su aplicación para ajustar los datos experimentales. Los coeficientes de desorción de Freundlich revelaron que el ibuprofeno es más fuertemente retenido en la desorción que en el propio proceso de adsorción. El ibuprofeno resultó ser moderadamente fijado al suelo con una adsorción casi lineal y reversible, con bajos valores del índice de histéresis. Estos resultados demuestran que el contaminante puede estar biodisponible para las plantas y microorganismos expuestos a él, y alcanzar además las aguas subterráneas mediante lixiviación en el perfil del suelo.

## 2.5 Bibliografía

- Behera, S.K., Oh, S.Y., Park, H.S. (2012). Sorptive removal of ibuprofen from water using selected soil minerals and activated carbon. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 9, 85-94.
- Bolster, C., Hornberger, G.M. (2007). On the use of linearized Langmuir equations. *Soil Science Society of America Journal*. 71, 1796-1806.
- Calderón-Preciado, D., Matamoros, V., Bayona, J.M. (2011). Occurrence and potential crop uptake of emerging contaminants and related compounds in an agricultural irrigation network. *Science of the Total Environment*. 412-413, 14-19.
- Calderón-Preciado, D., Renault, Q., Matamoros, V., Canameras, N., Bayona, J.M. (2012). Uptake of organic emergent contaminants in *Spath* and lettuce: an in vitro experiment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60, 2000-2007.
- Chefetz, B., Mualem, T., Ben-Ari, J. (2008). Sorption and mobility of pharmaceutical compounds in soil irrigated with reclaimed wastewater. *Chemosphere*. 73, 1335-1343.
- Chen, Z., Xing, B., McGill, W.B. (1999). A unified sorption variable for environmental applications of the Freundlich equation. *Journal of Environmental Quality*. 28, 1422-1428.
- De Bustmante, I., Iglesias, J.A., Ortiz, I., de Miguel, A., Martínez-Hernández, V., González-Naranjo, V., Segura, M.F., Bienes, R.A., Berreteaga, A., Carenas, B., Gil-Gil, J. (2012). Experiencias prácticas de reutilización en el marco del programa CONSOLÍDER-TRAGUA. Ed. Consolider-Tragua. Madrid. pp. 27-43.
- Dobor, J., Varga, M., Záray, G. (2012). Biofilm controlled sorption of selected acidic drugs on river sediments characterized by different organic carbon content. *Chemosphere*. 87, 105-110.
- Dordio, A.V., Estêvão-Candeias, A.J., Pinto, A.P., Teixeira da Costa, C., Palace-Carvalho, A.J. (2009). Preliminary media screening for application in the removal of clofibric acid, carbamazepine and ibuprofen by SSF-constructed wetlands. *Ecological Engineering*. 35, 290-302.
- Estévez, E., Cabrera, M.C., Molina-Díaz, A., Robles-Molina, J., Palacios-Díaz, M.P. (2012). Screening of emerging contaminants and priority substances (2008/105/EC) in reclaimed water for irrigation and groundwater in a volcanic aquifer (Gran Canaria, Canary Islands, Spain). *Science of the Total Environment*. 433, 538-546.
- Gentili, A., Caretti, F., Bellante, S., Rocca, L.M., Curini, R., Venditti, A. (2012). Development and validation of two multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry methods based on a versatile extraction procedure for isolating non-steroidal anti-inflammatory drugs from bovine milk and muscle tissue. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 404, 1375-1388.
- Gottschall, N., Topp, E., Metcalfe, C., Edwards, M., Payne, M., Kleywegt, S., Russell, P., Lapen, D.R. (2012). Pharmaceutical and personal care products in groundwater, subsurface drainage, soil, and wheat grain, following a high single application of municipal biosolids to a field. *Chemosphere*. 87, 194-203.

- Gracia-Lor, E., Sancho, J.V., Serrano, R., Hernández, F. (2012). Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia. *Chemosphere*. 87, 453-462.
- Hörsing, M., Ledin, A., Grabic, R., Fick, J., Tysklind, M., la Cour-Jansen, J., Andersen, H.R. (2011). Determination of sorption of seventy-five pharmaceuticals in sewage sludges. *Water Research*. 45, 4470-4482.
- Huang, W., Yu, H., Weber, W.J. (1998). Hysteresis in the sorption and desorption of hydrophobic organic contaminants by soils and sediments: 1. A comparative analysis of experimental protocols. *Journal of Contaminant Hydrology*. 31, 129-148.
- Karnjanapiboonwong, A., Suski, J.G., Shah, A.A., Cai, Q., Morse, A.N., Anderson, T.A. (2011). Occurrence of PPCPs at a wastewater treatment plant and in soil and groundwater at a land application site. *Water, Air, and Soil Pollution*. 216, 257-273.
- 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.
- Lin, K., Gan, J. (2011). Sorption and degradation of wastewater-associated non-steroidal anti-inflammatory drugs and antibiotics in soils. *Chemosphere*. 83, 240-246.
- Martínez-Bueno, M.J., Gómez, M.J., Herrera, S., Hernando, M.D., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R. (2012). Occurrence and persistence of organic emerging contaminants and priority pollutants in five sewage treatment plants of Spain: Two years pilot Survey monitoring. *Environmental Pollution*. 164, 267-273.
- Nakada, N., Yasojima, M., Okayasu, Y., Komori, K., Suzuki, Y. (2010). Mass balance analysis of triclosan, diethyltoluamide, crotamiton and carbamazepine in sewage treatment plants. *Water Science and Technology*. 61, 1739-1747.
- Nash, J.E., Sutcliffe, J.V. (1970). River flow forecasting through conceptual models, Part I - A discussion of principles, *Journal of Hydrology*. 10, 282-290.
- Radjenović, J., Petrović, M., Barceló, D. (2009). Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 43, 831-841.
- Rodríguez-Gil, J.L., Catalá, M., Alonso, S.G., Maroto, R.R., Valcárcel, Y., Segura, Y., Molina, R., Melero, J.A., Martínez, F. (2010). Heterogeneous photo-Fenton treatment for the reduction of pharmaceutical contamination in Madrid rivers and ecotoxicological evaluation by a miniaturized fern spores bioassay. *Chemosphere*. 80, 381-388.
- Rosal, R., Rodríguez, A., Perdígón-Melón, J.A., Petre, A., García-Calvo, E., Gómez, M.J., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R. (2010). Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Research*. 44, 578-588.
- Scheytt, T., Mersmann, P., Lindstädt, R., Heberer, T. (2005). Determination of sorption coefficients of pharmaceutically active substances carbamazepine, diclofenac, and ibuprofen, in sandy sediments. *Chemosphere*. 60, 245-253.

- Schwarzenbach, R.P., Gschwend, P.M., Imboden, D.M. (2003). *Environmental Organic Chemistry*. Wiley, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Soukup, J., Jursík, M., Hamouz, P., Holec, J., Krupka, J. (2004). Influence of soil pH, rainfall, dosage, and application timing of herbicide Merlin 750 WG (isoxaflutole) on phytotoxicity level in maize (*Zea mays* L.) Plant, Soil and Environment. 50, 88-94.
- Styszko, K., Sosnowska, K., Wojtanowicz, P., Golas, J., Gorecki, J., Macherzynski, M. (2010). Sorption of ibuprofen on sediments from the Dobeyce (Southern Poland) drinking water reservoir. *Archives of Environmental Protection*. 36, 81-91.
- Teijón, G., Candela, L., Tamoh, K., Molina-Díaz, A., Fernández-Alba, A.R. (2010a). Occurrence of emerging contaminants, priority substances (2008/105/CE) and heavy metals in treated wastewater and groundwater at Depurbaix facility (Barcelona, Spain). *Science of the Total Environment*. 408, 3584-3595.
- Teijón, G., Candela, L., Cabeza, Y., Tamoh, K. (2011b). Emerging contaminants in treated wastewater and groundwater after a three years monitoring period. The Baix Llobregat (Barcelona, Spain). *Proceedings of the 12th International Conference on Environmental Science and Technology*. Rodas, Grecia.
- Trakal, L., Komárek, M., Száková, J., Zemanivá, V., Tlustoš, P. (2011). Biochar application to metal-contaminated soil: evaluating of Cd, Cu, Pb and Zn sorption behavior using single- and multi-element sorption experiment. *Plant, Soil and Environment*. 57, 372-380.
- Vázquez-Roig, P., Andreu, V., Onghena, M., Blasco, C., Picó, Y. (2011). Assessment of the occurrence and distribution of pharmaceuticals in a Mediterranean wetland (L'Albufera, Valencia, Spain) by LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 400, 1287-1301.
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Galletti, A., Petrović, M., Barceló, D. (2012): Hospital effluent: Investigación on the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *Science of the Total Environment*. 430, 109-118.
- Winker, M., Cjemens, J., Reich, M., Gulyas, H., Otterpohl, R. (2010). Ryegrass uptake of carbamazepine and ibuprofen applied by urine fertilization. *Science of the Total Environment*. 408, 1902-1908.
- Xu, J., Wu, L., Chang, A.C. (2009). Degradation and adsorption of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in agricultural soils. *Chemosphere*. 77, 1299-1305.
- Xu, J., Wu, L.S., Chen, W.P., Chang, A.C. (2010). Leaching potential of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 29, 800-807.



## **Capítulo 3**

Ecotoxicología del ibuprofeno en agua: efectos sobre  
el crecimiento de *Pseudokirchneriella subcapitata*





## CAPÍTULO 3

### Ecotoxicología del ibuprofeno en agua: efectos sobre el crecimiento de *Pseudokirchneriella subcapitata*

#### 3.1 Introducción y objetivos

Para la evaluación de la calidad de los ecosistemas acuáticos se han estudiado tradicionalmente parámetros físico-químicos, que aunque son precisos en valor absoluto, la información que proporcionan es parcial y puntual. Pero el control toxicológico mediante bioindicadores da una visión integrada sobre la calidad del agua. Con este fin, se emplean organismos pertenecientes a distintos niveles tróficos, por un lado los productores primarios y por otro los consumidores.

#### Organismos productores primarios

Los productores primarios son organismos capaces de sintetizar materia orgánica a partir de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) como fuente de carbono, utilizando energía proveniente directamente de la luz (fotosintetizadores o fotoautótrofos) o de reacciones de óxido-reducción (quimioautótrofos). Dentro de este grupo encontramos a las algas verdes unicelulares y a las cianobacterias, recogándose en las normas OCDE Test Guide 201 (OECD, 2011) e ISO 8692 (ISO, 1989) los test toxicológicos para su uso en muestras de agua, y también a las plantas acuáticas superiores. Representan una amplia proporción de la biomasa total en medios acuáticos, estimándose la producción primaria proveniente de las plantas acuáticas escasamente inferior a la producción de las plantas terrestres (Falkowski y Raven, 1997). Además, la importancia de los organismos fotosintéticos como productores primarios dominantes en la mayoría de los ecosistemas acuáticos revela la importancia del uso de éstos en la evaluación de peligros ambientales. Existiendo, incluso, grandes diferencias en la sensibilidad de distintos organismos según sus grupos filogenéticos (Blanck *et al.*, 1984; Källqvist y Romstad, 1994; Fairchild *et al.*, 1997). Los macrófitos (plantas acuáticas visibles a simple vista) engloban distintos grupos de comunidades vegetales, entre las que se encuentran principalmente plantas vasculares acuáticas, briófitos, carófitos y

algas filamentosas. Son indicadores de cambios a medio y largo plazo. Las cianobacterias son muy sensibles a muchos compuestos, capaces de detectar de forma general cualquier tipo de elemento ambiental perjudicial que le suponga una destrucción en su actividad metabólica, traduciendo dicho detrimento en una disminución de la emisión de luz de la cianobacteria, lo que se utiliza como indicador de toxicidad ambiental. La inclusión de las algas y las cianobacterias en las baterías de test toxicológicos ha mejorado la capacidad de la predicción de las respuestas más sensibles de los ecosistemas (Sloof *et al.*, 1983).

### **Organismos consumidores**

En el grupo de los consumidores se encuentran organismos como las bacterias, invertebrados, protozoos ciliados y los peces. La bacteria marina *Vibrio Fischeri* es uno de los organismo más empleados en ensayos de toxicidad, ya que da una respuesta a multitud de sustancias y de una manera rápida (tiempos menores a 30 minutos) midiéndose la disminución de la bioluminiscencia debido a las afecciones a su metabolismo, al igual que en las cianobacterias. Este test se recoge en la norma ISO 11348-3 (ISO, 2007). De los organismos invertebrados, la *Daphnia magna* es uno de los más importante en los ecosistemas acuáticos como consumidor primario y fuente de alimento para los consumidores secundarios. Presenta además características como la facilidad de cultivo en laboratorio y la sensibilidad de respuesta a una amplia gama de tóxicos que hacen de esta especie un referente internacional en la evaluación de la toxicidad (USEPA, 2002a). Los protozoos ciliados constityen el grupo de protozoos más numeroso en la naturaleza, alimentándose de bacterias, otros protozoos, detritus celulares, etc. Se pueden utilizar en la valoración de contaminación ambiental, siendo indicadores de las características físico-químicas del ecosistema donde viven. Los peces tienen características que les diferencian de otros elementos biológicos y les hacen complementarios ineludibles. Su mayor longevidad (hasta 20 y 30 años), les permite ser testigos e indicadores de impactos históricos a las masas de agua. Por todo ello, son indicadores de cambio a largo plazo.

Las plantas acuáticas son componentes muy importantes de los ecosistemas acuáticos no sólo por ser productoras primarias, como ya se ha apuntado, sino también por ser generadoras de oxígeno, proveedoras de hábitat y alimento para otros organismos, estabilizadoras del sedimento e incluso, a veces, agentes de mejora de la calidad del agua. Por tanto, su uso en la evaluación ecotoxicológica y la protección ambiental es más que apropiado. Actualmente, los parámetros que se analizan para la evaluación del riesgo ecológico en ecotoxicología de plantas son la velocidad de crecimiento o la biomasa producida, así como otros síntomas visuales como la clorosis o la necrosis (Davy *et al.*, 2001). Dentro de las plantas acuáticas destacan las microalgas verdes, ya que son el principal componente del fitoplancton y pueden sobrevivir en ciertas condiciones ambientales que podrían ser dañinas para otros organismos (Orellana y Haigh, 2008). Han sido ampliamente utilizadas en el desarrollo de biosensores (que puedan dar una respuesta crítica a los cambios producidos en las masas de agua) y en estudios toxicológicos de aguas debido a su fácil crecimiento y exposición a las toxinas, ya que son sensibles a un amplio espectro de compuestos que aparecen en las aguas residuales y tienen tiempos de generación cortos, lo que permite una evaluación rápida y efectiva del efecto de estos contaminantes sobre su crecimiento.

Con el fin de conseguir un procedimiento rápido y económico, y que proporcione una detección real y ecológicamente relevante de toxicidad en agua, diversos grupos de investigación han desarrollado instrumentación que permite llevar a cabo los test de manera rápida, como por ejemplo, con algas inmovilizadas sobre microplacas (Bozeman *et al.*, 1989; Lukavsky, 1992; Muller *et al.*, 2008). Tanto la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos de América (USEPA) como la Organización de Cooperación para el Desarrollo Económico (OCDE), han estandarizado diversos tests para la medida de la toxicidad de contaminantes disueltos que examinan la inhibición del crecimiento de la población al cabo de tres o cuatro días en medios de cultivo, por ejemplo sobre el alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* (OECD, 1984; USEPA, 2002a).

La toxicidad de los contaminantes investigados en este trabajo (ibuprofeno, PFOA, atrazina y triclosán) ha sido estudiada por diversos autores para diversos organismos fotosintéticos acuáticos (dentro de los que se encuentra una gran variedad de algas verdes). Como bioindicadores de toxicidad en estos organismos se han empleado diferentes parámetros, tales como la velocidad de crecimiento, la eficiencia del sistema fotosintético II (PSII), el contenido en clorofila *a* o la capacidad fotosintética. Además, dan un amplio rango de valores de  $EC_{50}$  (concentración del tóxico capaz de inhibir al 50 % de la población) para *Navicula pelliculosa*, *Nitzschia palea*, *Skeletonema costatum*, *Scenedesmus subspicatus*, *Scenedesmus vacuolatus* y la más usada, *Pseudokirchneriella subcapitata* (Iwama y Greer, 1980; Orvos *et al.*, 2002; Franz *et al.*, 2008; Rosal *et al.*, 2010; Boltes *et al.*, 2012). En la tabla 3.1 se pueden observar algunos de estos valores para los cuatro compuestos.

El objetivo de este estudio fue la evaluación de la toxicología en medio acuático asociada a la aparición del ibuprofeno combinado con otros contaminantes sobre la microalga verde *Pseudokirchneriella subcapitata*. Para ello se ha analizado la toxicología de todos los compuestos actuando de manera individual y de las mezclas binarias, ternarias y cuaternaria. Se han tenido en cuenta las interacciones que tienen lugar en el rango completo de efecto, aplicando el método del Índice de Combinación (CI)-isoblograma.

Tabla 3.1. Valores de  $EC_{50}$  para el ibuprofeno, el PFOA, la atrazina y el triclosán para distintos organismos fotosintéticos.

<b>Ibuprofeno</b>			
<b>Organismo</b>	<b>Parámetro</b>	<b><math>EC_{50}</math> (mg/L)</b>	<b>Referencia</b>
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Crecimiento	360	Yamamoto <i>et al.</i> 2007
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	Crecimiento	342	Cleuvers 2004
<i>Synechocystis sp.</i> (Cianobacteria)	Crecimiento	4	Pomati <i>et al.</i> 2004
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	Crecimiento	315	Cleuvers 2003
<i>Skeletonema costatum</i> (diatomea planctónica)	---	7,1	Knoll 1995
<b>PFOA</b>			
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Velocidad de crecimiento	201,46 190,99	Xu <i>et al.</i> 2013
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Velocidad de crecimiento	96,2	Rosal <i>et al.</i> 2010
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Velocidad de crecimiento	42	USEPA 2002b
<b>Atrazina</b>			
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Velocidad de crecimiento	0,0147	He <i>et al.</i> 2012
<i>Mayamaea fossilis</i>	Velocidad de crecimiento	8,297	
<i>Nitzschia palea</i> (diatomea)	Velocidad de crecimiento	3,988	
<i>Eolimna minima</i> (diatomea)	Velocidad de crecimiento	2,510	
<i>Craticula accomoda</i> (planta)	Velocidad de crecimiento	0,919	
<i>Gomphonema parvulum</i>	Velocidad de crecimiento	0,907	
<i>Cyclotella meneghiniana</i> (diatomea)	Velocidad de crecimiento	0,812	Larras <i>et al.</i> 2012
<i>Fragilaria capucina var vaucheriae</i>	Velocidad de crecimiento	0,801	
<i>Achnantheidium minutissimum</i>	Velocidad de crecimiento	0,748	
<i>Fragilaria rumpens</i>	Velocidad de crecimiento	0,629	
<i>Fragilaria ulna</i>	Velocidad de crecimiento	0,306	
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	Crecimiento	2,59	Bialk-Bielińska <i>et al.</i> 2011
Phytoplankton (Lago Taihu)	---	0,0324	Qu <i>et al.</i> 2011
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Formación de colonias	0,56082	
	Velocidad de crecimiento (número de células)	0,34512	Fischer <i>et al.</i> 2010
	Velocidad de crecimiento (densidad óptica)	0,19413	
Comunidad de algas (Rio Ter)		0,112	
		0,0762	
	Velocidad de fotosíntesis	0,0551	Navarro <i>et al.</i> 2002
		0,0489	
		0,0362	
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Velocidad de crecimiento	0,225	Christensen <i>et al.</i> 2001
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	Crecimiento	0,0388	Faust <i>et al.</i> 2001
<i>Pavlova sp.</i>	Velocidad de crecimiento	0,147	Pennington y Scott 2001
<i>Tetrahymena pyriformis</i> (protozoo)	Crecimiento	74	
<i>Euglena gracilis</i> (protozoo)	Crecimiento	45	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Crecimiento	0,35	Girling <i>et al.</i> 2000
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	Crecimiento	0,072	
<i>Navicula pelliculosa</i>	Crecimiento	0,060	USEPA 2000

<i>Chlorella Saccharophila</i>	---	0,085	Carrasco y Sabater 1997
<i>Chlamydomonas moewssi</i>	Velocidad de crecimiento	1,384	Kotrikla <i>et al.</i> 1997
	Fluorescencia del PSII	0,17256	
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Fluorescencia del PSII	71	Caux <i>et al.</i> 1996
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Contenido en clorofila <i>a</i>	0,784	Heever y Grobbelaar 1996a
	Velocidad de crecimiento	0,340	
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Crecimiento	0,036	Heever y Grobbelaar 1996b
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	Crecimiento	0,021	Kirby y Sheahan 1994
<i>Carlina vulgaris</i>	Crecimiento	0,031	Larsen <i>et al.</i> 1986
<b>Triclosán</b>			
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Velocidad de crecimiento	0,037	Boltes <i>et al.</i> 2012
Periphyton (comunidades de microalgas marinas)	Velocidad de crecimiento	0,521172	Backhaus <i>et al.</i> 2011
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Crecimiento	0,0025	Yang <i>et al.</i> 2011
<i>Biofilm algae</i>	Quenching no-fotoquímico	0,11097	Ricart <i>et al.</i> 2010
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Crecimiento	0,0035	DeLorenzo <i>et al.</i> 2008
<i>Nitzschia palea</i>	Crecimiento en biofilm	0,430	Franz <i>et al.</i> 2008
	Crecimiento en suspensión	0,390	
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	Fotosíntesis	0,0037	
	Crecimiento	0,0019	
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Crecimiento	0,0012	Harada <i>et al.</i> 2008
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Velocidad de crecimiento	0,000521	Yang <i>et al.</i> 2008
<i>Skeletonema costatum</i>	Crecimiento	>0,066	
<i>Navicula pelliculosa</i>	Crecimiento	0,0191	
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Crecimiento	0,0045	Orvos <i>et al.</i> 2002
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	Velocidad de crecimiento	0,0028	
	Crecimiento	0,0014	
<i>Closterium ehrenbergii</i>	Crecimiento	0,620	Reddy y Bashamohideen 1988
<i>Skeletonema costatum</i> (diatomea)	Velocidad de crecimiento	0,066	
<i>Navicula pelliculosa</i>	Crecimiento	0,0191	
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Crecimiento	0,00446	Iwama y Greer 1980
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	Velocidad de crecimiento	0,0028	
	Crecimiento	0,00070	

## 3.2 Materiales y métodos

### Bioensayos de toxicidad

Los test toxicológicos se han desarrollado sobre la microalga verde *Selenastrum capricornutum*, también llamada *Pseudokirchneriella subcapitata* (Hindak, 1990). *P. subcapitata* es un alga verde unicelular (clorofita) con forma de media luna (figura 3.1) y un volumen de  $40\text{-}60\ \mu\text{m}^3$ . Este organismo se puede encontrar en diferentes hábitats, como ambientes epicontinentales, eutróficos y oligotróficos. Cuando sus células se exponen a muestras con componentes tóxicos, su reproducción se ve afectada, y consecuentemente, la velocidad de crecimiento del alga también se ve reducida. El efecto de inhibición causado por agentes tóxicos después de 72 h de contacto se determina mediante la comparación con el crecimiento normal del alga en un sistema no contaminado, llamado “ensayo control negativo”. La incubación de este organismo ha de llevarse a cabo bajo condiciones controladas de temperatura, humedad e intensidad lumínica.

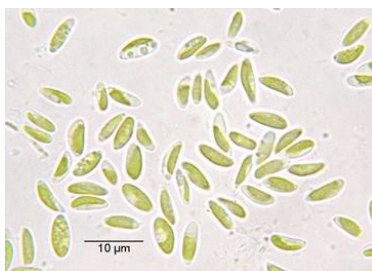


Figura 3.1. *Pseudokirchneriella subcapitata* (USEPA, 2010).

Los ensayos se han desarrollado según los criterios de la Guía OCDE Test Guide 201 (OECD, 2011). El alga, en perlas de alginato, el medio de disolución para la desinmovilización de las algas, y el medio de cultivo del alga, se han obtenido en Microbiotest (Bélgica). El pH se regula mediante la adición de NaOH o HCl. La humedad, la temperatura ( $22\text{-}23\ \text{°C}$ ) y la intensidad de luz en irradiación continua se mantuvieron constantes durante el periodo completo de exposición en una incubadora orbital CERTOMAT. La incubación tuvo lugar en microplacas de 96 pocillos con  $220\ \mu\text{L}$  de volumen total de reacción.

La inoculación, por su parte, fue hecha a partir de un cultivo del alga específico para el ensayo preparado en un matraz Erlenmeyer con el mismo medio de cultivo y las mismas condiciones de incubación. Dicho cultivo debe encontrarse en la fase logarítmica de crecimiento para poder ser usado y eso ocurre generalmente a los 3 días de la incubación. La composición del medio de cultivo del alga se presenta en la siguiente tabla (tabla 3.2):

Tabla 3.2. Composición del medio de cultivo del alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

<i>Componente</i>	<i>Concentración (mg/L)</i>
NaHCO <sub>3</sub>	50,0
NH <sub>4</sub> Cl	15,0
MgCl <sub>2</sub> x6(H <sub>2</sub> O)	12,0
CaCl <sub>2</sub> x2(H <sub>2</sub> O)	18,0
MgSO <sub>4</sub> x7(H <sub>2</sub> O)	15,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,6
FeCl <sub>3</sub> x6(H <sub>2</sub> O)	0,064
Na <sub>2</sub> EDTAx2(H <sub>2</sub> O)	0,1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,185
MnCl <sub>2</sub> x4(H <sub>2</sub> O)	0,415
ZnCl <sub>2</sub>	0,003
CoCl <sub>2</sub> x6(H <sub>2</sub> O)	0,0015
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x2(H <sub>2</sub> O)	0,007
CuCl <sub>2</sub> x2(H <sub>2</sub> O)	0,00001
pH	8,1

Los cuatro compuestos seleccionados, ibuprofeno (IBU), atrazina (ATR), ácido perfluorooctanoico (PFOA) y triclosán (TRI), fueron ensayados tanto por separado como en distintas combinaciones para la evaluación toxicológica sobre el alga *P. subcapitata* (tabla 3.3):

Tabla 3.3. Combinaciones de los cuatro contaminantes (ibuprofeno, PFOA, atrazina y triclosán) ensayadas sobre el alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

<i>Tóxico Individual</i>
Ibuprofeno
PFOA
Atrazina
Triclosán
<i>Combinaciones binarias</i>
(Ibuprofeno) + (Atrazina)
(Ibuprofeno) + (PFOA)
(Ibuprofeno) + (Triclosán)
(PFOA) + (Atrazina)
(PFOA) + (Triclosán)
(Atrazina) + (Triclosán)
<i>Combinaciones ternarias</i>
(Ibuprofeno) + (PFOA) + (Atrazina)
(Ibuprofeno) + (Atrazina) + (Triclosán)
(Ibuprofeno) + (PFOA) + (Triclosán)
(PFOA) + (Atrazina) + (Triclosán)
<i>Combinación cuaternaria</i>
(Ibuprofeno) + (PFOA) + (Atrazina) + (Triclosán)



Para determinar las concentraciones a ensayar de cada uno de los compuestos, se realizó un test de rango de concentraciones. Su finalidad es determinar concentraciones que den toxicidades por debajo y por encima de la  $EC_{50}$ . El test consistió en la preparación de una serie de diluciones con factor de dilución 1:10 partiendo de una disolución de 100 mg/L, obteniendo finalmente las siguientes concentraciones: 0,01, 0,1, 1, 10 y 100 mg/L. Se seleccionó la concentración inicial para el test definitivo,  $D_0$ , y se obtuvo una nueva serie de diluciones a partir de ésta (las concentraciones aplicadas se pueden observar en la tabla 3.4):

Tabla 3.4. Diseño experimental para la determinación de los parámetros dosis-respuesta de los compuestos individuales sobre *Pseudokirchneriella subcapitata*.

<i>Concentraciones de los tóxicos (mg/L)</i>			
IBU	PFOA	ATR	TRI
35	10	0,005	0,0037
87,5	25	0,0125	0,00925
175	50	0,025	0,0185
350	100	0,05	0,037
700	200	0,10	0,074
1.400	400	0,20	0,148
1.750	500	0,25	0,185

Los ensayos de las combinaciones se diseñaron a partir de los valores de  $EC_{50}$  que se obtuvieron en los test de los contaminantes actuando de manera individual. Al igual que en el caso anterior, se comenzó con la preparación de una disolución inicial con la mayor concentración de los compuestos a ensayar y a continuación se realizaron diluciones hasta obtener una serie con un total de cinco concentraciones (tabla 3.5).

La velocidad de crecimiento del alga en todos los ensayos se determina diariamente midiendo la densidad óptica en cada pocillo de la microplaca a 670 nm durante los tres días que dura el ensayo, obteniendo por tanto resultados a las 0, 24, 48 y 72 h de exposición. A partir de estos valores se calcula la velocidad de crecimiento como se explica en el siguiente punto.

El equipamiento usado para la toma de estas medidas es un lector de microplacas RAYTO RT-2100C. Para una evaluación estadísticamente aceptable, cada concentración trabajada así como los controles se ensayan por triplicado. Y con el fin de comprobar la correcta ejecución del procedimiento, se ensaya otro control, denominado control positivo, usando dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ) como tóxico de referencia, según lo establecido en el

procedimiento estandarizado TG 201 (OECD, 2011). Además, se añaden a la batería de concentraciones tres blancos (cultivo abiótico), incubado para evaluar la presencia de contaminación cruzada. Ambos controles se realizan también por triplicado.

Tabla 3.5. Diseño experimental para la determinación del efecto tóxico combinado de ibuprofeno, PFOA, atrazina y triclosán sobre *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Tóxico Individual				
	IBU (mg/L)	PFOA (mg/L)	ATR (mg/L)	TRI (mg/L)
¼ (EC <sub>50</sub> )	58	24	0,0125	0,00925
½ (EC <sub>50</sub> )	116	48	0,025	0,0185
1 (EC <sub>50</sub> )	232	96	0,05	0,037
2 (EC <sub>50</sub> )	464	192	0,10	0,074
4 (EC <sub>50</sub> )	928	384	0,20	0,148
Combinaciones binarias				
IBU + PFOA (232:96)				
¼ (EC <sub>50</sub> )	58	24		
½ (EC <sub>50</sub> )	116	48		
1 (EC <sub>50</sub> )	232	96		
2 (EC <sub>50</sub> )	464	192		
4 (EC <sub>50</sub> )	928	384		
IBU + ATR (232:0,05)				
¼ (EC <sub>50</sub> )	58		0,0125	
½ (EC <sub>50</sub> )	116		0,025	
1 (EC <sub>50</sub> )	232		0,05	
2 (EC <sub>50</sub> )	464		0,10	
4 (EC <sub>50</sub> )	928		0,20	
IBU + TRI (232:0,037)				
¼ (EC <sub>50</sub> )	58			0,00925
½ (EC <sub>50</sub> )	116			0,0185
1 (EC <sub>50</sub> )	232			0,037
2 (EC <sub>50</sub> )	464			0,074
4 (EC <sub>50</sub> )	928			0,148
PFOA + ATR (96:0,05)				
¼ (EC <sub>50</sub> )		24	0,0125	
½ (EC <sub>50</sub> )		48	0,025	
1 (EC <sub>50</sub> )		96	0,05	
2 (EC <sub>50</sub> )		192	0,10	
4 (EC <sub>50</sub> )		384	0,20	
PFOA + TRI (96:0,037)				
¼ (EC <sub>50</sub> )		24		0,00925
½ (EC <sub>50</sub> )		48		0,0185
1 (EC <sub>50</sub> )		96		0,037
2 (EC <sub>50</sub> )		192		0,074
4 (EC <sub>50</sub> )		384		0,148
ATR + TRI (0,05:0,037)				
¼ (EC <sub>50</sub> )			0,0125	0,00925
½ (EC <sub>50</sub> )			0,025	0,0185
1 (EC <sub>50</sub> )			0,05	0,037
2 (EC <sub>50</sub> )			0,10	0,074
4 (EC <sub>50</sub> )			0,20	0,148
Combinaciones ternarias				
IBU + PFOA + ATR (232:96:0,05)				
¼ (EC <sub>50</sub> )	58	24	0,0125	
½ (EC <sub>50</sub> )	116	48	0,025	
1 (EC <sub>50</sub> )	232	96	0,05	
2 (EC <sub>50</sub> )	464	192	0,10	
4 (EC <sub>50</sub> )	928	384	0,20	
IBU + ATR + TRI (232:0,05:0,037)				
¼ (EC <sub>50</sub> )	58		0,0125	0,00925
½ (EC <sub>50</sub> )	116		0,025	0,0185
1 (EC <sub>50</sub> )	232		0,05	0,037
2 (EC <sub>50</sub> )	464		0,10	0,074
4 (EC <sub>50</sub> )	928		0,20	0,148
IBU + PFOA + TRI (232:96:0,037)				
¼ (EC <sub>50</sub> )	58	24		0,00925
½ (EC <sub>50</sub> )	116	48		0,0185
1 (EC <sub>50</sub> )	232	96		0,037
2 (EC <sub>50</sub> )	464	192		0,074
4 (EC <sub>50</sub> )	928	384		0,148
PFOA + ATR + TRI (96:0,05:0,037)				
¼ (EC <sub>50</sub> )		24	0,0125	0,00925
½ (EC <sub>50</sub> )		48	0,025	0,0185
1 (EC <sub>50</sub> )		96	0,05	0,037
2 (EC <sub>50</sub> )		192	0,10	0,074
4 (EC <sub>50</sub> )		384	0,20	0,148
Combinaciones cuaternarias				
IBU + PFOA + ATR + TRI (232:96:0,05:0,037)				
¼ (EC <sub>50</sub> )	58	24	0,0125	0,00925
½ (EC <sub>50</sub> )	116	48	0,025	0,0185
1 (EC <sub>50</sub> )	232	96	0,05	0,037
2 (EC <sub>50</sub> )	464	192	0,10	0,074
4 (EC <sub>50</sub> )	928	384	0,20	0,148

## Análisis de datos

### *Inhibición de la velocidad de crecimiento del alga*

Las medidas de densidad óptica son correlacionadas con las concentraciones aplicadas de cada contaminante al alga en cada pocillo y con el tiempo de la medida para obtener la ecuación de velocidad de crecimiento. Para cada concentración y control, se dibuja una curva de crecimiento y un gráfico del logaritmo de la media de la densidad celular *versus* tiempo. La velocidad de crecimiento específico medio,  $\mu$ , se determina a partir de la pendiente de la ecuación linealizada siguiente (3.1):

$$\ln N_L = \ln N_0 + \mu t \quad (3.1)$$

$t$  tiempo

$N_L$  densidad celular al tiempo  $t$

$N_0$  densidad celular inicial del cultivo

Finalmente, el porcentaje de inhibición para cada concentración ensayada se determina al aplicar la siguiente ecuación (3.2):

$$I(\%) = 100 \left( \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \right) \quad (3.2)$$

$\mu_c$  media de la velocidad de crecimiento del control

$\mu_i$  media de la velocidad de crecimiento para la concentración aplicada

$I$  porcentaje de inhibición para la concentración estudiada

### *Toxicidad de los contaminantes para el alga*

Para el estudio de la toxicidad de los cuatro contaminantes se aplicó la ecuación de efecto medio. Y para estudiar las interacciones entre los tóxicos, se utilizó el Índice de Combinación (CI)-isoblograma, ambos para todos los niveles de efecto mediante el uso del software Compusyn (Chou y Martín, 2005). Ambas ecuaciones están descritas en el capítulo 1.

### 3.3 Resultados y discusión

La tabla 3.6 muestra la toxicidad de cada uno de los compuestos ensayados tanto de manera individual como en combinaciones binarias, ternarias y cuaternaria. Esta toxicidad se expresa como valores de  $EC_{50}$  (mg/L) con intervalos de confianza del 95%, determinados mediante el método de interpolación lineal independiente para cada uno de los modelos dosis-efecto (USEPA, 2002a). De la recta determinada mediante este método se obtienen los valores de  $m$  (antilogaritmo del término independiente),  $EC_{50}$  (pendiente) y  $r$  (coeficiente de correlación lineal) (Chou, 2006). Para las mezclas, el  $CI$  indica sinergia cuando su valor es menor de 1 (resaltado en negrita), efecto aditivo cuando su valor es igual a 1 y efecto antagónico cuando su valor es mayor de 1. Estos valores del  $CI$  se han calculado para niveles de efecto  $EC_{10}$ ,  $EC_{50}$  y  $EC_{90}$ , los cuales representan las dosis requeridas para alcanzar inhibiciones en el crecimiento del alga del 10%, el 50% y el 90% respectivamente.

Los valores de toxicidad obtenidos para el ibuprofeno se corresponden con los encontrados en bibliografía. Cleuvers (2003), Cleuvers (2004) y Yamamoto *et al.* (2007) presentaron en sus trabajos  $EC_{50}$  entre 315 y 360 mg/L para algas verdes. De acuerdo con los datos de este estudio, el ibuprofeno podría clasificarse como no dañino para la microalga ensayada según el criterio de la Regulation (EC) No. 1272/2008. Se han descrito toxicidades menores para otros organismos, como cianobacterias (Pomati *et al.*, 2004) y diatomeas marinas (Knoll, 1995), con  $EC_{50}$  de 4 y 7,1 mg/L respectivamente. La toxicidad del PFOA sobre el alga verde varía considerablemente. Para algas de agua dulce se han encontrado datos desde 96 mg/L (Rosal *et al.*, 2010) hasta 207,46 mg/L (Xu *et al.*, 2013). En ecosistemas marinos, estos valores se reducen, encontrándose en un rango comprendido entre 11,9 y 163,6 mg/L para distintas cepas (Mhadhbi *et al.*, 2012). El valor de la toxicidad obtenido en este trabajo es muy cercano al obtenido por Rosal *et al.*, 2010, pudiendo clasificar a este contaminante como dañino para las algas. En el caso del triclosán, se han encontrado bastantes referencias bibliográficas, así para el alga *P. subcapitata*, los valores de  $EC_{50}$  varían desde 0,000521 a 0,045 mg/L (Iwama y Greer, 1980; Orvos *et al.*,

2002; Harada *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2011). Para otras cepas de algas, incluyendo algas marinas formando biopelículas, estos valores están entre 0,066 y 0,521 mg/L (Iwama y Greer, 1980; Franz *et al.*, 2008; Ricart *et al.*, 2010; Backhaus *et al.*, 2011). Atendiendo a estos datos experimentales y de acuerdo a la directiva Regulation EC No. 1272/2008, el triclosán puede ser considerado como muy tóxico para las algas verdes. De igual manera, el efecto negativo de la atrazina sobre el alga ha sido extensamente estudiado, con toxicidades que varían desde 0,015 hasta 8,297 mg/L (Heever y Grobbelaar, 1996 a y b; Girling *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2001; Fischer *et al.*, 2010; He *et al.*, 2012; Larras *et al.*, 2012). Sin embargo, la toxicidad sobre el alga de agua dulce es siempre inferior a 1 mg/L si atendemos una vez más a la  $EC_{50}$ , por lo que también puede ser clasificada como muy tóxica para este organismo.

Tabla 3.6. Parámetros de la relación dosis-efecto para los tóxicos individuales y las mezclas de éstos sobre el alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* y los valores medios de los Índices de Combinación (CI) para las mezclas a tres niveles de efecto.

Tóxico Individual	$EC_{50}$ (mg/L)	IC 95%	
IBU	232,64	231,98-233,02	
PFOA	96,76	96,01-97,21	
ATR	0,043	0,041-0,044	
TRI	0,036	0,034-0,038	

Combinaciones	Parámetros Dosis-Efecto			CI		
	$EC_{50}$ (mg/L)	m	r	$EC_{10}$	$EC_{50}$	$EC_{90}$
IBU+PFOA	331,51±1,20	1,60	0,994	6,44±0,12	1,87±0,31	<b>0,83±0,02</b>
IBU+ATR	464,05±1,05	1,01	0,996	6,47±0,13	3,53±0,18	2,07±0,41
IBU+TRI	245,97±1,13	1,07	0,993	3,38±0,22	1,78±0,14	1,14±0,11
PFOA+ATR	90,82±0,84	0,94	0,989	1,62±0,08	1,99±0,26	2,92±0,36
PFOA+TRI	100,79±0,98	1,19	0,994	2,05±0,20	2,07±0,18	2,20±0,24
ATR+TRI	0,152±0,07	1,15	0,994	5,50±0,30	3,82±0,37	2,76±0,26
IBU+PFOA+ATR	351,78±0,35	1,18	0,994	5,85±0,28	2,89±0,20	1,94±0,11
IBU+ ATR+TRI	589,49±1,02	2,15	0,982	30,29±0,25	6,31±0,22	1,54±0,31
IBU+ PFOA+TRI	295,65±1,68	1,23	0,987	4,68±0,23	2,33±0,12	1,64±0,29
PFOA+ATR+TRI	110,23±0,23	0,75	0,999	1,55±0,09	3,48±0,14	8,84±0,15
IBU+PFOA+ATR+TRI	108,21±0,41	0,79	0,979	<b>0,83±0,01</b>	1,13±0,03	2,02±0,05

Toxicidad de los compuestos individuales expresada como  $EC_{50}$  sobre *P. subcapitata* (mg/L) con intervalos de confianza del 95%. Para las mezclas, los parámetros dosis-efecto y la media de los CI con intervalos de confianza del 95%.  $EC_{10}$ ,  $EC_{50}$  y  $EC_{90}$ , son las dosis que inhibieron el crecimiento un 10%, 50% y 90% respectivamente.  $CI < 1$ ,  $CI = 1$ , y  $CI > 1$  indican sinergismo, efecto aditivo y antagonismo respectivamente. Las respuestas sinérgicas están señaladas en negrita.

Los datos representados en la figura 3.2 muestran el nivel de efecto observado ( $\log CI$ ) en las mezclas binarias que contienen ibuprofeno como función de la fracción afectada ( $fa$ ). El resultado para *P. subcapitata* indica que todas las mezclas binarias tienen un comportamiento antagonístico sobre el crecimiento del alga a bajos  $fa$ . El perfil de las combinaciones binarias es similar e independiente del contaminante mezclado con ibuprofeno. Para dosis altas de

tóxico, existe una tendencia al sinergismo, y la combinación del antiinflamatorio con el compuesto perfluorinado muestra un comportamiento sinérgico a valores de efecto alrededor de 0,8, por lo que puede considerarse como la mezcla más peligrosa.

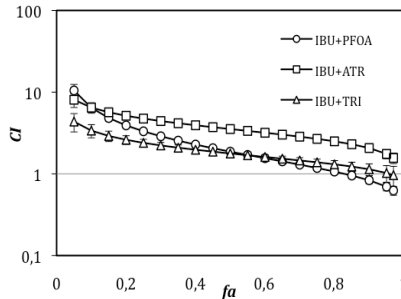


Figura 3.2. Índices de Combinación para las mezclas binarias que contienen ibuprofeno. La línea continua a  $CI = 1$  representa aditividad.

De la misma manera, la figura 3.3 muestra los resultados correspondientes a las mezclas ternarias. El perfil de toxicidad de las combinaciones que incluyen PFOA es similar, presentando antagonismo a todos los niveles de efecto. Sólo la mezcla de ibuprofeno con compuestos clorados tiene tendencia al sinergismo a niveles de efecto mayores a 0,9, pudiendo ser considerada como la mezcla más peligrosa para los niveles de efecto elevados. Sin embargo, el PFOA amortigua las variaciones del  $CI$  en estas combinaciones ternarias. El rango de variación de los valores de  $CI$  estimados resultó bastante estrecho, de 7,8 a 1,7 para la combinación de ibuprofeno, atrazina y PFOA y de 6,3 a 1,5 para el ibuprofeno en combinación con triclosán y PFOA.

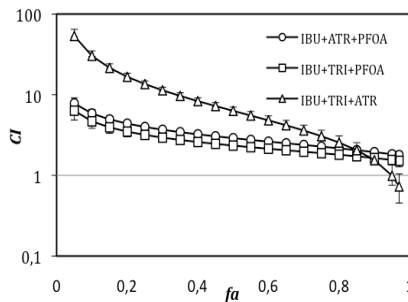


Figura 3.3. Índices de Combinación para las mezclas ternarias que contienen ibuprofeno. La línea continua a  $CI = 1$  representa aditividad.

Los perfiles de toxicidad de combinaciones binarias y ternarias del PFOA con PFOS (ácido sulfónico de perfluorooctano), triclosán y 2,4,6-triclorofenol, así como con los reguladores lipídicos gemfibrozil y benzafibrato, estudiados por Boltes *et al.* (2012), mostraron que la mayoría de combinaciones binarias presentaron antagonismo a todos los niveles de efecto y solo la adición de un tercer compuesto cambió el tipo de interacción a sinergismo, como se puede observar que ha ocurrido en las mezclas ensayadas en este trabajo con ibuprofeno. Los resultados del perfil toxicológico para la mezcla cuaternaria (ibuprofeno, PFOA, atrazina y triclosán) se muestran en la figura 3.4, donde puede observarse como el comportamiento sinérgico es el dominante en la zona de bajos niveles de efecto, cambiando a aditivo cerca de la  $EC_{50}$  estimada, y finalmente a antagónico cuando aproximadamente el 90 % de la población se ve afectada. Estos datos se corresponden con otros trabajos anteriores, donde el método del (CI)-isobograma se aplicó al estudio de las interacciones de contaminantes sobre distintos organismos acuáticos (Rodea-Palomares *et al.*, 2010; Rosal *et al.*, 2010; Rodea-Palomares *et al.*, 2012).

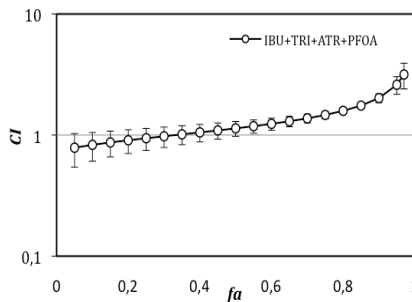


Figura 3.4. Índices de Combinación para la mezcla cuaternaria (ibuprofeno, PFOA, atrazina y triclosán). La línea discontinua a  $CI = 1$  representa aditividad.

El software Compusyn también proporciona los resultados de la toxicidad de mezclas mediante gráficos, denominados poligonogramas. Se trata de un método semicuantitativo que representa las interacciones entre tres o más compuestos a distintos niveles de efecto que permite una presentación visual muy sencilla de los resultados. Las líneas discontinuas significan antagonismo mientras que las líneas continuas representan sinergia. Así mismo, el grosor de las líneas es directamente proporcional a la intensidad del efecto. En la figura 3.5 se representan estos poligonogramas para tres niveles de efecto ( $fa = 0,1$ ;  $fa = 0,5$  y  $fa = 0,9$ ), pudiéndose observar como el antagonismo es el comportamiento predominante en todas las combinaciones de compuestos y



para los tres niveles de efecto expuestos. El efecto más débil se corresponde con la combinación de triclosán e ibuprofeno a  $fa = 0,9$ , mientras que los antagonismos más intensos los presentan dos combinaciones que contienen atrazina: la mezcla de ibuprofeno y atrazina y la mezcla de triclosán y atrazina para los niveles de efecto  $fa = 0,1$  y  $fa = 0,5$ , junto a la combinación de triclosán e ibuprofeno para el porcentaje de población afectado más bajo,  $fa = 0,1$ . Para el nivel de efecto mayor,  $fa = 0,9$ , se observa un comportamiento sinérgico entre el ibuprofeno y el PFOA de una intensidad media.

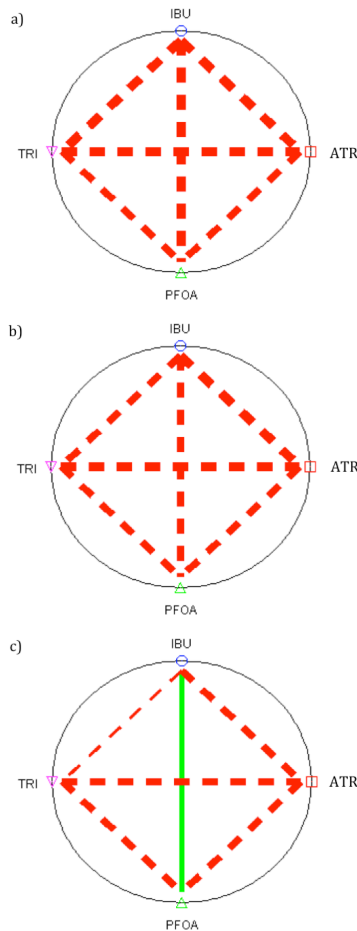


Figura 3.5. Poligonogramas correspondientes a la mezcla cuaternaria (ibuprofeno, PFOA, atrazina y triclosán) para tres niveles de efecto: a)  $fa = 0,1$ ; b)  $fa = 0,5$  y c)  $fa = 0,9$ . El grosor de las líneas representan la intensidad del efecto; las líneas discontinuas representan antagonismo y las líneas continuas representan sinergia.

En cuanto a las mezclas sin ibuprofeno, teniendo en cuenta los resultados mostrados en la tabla 3.6, cabe destacar que todas las combinaciones binarias poseen valores menores de  $EC_{50}$  que las que sí contienen ibuprofeno; presentan, además, un leve antagonismo para todos los efectos de nivel como se desprende de los valores de  $CI$  presentados en la misma tabla. La mezcla ternaria de PFOA, atrazina y triclosán resultó más tóxica que las que incluyen ibuprofeno, pero con un perfil de toxicidad diferente, con comportamiento antagónico a todos los niveles de efecto, mientras que todas las mezclas con el fármaco tienden al comportamiento sinérgico a altos valores de  $fa$ . Estos resultados sugieren que la presencia de ibuprofeno en mezclas complejas puede modificar los perfiles toxicológicos aumentando el nivel de antagonismo estimado para las mezclas binarias y ternarias. Sin embargo, al aumentar la complejidad de estas mezclas, como en el caso de la cuaternaria aquí ensayada, el antagonismo se ve reducido, apareciendo un comportamiento sinérgico, como ya se ha demostrado en trabajos anteriores (Boltes *et al.*, 2012; González-Pleiter *et al.*, 2013). Estos cambios también pueden apreciarse en los perfiles toxicológicos, como se evidencia en las figuras 3.2, 3.3 y 3.4.

### 3.4 Conclusiones

Se ha estudiado la toxicidad de cuatro microcontaminantes orgánicos: el ibuprofeno, el PFOA y el triclosán dentro del grupo de contaminantes emergentes y la atrazina como contaminante prioritario, en un organismo acuático fotosintético, la microalga verde *Pseudokirchneriella subcapitata*. Se han ensayado distintas combinaciones, por un lado los cuatro compuestos actuando de manera individual y por otro las mezclas binarias, ternarias y la cuaternaria. Nuestros datos revelan que las mezclas binarias, ternarias e incluso cuaternarias, que contienen ibuprofeno presentan una tendencia al comportamiento sinérgico, por lo que la presencia del fármaco afectará al comportamiento de los contaminantes que se encuentren en el mismo medio, al igual que la presencia del PFOA, que ha mostrado un efecto de amortiguación de la toxicidad de las distintas muestras. La toxicidad de la mezcla cuaternaria, mayor que la mayoría de las binarias y ternarias, tiende al sinergismo para bajos niveles de efecto, lo cual revela que la complejidad de la muestra afectará de manera directa a la toxicidad global. Demostrando, a su vez, que las aproximaciones más utilizadas para el estudio de mezclas, basadas generalmente en la aditividad, pueden subestimar la toxicidad de algunas de estas mezclas, y por tanto, estimar riesgos ecológicos menores a los que realmente pueden existir en el medio ambiente.

### 3.5 Bibliografía

- Backhaus, T., Porsbing, T., Arrhenius, A., Brosche, S., Johansson, P., Blanck, H. (2011). Single-substance and mixture toxicity of five pharmaceuticals and personal care products to marine periphyton communities. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 30, 2030-2040.
- Białk-Bielińska, A., Stolte, S., Arning, J., Uebers, U., Bösch, A., Stepnowski, P., Matzke, M. (2011). Ecotoxicity evaluation of selected sulfonamides. *Chemosphere*. 85, 928-933.
- Blanck, H., Wallin, G., Wängberg, S.A. (1984). Species-dependent variation in algal sensitivity to chemical compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 8, 339-351.
- Boltes, K., Rosal, R., García-Calvo, E. (2012). Toxicity of mixtures of perfluorooctane sulphonic acid with chlorinated chemicals and lipid regulators. *Chemosphere*. 86, 24-29.
- Bozeman, J., Koopman, B., Bitton, G. (1989). Toxicity testing using immobilized algae. *Aquatic Toxicology*. 14, 345-352.
- Carrasco, J.M., Sabater, C. (1997). Toxicity of atrazine and chlorsulfuron to algae. *Toxicological and Environmental Chemistry*. 59, 89-99.
- Caux, P., Ménard, L., Kent, R.A. (1996). Comparative study of the effects of MCPA, butylate, atrazine, and cyanazine on *Selenastrum capricornutum*. *Environmental Pollution*. 92, 219-225.
- Chou, T.C., Martin, N. (2005). *CompuSyn for Drug Combinations: PC Software and User's Guide: A Computer Program for Quantification of Synergism and Antagonism in Drug Combinations and the Determination of IC<sub>50</sub> and ED<sub>50</sub> and LD<sub>50</sub> Values*. ComboSyn, Inc., Paramus, NJ.
- Chou, T.C. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews*. 58, 621-681.
- Christensen, E.R., Chen, D.X., Nyholm, N., Kusk, K.O. (2001). Joint action of chemicals in algal toxicity tests: Influence of response level and dose-response regression model. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20, 2361-2369.
- Cleuvers, M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*. 142, 185-194.
- Cleuvers, M. (2004). Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 59, 309-315.
- Davy, M., Petrie, R., Smrček, J., Kuchnicki, T., Francois, D. (2001). Proposal to Update Non-target Plant Toxicity Testing Under NAFTA, USEPA, Washington, DC. EEUU. pp. 163.
- DeLorenzo M.E., Keller J.M., Arthur C.D., Finnegan M.C., Harper H.E., Winder V.L., Zdankiewicz D.L. (2008) Toxicity of the antimicrobial compound triclosan and formation of the metabolite methyltriclosan in estuarine systems. *Environmental Toxicology*. 23, 224-232.
- EPA (2002). Methods for measuring the acute toxicity effluents and receiving water to freshwater and marine organism. Environmental protection agency office of water. 5<sup>th</sup> ed. EEUU. EPA-821-R-02-012.

- Fairchild, J.F., Ruessler, D.S., Haverland, P.S., Carlson, A.R. (1997). Comparative sensitivity of *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to sixteen herbicides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 32, 353–357.
- Falkowski, P.G., Raven, J.A. (1997). *Aquatic Photosynthesis*. Blackwell Publishers, Blackwell Science, Reino Unido. pp. 375.
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M., Grimme, L.H. (2001). Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquatic Toxicology*. 56, 13–32.
- Fischer, B.B., Rufenacht, K., Dannenhauer, K., Wiesendanger, M., Eggen, R.I.L. (2010). Multiple stressor effects of high light irradiance and photosynthetic herbicides on growth and survival of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 29, 2211–2219.
- Franz, S., Aletnburger, R., Heilmeyer, H., Schmitt-Jansen, M. (2008). What contributes to the sensitivity of microalgae to triclosán?. *Aquatic Toxicology*. 90, 102–108.
- Girling, A.E., Pascoe, D., Janssen, C.R., Peither, A., Wenzel, A., Schäfer, H., Neumeier, B., Mitchell, G.C., Taylor, E.J., Maund, S.J., Lay, J.P., Jüttner, I., Crossland, N.O., Stephenson, R.R., Persoone, G. (2000). Development of methods for evaluating toxicity to freshwater ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 45, 148–176.
- González-Pleiter, M., Gonzalo, S., Rodea-Palomares, I., Leganés F., Rosal, R., Boltes, K., Marco, E., Fernández-Piñas, F. (2013). Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. *Water Research*. 47, 2050–2064.
- Harada, A., Komori, K., Nakada, N., Kitamura, K., Suzuki, Y. (2008). Biological effects of PPCPs on aquatic lives and evaluation of river waters affected by different wastewater treatment level. *Water Science and Technology*. 58, 1541–1546.
- He, H., Yu, J., Chen, G., Li, W., He, J., Li, H. (2012). Acute toxicity of butachlor and atrazine to freshwater green alga *Scenedesmus obliquus* and cladoceran *Daphnia carinata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 80, 91–96.
- Heever, J.A., Grobbelaar, J.U. (1996a). The use of *Selenastrum capricornutum* growth potential as a measure of toxicity of a few selected compounds. *Water SA*. 22, 183–191.
- Heever, J.A., Grobbelaar, J.U. (1996b). Evaluation of a short-incubation-time small-volume radiocarbon-uptake algal toxicity test. *Journal of Applied Phycology*. 8, 65–71.
- Hindak, F. (1990). *Studies of the Chlorococcal Algae (chlorophyta)*, Vied Biologicke Prace (Slovenskej Akademic Vied). Bratislava. 36, 1–225.
- ISO (1989). Norma ISO 8692. Water quality fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subapicatus* and *Selenastrum capricornutum*.
- ISO (2007). Norma ISO 11348-3. Water quality. Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test). Part 3: Method using freeze-dried bacteria.
- Iwama, G.K., Greer, G.L. (1980). Effect of a bacterial-infection on the toxicity of sodium pentachlorophenate to njuvenile coho salmon. *Transactions of the American Fisheries Society*. 109, 290–292.

- Källqvist, T., Romstad, R. (1994). Effects of agricultural pesticides on planktonic algae and cyanobacteria, examples of interspecies sensitivity variations. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences*. 13, 117–131.
- Kirby, M.F., Sheahan, D.A. (1994). Effects of atrazine, isotoproturon, and mecoprop on the macrophyte *Lemna minor* and the alga *Scenedesmus subspicatus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 53, 120–126.
- Knoll, 1995. BASF Pharma safety data sheet: Ibuprofen. Issue/ revision date 6/4/95. Knoll Pharmaceuticals. Reino Unido. pp. 7.
- Kotrikla, A., Lekkas, T.D., Bletsas, G. (1997). Toxicity of the herbicide atrazine, two of its degradation products and the herbicide metolachlor on photosynthetic microorganisms. *Fresenius Environmental Bulletin*. 6, 502-507.
- Larras, F., Bouchez, A., Rimet, F., Montuelle, B. (2012). Using bioassays and species sensitivity distributions to assess herbicide toxicity towards benthic diatoms. *Plos one*, 7.
- Larsen, D.P., DeNoyelles, F., Stay, F., Shiroyama, T. (1986). Comparisons of single species, microcosm and experimental pond responses to atrazine exposure. *Environmental and Toxicological Chemistry*. 5, 179–190.
- Lukavsky, J. (1992). The evaluation of algal growth-potential (Agp) and toxicity of water by miniaturized growth bioassay. *Water Research*. 26, 1409-1413.
- Mhadhbi, L., Rial, D., Perez, S., Beiras, R. (2012). Ecological risk assessment of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) in marine environment using *Isochrysis galbana*, *Paracentrotus lividus*, *Siriella armata* and *Psetta maxima*. *Journal of Environmental Monitoring*. 14, 1375-1382.
- Muller, R., Schreiber, U., Escher, B.I., Quayle, P., Nash, S.M.B., Mueller, J.F. (2008). Rapid exposure assessment of PSII herbicides in surface water using a novel chlorophyll a fluorescence imaging assay. *Science of The Total Environment*. 401, 51-59.
- Navarro, E., Guasch, H., Sabater, S. (2002). Use of microbenthic algal communities in ecotoxicological tests for the assessment of water quality: the Ter river case study. *Journal of Applied Phycology*. 14, 41–48.
- OECD (1984). Guidelines for Testing of Chemicals, Number 201: Alga, Growth Inhibition Test.
- OECD (2011). Guidelines for the Testing of Chemicals, Number 201. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.
- Orellana, G., Haigh, D. (2008). New trends in fiber-optic chemical and biological sensors. *Current Analytical Chemistry*. 4, 273-295.
- Orvos, D.R., Versteeg, D.J., Inauen, J., Capdevielle, M., Rothenstein, A., Cunningham, V. (2002). Aquatic toxicity of triclosán. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21, 1338–1349.
- Pennington, P.L., Scott, G.I. (2001). Toxicity of atrazine to the estuarine phytoplankton *Pavlova sp* (Prymnesiophyceae): Increased sensitivity after long-term, low-level population exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20, 2237-2242.
- Pomati F., Netting A.G., Calamari D., Neilan B.A. (2004). Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis sp.* and *Lemna minor*. *Aquatic Toxicology*. 67, 387–396.
- Qu, C.S., Chen, W. Bi, J. Huang, L., Li, F.Y. (2011). Ecological risk assessment of pesticide

residues in Taihu Lake wetland, China. *Ecological Modelling*. 222, 287-292.

- Reddy, P.M., Bashamohideen, M. (1988). Toxic Impact of Fenvalerate on the Protein Metabolism in the Branchial Tissue of a Fish, *Cyprinus carpio*. *Current Science*. 57, 211-212.
- Regulation EC No. 1272/2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, Category I, EC50 < 1.
- Ricart, M., Guasch, H., Alberch, M., Barceló, D., Bonnineau, C., Geiszinger, A., Farre, M., Ferrer, J., Ricciardi, F., Romani, A.M., Morin, S., Proia, L., Sala, L., Sureda, D., Sabater, S. (2010). Triclosán persistence through wastewater treatment plants and its potential toxic effects on river biofilms. *Aquatic Toxicology*. 100, 346-353.
- Rodea-Palomares, I., Petre, A.L., Boltes, K., Leganés, F., Perdígón-Melón, J.A., Rosal, R., Fernández-Piñas, F. (2010). Application of the combination index (CI)-isobologram equation to study the toxicological interactions of lipid regulators in two aquatic bioluminescent organisms. *Water Research*. 44, 427-438.
- Rodea-Palomares, I., Leganés, F., Rosal, R., Fernández-Piñas, F. (2012) Toxicological interactions of perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) with selected pollutants. *Journal of Hazardous Materials*. 30, 209-218.
- Rosal, R., Rodea-Palomares, I., Boltes, K., Fernández-Piñas, F., Leganés, F., Petre, A. (2010). Ecotoxicological assessment of surfactants in the aquatic environment: Combined toxicity of docusate sodium with chlorinated pollutants. *Chemosphere*. 81, 288-293.
- Sloof, W., Canton, J.H., Hermens, J.L.M. (1983). Comparison of the susceptibility of 22 freshwater species to 15 chemical compounds. I. (Semi)acute toxicity tests. *Aquatic Toxicology*. 4, 113-128.
- USEPA (2000). Pesticide Ecotoxicity Database (Formerly: Environmental Effects Database (EEDB)). Office of Pesticide Programs. Environmental Fate and Effects Division, Washington, D.C.
- USEPA (2002a). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms, 5th Edition. US Environmental Protection Agency, Washington DC EPA-812-R02-012.
- USEPA (2002b). Revised Draft Hazard Assessment of Perfluorooctanoic acid and Its Salts. U. S. Environmental Protection Agency, Washington, November 4.
- USEPA (2010). Methods for Incorporating Aquatic Plant Effects into Community Level Benchmarks.
- Xu, D., Li, C., Chen, H., Shao, B. (2013). Cellular response of freshwater green algae to perfluorooctanoic acid toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 88, 103-107.
- Yamamoto, H., Nakamura, Y., Nakamuri, Y., Kitani, C., Imari, T., Sekizawa, J., Takao, Y., Yamashita, N., Hirai, N., Oda, S., Tatarazako, N. (2007). Initial ecological risk assessment of eight selected human pharmaceuticals in Japan. *Environmental Science*. 14, 177-193.
- Yang, L.H., Ying, G.G., Su, H.C., Stauber, J.L., Adams, M.S., Binet, M.T. (2008). Growth inhibiting effects of 12 antimicrobial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 27, 1201-1208.

Yang, B., Ying, G.C., Zhao, J., Zhang, L., Fang, Y., Nighiem, L.D. (2011). Oxidation of triclosán by ferrate: Reaction kinetics, products identification and toxicity evaluation. *Journal of Hazardous Marterials*. 186, 227-235.



## **Capítulo 4**

Ecotoxicología del ibuprofeno en suelo: efectos sobre  
la elongación de las raíces de *Sorghum bicolor*



## CAPÍTULO 4

### **Ecotoxicología del ibuprofeno en suelo: efectos sobre la elongación de las raíces de *Sorghum bicolor***

#### **4.1 Introducción y objetivos**

La presencia de microcontaminantes orgánicos en el suelo, como el ibuprofeno y el ácido perfluorooctanoico (PFOA), se debe a distintas prácticas que últimamente van en incremento, como la reutilización de aguas para el riego de cultivos y el uso de lodos de depuradora como fertilizantes sobre suelos agrícolas (Vácha *et al.*, 2005 y 2006, Winker *et al.*, 2010). Sin embargo, los efectos toxicológicos de ambos compuestos, aunque han sido estudiados para organismos acuáticos, como bacterias, algas, invertebrados o peces (Cleuvers, 2003; Yamamoto *et al.*, 2007; Colombo *et al.*, 2008; Rosal *et al.*, 2010), han sido muy escasamente investigados en suelo y en planta (Zhao *et al.*, 2011). La toxicidad en suelo puede ser evaluada de manera indirecta, empleando soluciones del suelo, como eluatos, y organismos acuáticos, o de manera directa, analizándola sobre organismos terrestres.

En general, cuando se estudia la fitotoxicidad, ésta se ensaya atendiendo a los efectos en la germinación de semillas o el crecimiento de la planta, ya que el crecimiento de las raíces se ve afectado por las condiciones ambientales como el pH, la temperatura, las sales o los metales (Camargo *et al.*, 2004). Para desarrollar un test de estas características se puede hacer uso del Phytotoxkit. Se trata de un kit comercial diseñado a partir de la guía OCDE TG 208 (OECD, 2003) sobre la germinación de semillas y el crecimiento de plantas superiores y las normas ISO 11269-1 (1993) y 11269-2 (1995) sobre calidad de suelos y la determinación del efecto de compuestos químicos sobre el crecimiento de las raíces. Se desarrolla un ensayo de ecotoxicidad basado en un método de contacto directo entre el contaminante y el suelo, midiendo el efecto sobre un organismo fotosintético: una planta superior. Se estudia tanto la inhibición en la germinación de las semillas de las plantas seleccionadas como la elongación de las raíces de las semillas germinadas en contacto con el suelo.

Este tipo de test ya se ha desarrollado para evaluar la toxicidad de suelos contaminados con contaminantes orgánicos (Migliori *et al.*, 2003; Sharifi *et al.*, 2007; Sekutowski y Sadowski, 2009; Banaszekiewicz *et al.*, 2011; Martí *et al.*, 2011), metales pesados (Liu *et al.*, 2007; Plaza *et al.*, 2009), lodos de depuradora (Oleszczuk, 2008, 2010; Romanowska-Duda *et al.*, 2010; Oleszczuk y Hollert, 2011), sedimentos (Czerniawska-Kusza *et al.*, 2006; Drobniewska *et al.*, 2007; Czerniawska-Kusza y Kusza, 2011), y regados con efluentes de depuradora (Bakopoulou *et al.*, 2011). En literatura sólo se han encontrado dos estudios para evaluar el efecto de mezclas de contaminantes sobre la germinación de plantas superiores: los realizados por Liu *et al.* (2007) y Wang *et al.* (2013), en los que se estudió la inhibición sobre la elongación de las raíces del trigo (*Triticum Aestivum* L.). Los primeros analizaron el efecto del Cd y el  $\text{AsO}_4^{3-}$  de manera individual y combinada a distintos niveles de efecto. Los contaminantes se añadieron en disoluciones en las cuales aumentaba la concentración de Cd a medida que se disminuía la de  $\text{AsO}_4^{3-}$ , determinando mediante relaciones lineales entre dosis y efecto, diferentes comportamientos entre los bajos y medios niveles de efecto y los altos niveles de efecto. Y los segundos trabajaron con dos metales, el Co y el Zn, también como tóxicos individuales y en mezcla binaria. En este caso, los tóxicos fueron añadidos en concentraciones crecientes calculadas a partir de la dosis de cada uno de ellos por separado capaz de inhibir el 50% del crecimiento de la raíz. Y posteriormente determinaron, aplicando una ecuación exponencial, la dosis de mezcla capaz de inhibir el 50% la elongación de las raíces de la planta. Sobre esta misma especie se ha estudiado el efecto de contaminantes emergentes actuando de manera individual, como el triclosán y el galaxolide, pertenecientes al grupo de los PCPs (An *et al.*, 2009), observándose como la elongación de las raíces era inhibida a causa de la exposición de las semillas a cada uno de los compuestos.

Dentro de las plantas que pueden usarse como organismos objetivo en este test, está el *Sorghum bicolor*. Se trata de una monocotiledónea perteneciente a la familia de las gramíneas. Se emplea en la alimentación de animales o como fertilizante de suelos tras ser transformado en compost con otros desperdicios

vegetales o animales; sin embargo, hoy en día se usa principalmente para la producción de energía mediante su combustión (Monti y Venturi, 2003). Se han realizado varios estudios acerca de la reutilización de aguas residuales para el riego de cultivos de esta planta. Para la evaluación de los efectos de este riego, centrados sobre todo en la producción agrícola, los indicadores más empleados son la altura de planta, el grosor del tronco, el número de granos producidos, el número de hojas y la producción total. Pero en ningún caso se ha estudiado la toxicidad debida a contaminantes procedentes del agua de riego, como el ibuprofeno y el PFOA.

El objetivo de este apartado fue la evaluación de la toxicidad combinada de ibuprofeno y PFOA mediante un ensayo de contacto directo sobre una planta superior, el *Sorghum bicolor*, así como la comparación con la toxicidad de la mezclas de contaminantes mediante un ensayo de contacto indirecto, determinando la toxicidad sobre una microalga verde, la *Pseudokirchneriella subcapitata*.

## 4.2 Materiales y métodos

### Muestras de suelo

Se utilizó una muestra compuesta de suelos procedentes de la Planta Experimental de Carrión de los Céspedes, Sevilla. Los muestreos individuales se realizaron de manera superficial, tomando las muestras de 0 a 20 cm. Todos fueron secados al aire y tamizados con malla de 2 mm de luz. Sus principales propiedades físico-químicas se determinaron como fue explicado en el capítulo 2 y se presentan en la tabla 4.1. La muestra, moderadamente alcalina, presentó una salinidad y contenido en carbonato cálcico equivalente bajos y un contenido en materia orgánica medio. La textura era franca con un contenido de arcilla del 20% y un contenido de arena del 47,5%.

Tabla 4.1. Características del suelo utilizado en el ensayo sobre la planta superior *Sorghum bicolor*.

<i>Propiedad</i>	<i>Suelo E</i>
<i>pH</i>	8,11
<i>Conductividad Eléctrica-1:5 (dS/m)</i>	0,21
<i>CaCO<sub>3</sub> (%)</i>	0,17
<i>Materia Orgánica (%)</i>	2,26
<i>Arena (%)</i>	47,5
<i>Limo (%)</i>	32,5
<i>Arcilla (%)</i>	20
<i>Textura</i>	Franco

### Bioensayos de toxicidad

El test sobre un organismo acuático se ha desarrollado sobre la microalga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* siguiendo la guía OCDE TG 201 (OECD, 2008), como se describió en el capítulo 3. El ensayo se realizó en eluato de la muestra de suelo preparado con la relación suelo-agua 1:10, cuya composición se presenta en la tabla 4.2. Éste ha sido enriquecido con medio de cultivo de alga concentrado.

Tabla 4.2. Características del eluato (1:10) del suelo utilizado en el ensayo sobre la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

<i>Propiedad</i>	<i>Eluato</i>
<i>pH</i>	7,9
<i>Conductividad Eléctrica 1:5 (µS/m)</i>	128,8
<i>TOC (mg/L)</i>	7,67
<i>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mg/L)</i>	0,4
<i>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (mg/L)</i>	0,2
<i>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (mg/L)</i>	1,6
<i>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (mg/L)</i>	7,3
<i>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mg/L)</i>	78,5
<i>Na<sup>+</sup> (mg/L)</i>	8,2
<i>K<sup>+</sup> (mg/L)</i>	3,8
<i>Mg<sup>2+</sup> (mg/L)</i>	2,5
<i>Ca<sup>2+</sup> (mg/L)</i>	18,7

Los ensayos de toxicidad sobre la planta terrestre, el *S. bicolor*, se han desarrollado de acuerdo a la guía OCDE TG 208 (OECD, 2003), usando el Phytotoxkit (Microbiotest, Bélgica) para evaluar la inhibición sobre la germinación de las semillas y sobre la elongación de las raíces. Para ello, se plantaron diez semillas en cada una de las placas de trabajo sobre 100 g de suelo saturado en agua con el compuesto a evaluar. La saturación del suelo se calculó mediante la preparación de la pasta saturada del suelo, tomando 100 g del mismo y añadiendo agua hasta observar que toda la masa queda humedecida sin existir agua sobrante, necesitando para ello un total de 40 mL de agua. Se preparó, de cada contaminante, una serie de diluciones partiendo de la solución inicial de mayor concentración del tóxico a ensayar,  $D_0$  (las concentraciones aplicadas se pueden observar en la tabla 4.3). Como disolvente, se ha utilizado una solución tampón fosfato a pH 7, que ha sido preparada diluyendo 0,912 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y 1,76 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  en 1 L de agua miliQ.

Tabla 4.3. Diseño experimental para la determinación del efecto toxicológico del ibuprofeno y el PFOA sobre la germinación de las semillas y la elongación de las raíces de la planta superior *Sorghum bicolor*.

<i>IBU</i> (mg/kg)	<i>PFOA</i> (mg/kg)
14	4
35	10
70	20
140	40
280	80
560	160
700	200

El ensayo de la combinación binaria se diseñó a partir de los valores de  $EC_{50}$  obtenidos para los compuestos evaluados de forma individual. Igualmente se preparó una disolución inicial con la mayor concentración de los componentes a ensayar y se realizaron diluciones hasta obtener un total de cinco concentraciones (tabla 4.4):

Tabla 4.4. Diseño experimental para la determinación del efecto toxicológico del ibuprofeno y el PFOA en su combinación binaria sobre la germinación de las semillas y la elongación de las raíces de la planta superior *Sorghum bicolor*.

	<i>IBU</i> (mg/kg)	<i>PFOA</i> (mg/kg)
$\frac{1}{4}$ ( $EC_{50}$ )	75	35
$\frac{1}{2}$ ( $EC_{50}$ )	150	70
1 ( $EC_{50}$ )	300	140
2 ( $EC_{50}$ )	600	280
4 ( $EC_{50}$ )	1.200	560

Se realizaron tres repeticiones de cada una de las concentraciones de contaminantes para ambos casos (aplicando los compuestos de manera individual y mezclados) y tres blancos, que consistieron en suelo y semillas sin adición de contaminante. Todas las placas se llevaron a una incubadora a 25 °C y en total oscuridad. La ausencia de luz se eligió como condición de trabajo para asegurar que todas las plantas crecerían en las mismas condiciones, teniendo en cuenta que para esta fase del desarrollo de la planta no es necesaria la radiación lumínica.

Después de 72 horas, se retiraron todas las placas de la incubadora y se tomó una fotografía digital de cada una. El análisis de la elongación de las raíces se realizó con el software de análisis de imágenes Image Tool 3.0 para Windows (UTHSCSA, San Antonio, EEUU). Finalmente, el porcentaje de inhibición de germinación de las semillas (SI) y el porcentaje de inhibición de la elongación de las raíces (RI) se calcularon mediante las siguientes fórmulas:

$$SI = 100 \left( \frac{A - B}{A} \right) \quad (4.1) \qquad RI = 100 \left( \frac{A - B}{A} \right) \quad (4.2)$$

Donde A es la media de la germinación de las semillas en el blanco y B es la media de la germinación de las semillas en cada una de las muestras para SI y A es la media de la elongación de las raíces en el blanco y B la elongación de las raíces en cada una de las muestras para RI.

### **Análisis de datos**

En este estudio, como en el capítulo 3, se aplicaron la ecuación de efecto medio y el Índice de Combinación (CI)-isoblograma, ambos para distintos niveles de efecto mediante el uso del software Compusyn (Chou y Martín, 2005), como se describió en el capítulo 1.



### 4.3 Resultados y discusión

Las concentraciones nominales de los tóxicos se pueden considerar estables debido a que la biodegradación en el suelo resulta insignificante, al igual que la evaporación y la resistencia a las transformaciones ocasionadas por la acción de la luz. Por su parte, los procesos de adsorción que tienen lugar también aseguran inmovilización de ambos compuestos, atendiendo a sus altos valores de  $\log K_{OW}$ , de 3,97 para el ibuprofeno y 6,30 para el PFOA, datos presentados en el capítulo 1.

#### Toxicidad del ibuprofeno y el PFOA como contaminantes individuales

En las figuras 4.1 y 4.2 puede apreciarse el efecto sobre las raíces del *S. bicolor* de la aplicación al suelo de ibuprofeno y PFOA, respectivamente. Por otro lado, la tabla 4.5 muestra los parámetros de la curva dosis-efecto para el ibuprofeno y el PFOA sobre ambos organismos, el alga *P. subcapitata* y el *S. bicolor*, expresados como  $EC_{10}$ ,  $EC_{20}$ ,  $EC_{50}$  y  $EC_{90}$  (mg/L) con un intervalo de confianza del 95% determinado mediante el método de interpolación lineal independiente (USEPA, 2002).

Se puede observar como los valores de  $r$  fueron mayores a 0,98 para todos los casos, lo cual indica una buena correlación lineal en los gráficos de efecto medio. Atendiendo a los valores de  $EC_{50}$ , el ibuprofeno puede ser clasificado como no dañino para el alga, según se presentó en el capítulo 3, de acuerdo a la normativa (Regulation EC No. 1272/2008). Yamamoto *et al.* (2007) obtuvieron un valor de  $EC_{50}$  para el ibuprofeno de 360 mg/L mientras que Cleuvers (2004) obtuvo una  $EC_{50}$  de 342,2 mg/L para el alga verde *S. subspicatus*. En nuestro estudio se ha demostrado la aparición de un efecto negativo con una dosis de ibuprofeno de 35 mg/L, mayor concentración que la encontrada por Yamamoto *et al.* (2007) y similar a la obtenida por Cleuvers (2004), cuyos datos se encontraban entre 32 y 2 mg/L, respectivamente. En ninguno de los estudios encontrados en la bibliografía se ha empleado solución de suelo para llevar a cabo ensayos con algas; sin embargo, la comparación del crecimiento del alga *P. subcapitata* en el medio estandarizado por la OCDE no mostró diferencias significativas con las velocidades de crecimiento celular del alga en la solución de suelo incluyendo

nutrientes. Por ello, tras ensayar en el eluato las mayores concentraciones de ambos tóxicos y no observar diferencias con los resultados correspondientes a los estudios en agua, se prosiguió este experimento en medio acuoso.

Bajo el mismo criterio, el PFOA puede ser clasificado como dañino para el alga. Presenta un valor de  $EC_{50}$  muy similar al obtenido por Rosal *et al.* (2010), de 96,2 mg/L. No se encontraron valores para el efecto tóxico de ninguno de los dos contaminantes sobre algas para concentraciones menores, ni para  $EC_{10}$  ni para  $EC_{20}$ , siendo el alga afectada únicamente por concentraciones mayores de 10 mg/L.



Figura 4.1. Efecto toxicológico sobre las raíces de *Sorghum bicolor* al aplicar al suelo, de izquierda a derecha, 0 mg/kg de ibuprofeno, 70 mg/kg de ibuprofeno y 700 mg/kg de ibuprofeno.

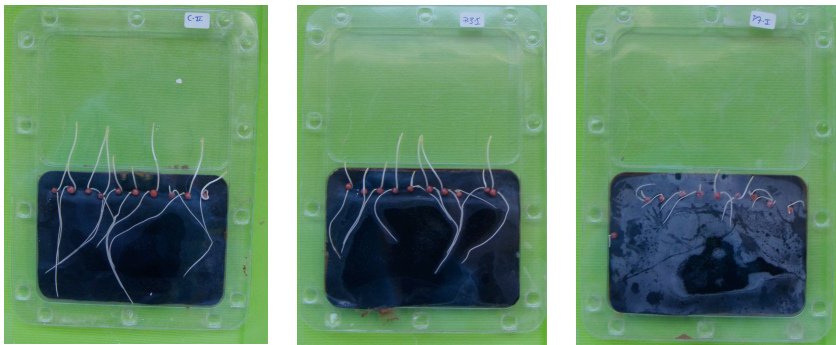


Figura 4.2. Efecto toxicológico sobre las raíces de *Sorghum bicolor* al aplicar al suelo, de izquierda a derecha, 0 mg/kg de PFOA, 20 mg/kg de PFOA y 200 mg/kg de PFOA.

Tabla 4.5. Parámetros de la relación dosis-efecto de los compuestos individuales, ibuprofeno y PFOA, y la mezcla binaria sobre *Pseudokirchneriella subcapitata* y *Sorghum bicolor*.

	<i>P. subcapitata</i>				
	$EC_{10}$ (mg/L)	$EC_{20}$ (mg/L)	$EC_{50}$ (mg/L)	$EC_{90}$ (mg/L)	$r$
IBU	11,92±0,91	35,69±0,82	232,64±2,12	4.540,50±17,56	0,989
PFOA	19,72±1,19	35,47±1,21	96,75±1,18	474,67±8,18	0,994
Mezcla (IBU+PFOA)	84,19±1,40	139,62±2,06	331,51±2,18	1.305,32±9,21	0,993
<i>CI valores</i>	6,44 ±0,78	3,92±0,12	1,87±0,09	<b>0,83±0,08</b>	

	<i>S. bicolor</i>				
	$EC_{10}$ (mg/kg)	$EC_{20}$ (mg/kg)	$EC_{50}$ (mg/kg)	$EC_{90}$ (mg/kg)	$r$
IBU	66,34±0,88	114,88±2,54	293,70 ± 1,82	1.300,20±4,11	0,985
PFOA	5,98±0,46	19,21±1,51	140,63 ± 2,33	3.296,99±12,05	0,987
Mezcla (IBU+PFOA)	10,03±1,10	41,28±0,82	463,83± 3,01	21.453,67±23,11	0,993
<i>CI valores</i>	<b>0,63±0,18</b>	<b>0,92±0,23</b>	2,14±0,22	13,32±0,70	

Toxicidad de los compuestos individuales expresada como  $EC_{10}$ ,  $EC_{20}$ ,  $EC_{50}$  y  $EC_{90}$  sobre *P. subcapitata* y *S. bicolor* (valores en mg/L y mg/kg respectivamente) con intervalos de confianza del 95%. Para las mezclas, los parámetros dosis-efecto y la media de los *CI* con intervalos de confianza del 95%.  $EC_{10}$ ,  $EC_{20}$ ,  $EC_{50}$  y  $EC_{90}$ , son las dosis que inhibieron el crecimiento un 10%, 20%, 50% y 90% respectivamente.  $CI < 1$ ,  $CI = 1$ , y  $CI > 1$  indican sinergismo, efecto aditivo y antagonismo respectivamente. Las respuestas sinérgicas están señaladas en negrita.

La elongación de las raíces de la planta se vio significativamente inhibida por la presencia de ambos contaminantes. Los valores de  $EC_{50}$  revelan que ni el ibuprofeno ni el PFOA resulta dañino para el *S. bicolor*, con valores siempre superiores a 100 mg/kg. Li (2009) encontró menor toxicidad para el PFOA en su estudio sobre lechuga, col china y pepino, con valores de  $EC_{50}$  de 170, 278 y 1.258 mg/L respectivamente. Resultados similares a los nuestros presentaron Zhao *et al.* (2011), quienes evaluaron la inhibición de la elongación de las raíces de *Brassica chinensis* al ser expuestas a distintas concentraciones de PFOA en suelos con propiedades físico-químicas distintas al nuestro. Estos autores obtuvieron valores de  $EC_{50}$  comprendidos en 107 y 246 mg/kg, observando que la toxicidad era dependiente principalmente del contenido de materia orgánica del suelo estudiado.

Las diferencias de toxicidad entre ambos estudios pueden ser explicadas por la diferente naturaleza de los organismos empleados. Las interacciones entre el organismo y el compuesto dependen de dos procesos, por un lado la absorción del contaminante por parte de la planta (su biodisponibilidad) y por otro lado, de la toxicocinética, la cual hace referencia al transporte del tóxico en el organismo receptor (Katayama *et al.*, 2010). Las propiedades del suelo pueden también afectar a la intensidad del efecto debido a los compuestos. En los ensayos con plantas, una reducción en la biodisponibilidad probablemente tenga lugar debido principalmente a la adsorción de los contaminantes por las fracciones del suelo, tanto orgánicas como inorgánicas, como fue ya

ampliamente discutido por Katayama *et al.* (2010). Esto fue demostrado en el trabajo de Zhao *et al.* (2011), los cuales obtuvieron una correlación positiva entre la toxicidad del PFOA y el contenido en materia orgánica del suelo, concluyendo que éste es el factor que mayor importancia tiene en el control de la fitotoxicidad en las plantas superiores.

Por otro lado, el estudio de la inhibición de la elongación de las raíces con otros contaminantes orgánicos (triclosán y galaxolide), realizado sobre el *T. aestivum* (An *et al.*, 2009), mostró un valor de  $EC_{50}$  correspondiente al triclosán de 147,8 mg/L, muy similar al aquí obtenido para el PFOA; mientras que para el galaxolide este valor fue de 423,3 mg/L, bastante mayor al observado por nosotros en el ensayo con ibuprofeno. Estos resultados son fácilmente relacionados con los coeficientes de distribución de carbono orgánico,  $K_{CO}$ . En el caso de la sustancia que resultó más tóxica en nuestro estudio, el PFOA, encontramos valores de  $K_{CO}$  alrededor de 114,82 L/kg (Higgins y Luthy, 2006), mientras que para el galaxolide, con valores de toxicidad mayores, este parámetro alcanza valores de  $1,27 \times 10^5$  L/kg (Jin *et al.*, 2012). Y entre estos extremos, el ibuprofeno presenta un valor de  $K_{CO}$  superior a 200 L/kg (González-Naranjo *et al.*, 2013). Por tanto, se observa como a medida que aumenta la  $K_{CO}$ , la tendencia de la toxicidad es a disminuir, ya que supone un descenso en la movilidad del compuesto y, consecuentemente, de su biodisponibilidad. Las concentraciones nominales de las dos sustancias fueron usadas para el cálculo de la curva dosis-parámetro, ya que la biodegradación en el medio ambiente de ambos tóxicos se ha demostrado que es poco significativa (Moriwaki *et al.*, 2005; Lin y Gan, 2011).

### **Toxicidad del ibuprofeno y el PFOA como mezcla binaria**

Los resultados de toxicidad para la mezcla binaria sobre los dos organismos se presentan también en la tabla 4.5. Los valores de  $EC_{10}$ ,  $EC_{20}$ ,  $EC_{50}$  y  $EC_{90}$  se corresponden con las dosis de los contaminantes que inhibieron la velocidad de crecimiento en el caso de las algas y la elongación de las raíces en el caso de las plantas en un 10, 20, 50 y 90 % respectivamente. Como en la exposición de los organismos a los tóxicos de manera individual, se obtuvo

una  $r$  mayor a 0,99. Esto indica que los datos para la mezcla binaria tienen un buen ajuste al aplicar el principio de efecto medio para ambos organismos. En la figura 4.3 se puede observar el efecto en la elongación de las raíces al estar expuestas a la mezcla de ambos compuestos.

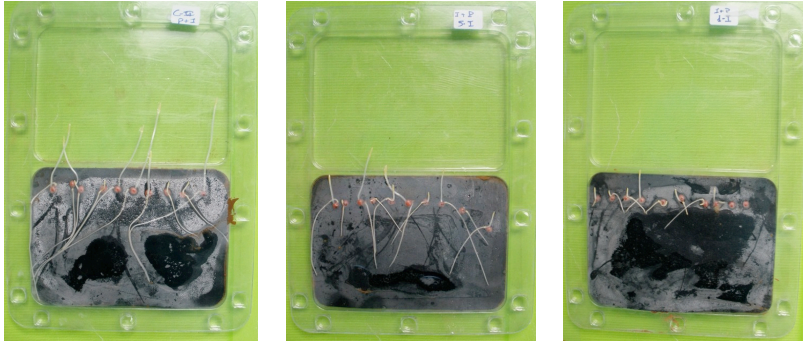


Figura 4.3. Efecto toxicológico sobre las raíces de *Sorghum bicolor* al aplicar al suelo, de izquierda a derecha, (0 mg ibuprofeno + 0 mg PFOA)/kg, (75 mg ibuprofeno + 30 mg PFOA)/kg y (1.200 mg ibuprofeno + 400 mg PFOA)/kg.

Para el *S. bicolor*, la presencia de PFOA e ibuprofeno de manera simultánea produjo un efecto negativo en la elongación de sus raíces, el cual aumentó a medida que aumentaba la concentración de ambos tóxicos. La figura 4.4 muestra la evolución del  $CI$  con la población afectada. Se puede observar como este índice varía considerablemente con los niveles de efecto, tanto en el caso de la planta como en el caso del alga. Para el *S. bicolor* se obtuvo un efecto sinérgico para valores bajos de población afectada ( $f_a$ ). Esta tendencia cambia a  $f_a = 0,25$ , tornándose fuertemente antagonista para valores superiores de fracción afectada.

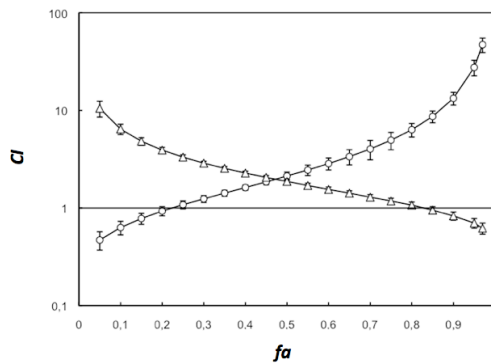


Figura 4.4. Índices de Combinación para la mezcla binaria de ibuprofeno y PFOA sobre la planta superior *Sorghum bicolor* (o) y la microalga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* ( $\Delta$ ). La línea continua a  $CI = 1$  representa aditividad.

Por su parte, la germinación de semillas resulta ser en general un bioindicador relativamente insensible a muchas sustancias tóxicas. Esto se debe principalmente a la dificultad que tienen las semillas para absorber compuestos, ya que la planta embrionaria obtiene los nutrientes del almacenaje de la propia semilla, aislándose así eficazmente del medio (Kapustka, 1997). Y esto se ha comprobado en diversos estudios previos como An *et al.* (2009), Bakopoulou *et al.* (2011) y Oleszczuk y Hollert (2011), quienes han estudiado la germinación de semillas en ensayos de toxicidad, resultando un indicador muy débil. Las relaciones entre las concentraciones de contaminante y la inhibición del número de semillas germinadas, como ocurre en nuestro estudio, resultaron muy pequeñas. Por tanto, la determinación de parámetros toxicológicos, como la  $EC_{50}$ , no fue posible.

La  $EC_{50}$  para la *P. subcapitata* aumentó cuando los dos compuestos aparecen mezclados en una relación constante basado en la proporción de su  $EC_{50}$ . Consecuentemente, cuando los dos contaminantes se mezclan, el alga se ve más afectada que la planta. Para el organismo acuático, la interacción resultó antagonica a bajos niveles de  $f_a$ , cambiando a  $f_a = 0,8$ , hasta que se alcanza el mayor nivel de población afectada, donde el comportamiento se vuelve sinérgico. Rodea-Palomares *et al.* (2012) también estudiaron las interacciones de mezclas que contenían PFOA y otros fármacos. Aunque los ensayos se realizaron sobre una cianobacteria bioluminescente, se obtuvieron resultados similares para la combinación de PFOA con el antibiótico furazolidona, donde predomina el antagonismo a todos los niveles de efecto. Con otro antibiótico, el mitomycin C, se observó antagonismo débil para un valor de  $f_a = 0,7$  aproximadamente.

Para el ibuprofeno no se encontraron combinaciones de contaminantes que incluyeran sustancias perfluoradas, pero sí se han descubierto efectos acumulativos para combinaciones con otros fármacos como el diclofenaco (Cleuvers, 2003).

Las diferencias entre los perfiles toxicológicos obtenidos para cada uno de los organismos fotosintéticos ensayados para la mezcla binaria, no son fácilmente discutibles debido a los pocos estudios similares realizados. Se dispone, por tanto, de información muy limitada sobre la acción combinada de compuestos y los mecanismos de acción de los mismos, bastante desconocidos por el momento para organismos no objetivo. Estudios previos ya han demostrado que la misma combinación de tóxicos puede producir efectos toxicológicos completamente diferentes sobre distintos organismos. Además, tanto el tipo como el grado de interacción puede diferir según la fracción de población afectada (Rodea-Palomares *et al.*, 2010; Rosal *et al.*, 2010). En este estudio, la combinación binaria produjo una disminución de los efectos toxicológicos sobre ambos organismos, como demostró el comportamiento antagónico encontrado para valores próximos a la  $EC_{50}$ , mostrando además diferentes patrones de toxicidad sobre el rango completo de niveles de efecto. Otros trabajos se han enfocado al estudio de la inhibición de las raíces de una planta superior, como el *T. Aestivum*, donde Liu *et al.* (2007) determinaron la toxicidad de la combinación de Cd y  $AsO_4^{3-}$ , observando un efecto antagónico, ya que resultó mayor que la debida a los compuestos por separado. Para la misma planta, Wang *et al.* (2013), en su trabajo con Zn y Co, detectaron sinergias al aplicar ambos metales simultáneamente. Estos resultados resaltan la importancia de los datos de toxicidad determinados para las mezclas de contaminantes, sobre todo cuando estos se encuentran frecuentemente en el medio ambiente a distintos niveles tróficos si se quiere una evaluación rigurosa del riesgo ecológico que estos suponen.

#### 4.4 Conclusiones

En este apartado se presentan los valores de ecotoxicidad para dos contaminantes importantes, el ibuprofeno y el PFOA, actuando tanto individualmente como en combinación, sobre dos organismos fotosintéticos. Los resultados muestran que el alga *P. subcapitata* es más sensible que el *S. bicolor*, tanto para los tóxicos actuando de manera individual como la combinación binaria. Así mismo, se ha observado que el PFOA es más dañino que el ibuprofeno para ambos organismos.

Los perfiles de interacción toxicológica cambiaron para cada test de toxicidad. En el caso de la planta, se estimó un comportamiento sinérgico para bajos niveles de efecto, mientras que para el alga, el antagonismo resultó ser la interacción toxicológica más probable para el mismo nivel de efecto.



## 4.5 Bibliografía

- An, J., Zhou, Q., Sun, Y., Xu, Z. (2009). Ecotoxicological effects of typical personal care products on seed germination and seedling development of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Chemosphere*. 76, 1428–1434.
- Bakopoulou, S., Emmanouil, C., Kungolos, A. (2011). Assessment of wastewater effluent quality in Thessaly region, Greece, for determining its irrigation reuse potential. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74, 188-194.
- Banaszkiewicz, T., Szarek, J., Wysocki, K. (2011). Biological Evaluation of Soil Contamination Around a Non-Operating Pesticide Tomb. *Polish Journal of Environmental Studies*. 20, 485-488.
- Camargo, C.E.O., Ferreira-Filho, A.W.P., Salomon, M.V. (2004). Temperature and pH of nutrient solution on wheat primary root growth. *Scientia Agricola*. 61, 313-318.
- Chou, T.C., Martin, N. (2005). *CompuSyn for Drug Combinations: PC Software and User's Guide: A Computer Program for Quantification of Synergism and Antagonism in Drug Combinations and the Determination of IC<sub>50</sub> and ED<sub>50</sub> and LD<sub>50</sub> Values*. ComboSyn, Inc., Paramus, NJ.
- Cleuvers, M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*. 142, 185–194.
- Cleuvers, M. (2004). Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 59, 309-315.
- Colombo, I., de Wolf, W., Thompson, R.S., Farrar, D.G., Hoke, R.A., L'Hariden, J. (2008). Acute and chronic aquatic toxicity of ammonium perfluorooctanoate (APFO) to freshwater organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 71, 749-756.
- Czerniawska-Kusza, I., Ciesielczuk, T., Kusza, G., Cichon, A. (2006). Comparison of the Phytotoxkit microbistest and chemical variables for toxicity evaluation of sediments. *Environmental Toxicology*. 21, 367-372.
- Czerniawska-Kusza, I., Kusza, G. (2011). The potential of the Phytotoxkit microbistest for hazard evaluation of sediments in eutrophic freshwater ecosystems. *Environmental Monitoring and Assessment*. 179, 113-121.
- Drobniewska, A., Sumorok, B., Nalecz-Jawecki, G., Sawacki, J. (2007). Toxicity assessment of sediments and soil from rivers and floodplains in Central Poland using a battery of microbistests - A case study. *Fresenius Environmental Bulletin*. 16, 109-117.
- González-Naranjo, V., Boltes, K., Biel, M. (2013). Mobility of ibuprofen, a persistent active drug, in soils irrigated with reclaimed water. *Plant, Soil, and Environment*. 2, 68-73.
- Higgins, C.P., Luthy, R.G. (2006). Sorption of perfluorinated surfactants on sediment. *Environmental Science and Technology*. 40, 7251-7256.
- ISO 11269-1 (1993). Soil-quality. Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora - Part 1: Method for the Measurement of Inhibition of Root Growth.
- ISO 11269-2 (1995). Soil-quality. Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora - Part 2: Effects of Chemicals on the Emergence and Growth of Higher Plants.
- Jin, L., He, M., Zhang, J. (2012). Effects of different sediments fractions on sorption of

- galaxolide. *Frontiers of Environmental and Science Engineering*. 6, 59-65.
- Katayama, A., Bhula, R., Burns, G.R., Carazo, E., Felsot, A., Hamilton, D., Harris, C., Kim, Y.H., Kleter, G., Koerdel, W., Linders, J., Peijnenburg, J.G.M.W., Sabljic, A., Stephenson, R.G., Racke, D.K., Rubin, B., Tanaka, K., Unsworth, J., Wauchope, R.D. (2010). Bioavailability of xenobiotics in the soil environment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 203, 1–86.
- Kapustka, L.A. (1997). Selection of phytotoxicity tests for use in ecological risk assessments. *Plants for environmental Studies*. New York. CRC Press. EEUU. pp. 516-548.
- Li, M.H. (2009). Toxicity of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid to plants and aquatic invertebrates. *Environmental Toxicology*. 24, 95-101.
- Lin, K., Gan, J. (2011). Sorption degradation of wastewater-associated non-steroidal anti-inflammatory drugs and antibiotics in soils. *Chemosphere*. 83, 240-246.
- Liu, X.L., Zhang, S.Z., Shan, X.Q., Christie, P. (2007). Combined toxicity of cadmium and arsenate to wheat seedling and plant uptake and antioxidative enzyme responses to cadmium and arsenate co-contamination. *Ecotoxicological Environmental Safety*. 68, 305-313.
- Martí, E., Sierra, J., Cáliz, J., Montserrat, G., Vila, X., Garau, M.A., Cruañas, R. (2011). Ecotoxicity of chlorophenolic compounds depending on soil characteristics. *Science of the Total Environment*. 409, 2707-2716.
- Migliori, L., Cozzolino, S., Fiori, M. (2003). Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. *Chemosphere*. 52, 1233-1244.
- Monti, A., Venturi, G. (2003). Comparison of the energy performance of fibre sorghum, sweet sorghum and wheat monocultures in northern Italy. *European Journal of Agronomy*. 19, 35-43.
- Moriwaki, H., Takagi, Y., Tanaka, M., Tsuruho, K., Okitsu, K., Maeda, Y. (2005). Sonochemical Decomposition of Perfluorooctane Sulfonate and Perfluorooctanoic Acid. *Environmental Science and Technology*. 39, 3388–3392.
- OECD (2003). Guidelines for the Testing of Chemicals. Proposal for updating guideline 208. Terrestrial plant test: 208. Seedling emergence and seedling growth test; 2003. Draft Document.
- OECD (2008). Guidelines for the Testing of Chemicals, No. 23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, PDF Edition (ISSN 1607-310X), 18<sup>th</sup> Addendum.
- Oleszczuk, P. (2008). The toxicity of composts from sewage sludges evaluated by the direct contact test phytotoxkit and ostracodtoxki. *Waste Management*. 28, 1645-1653.
- Oleszczuk, P. (2010). Testing of Different Plants to Determine Influence of Physico-Chemical Properties and Contaminants Content on Municipal Sewage Sludges Phytotoxicity. *Environmental Toxicology*. 25, 38-47.
- Oleszczuk, P., Hollert, H. (2011). Comparison of sewage sludge toxicity to plants and invertebrates in three different soils. *Chemosphere*. 83, 502-509.
- Plaza, G.A., Lukasik, W., Nalecz-Jawecki, G., Margesin, R. (2009). Application of the root elongation test as indicator to assess phytotoxicity of contaminated soils. *Fresenius Environmental Bulletin*. 18, 353-359.

- Regulation EC No. 1272/2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, Category I, EC50 < 1.
- Rodea-Palomares, I., Petre, A.L., Boltes, K., Leganés, F., Perdígón-Melón, J.A., Rosal, R., Fernández-Piñas, F. (2010). Application of the combination index (CI)–isobologram equation to study the toxicological interactions of lipid regulators in two aquatic bioluminescent organisms. *Water Research*. 44, 427–438.
- Rodea-Palomares, I., Leganés, F., Rosal, R., Fernández-Piñas, F. (2012). Toxicological interactions of perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) with selected pollutants. *Journal of Hazardous Materials*. 201-202, 209-218.
- Romanowska-Duda, Z.B., Grzesik, M., Kalaji, H.M. (2010). Phytotoxkit test in growth assessment of corn as an energy plant fertilized with sewage sludge. *Environment Protection Engineering*. 36, 73-81.
- Rosal, R., Rodea-Palomares, I., Boltes, K., Fernández-Piñas, F., Leganés, F., Petre, A. (2010). Ecotoxicological assesment of surfactants in the aquatic environment: Combined toxicity of docusate with chlorinated pollutants. *Chemosphere*. 81, 288-293.
- Sekutowski, T., Sadowski, J. (2009). Phytotoxkit (tm) microbiotest used in detecting herbicide residue in soil. *Environmental Protection Engineering*. 35, 105-110.
- Sharifi, M., Sadeghi, Y., Akbarpour, M. (2007). Germination and growth of six plant species on contaminated soil with spent oil. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 4, 463-470.
- USEPA (2002). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms, 5th Edition. US Environmental Protection Agency, Washington DC EPA-812-R02-012.
- Vácha, R., Horváthová, V., Vysloužilová, H. (2005). The application of sludge on agriculturally used soils and the problem of persistent organic pollutants. *Plant, Soil and Environment*. 51, 12-18.
- Vácha, R., Vysloužilová, H., Horváthová, V., Čechmánková, J. (2006). Recommended maximum contents of persistent organic pollutants on agricultural soils. *Plant, Soil and Environment*. 52, 362-367.
- Wang, Y., Kinraide, T.B., Wang, P., Zhou, D., Hao, X. (2013). Modeling rhizotoxicity and uptake of Zn and Co singly and in binary mixture in wheat in terms of the cell membrane surface electrical potential. *Environmental Science and Technology*. 47, 2831-2838.
- Winker, M., Cjemens, J., Reich, M., Gulyas, H., Otterpohl, R. (2010). Ryegrass uptake of carbamazepine and ibuprofen applied by urine fertilization. *Science of the Total Environment*. 408, 1902-1908.
- Yamamoto, H., Nakamura, Y., Nakamuri, Y., Kitani, C., Imari, T., Sekizawa, J., Takao, Y., Yamashita, N., Hirai, N., Oda, S., Tatarazako, N. (2007). Initial ecological risk assessment of eight selected human pharmaceuticals in Japan. *Environmental Science*. 14, 177-193.
- Zhao, H., Chen, C., Zhang, X., Chen, J., Quan, X. (2011). Phytotoxicity of PFOS and PFOA to *Brassica chinensis* in different Chinese soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74, 1343-1347.



## **Capítulo 5**

Ecotoxicología del ibuprofeno en suelo: efectos sobre la fluorescencia de la clorofila *a* de *Sorghum bicolor*



## CAPÍTULO 5

### **Ecotoxicología del ibuprofeno en suelo: efectos sobre la fluorescencia de la clorofila *a* de *Sorghum bicolor***

#### **5.1 Introducción y objetivos**

La fotosíntesis es el proceso por el cual las plantas, algas, cianobacterias y bacterias fotosintéticas son capaces de transformar la energía lumínica en energía química, siendo la base de las cadenas alimentarias en las que se sustenta la vida del planeta, motor de los productores primarios de todos los ecosistemas (Chia y He, 1999). Este proceso fotoquímico se inicia al ser absorbida la luz por los pigmentos fotosintéticos, principalmente las clorofilas *a* y *b* y los carotenoides, ubicados en los complejos antena de la membrana fotosintética; y tiene lugar en los sistemas fotosintéticos I y II (PSI y PSII), destacando la actividad en el PSII, donde se llevan a cabo la mayor parte de estos procesos. Esta energía absorbida es, por un lado, empleada para hacer trabajo denominado “químicamente útil”, y por otro, disipada en forma de calor y re-emitada igualmente como energía luminosa fluorescente en un 1-2% (Smorenburg *et al.*, 2002). En las plantas, la reacción fotoquímica se basa en la pérdida de electrones por parte de la molécula de clorofila (centros químicos donadores de electrones) al ser excitada y la consecuente aceptación de los mismos por parte de las moléculas de feofitina (centros químicos aceptores de electrones). El grado de esta reacción dependerá de la intensidad luminosa de la excitación, la concentración de los pigmentos fluorescentes, el estado redox de los aceptores y donadores del sistema fotosintético, el apilamiento de los tilacoides (componentes de la membrana del cloroplasto, los orgánulos donde tiene lugar esta reacción) y las translocación de protones.

Las funciones del PSII se ven afectadas por muchos factores de estrés ambiental, definiéndose éstos como cualquier condición externa que produce una influencia en su funcionamiento causando distintas respuestas a nivel fisiológico, ya que se puede alterar la transferencia fotosintética de electrones (Dijkman y Kroon, 2002; Quiles, 2006; Díaz *et al.*, 2007; Ibáñez *et al.*, 2010). Dentro de estos factores ambientales, cabe destacar la temperatura, los

cambios en la intensidad lumínica, la salinidad, las deficiencias nutricionales y la presencia de tóxicos. Por tanto, la medición de la eficacia fotosintética, que puede cuantificarse a partir de la emisión de fluorescencia, supone un medio rápido, relativamente económico y no invasivo para la evaluación de los efectos que causan en la planta diversas situaciones de estrés, permitiéndolo incluso antes de que los cambios en el contenido de clorofila sean visibles (Zarco-Tejada *et al.*, 2003 y 2009; Evain *et al.*, 2004; Xia *et al.*, 2004). Los organismos fotosintéticos adaptados a la oscuridad muestran cambios en la fotoquímica del PSII, según la teoría de flujo de energía en las biomembranas, cuando son iluminados con una luz actínica intensa (Strasser, 1978). La curva de inducción de fluorescencia o cinética de Kautsky, basada en este efecto, muestra un incremento rápido en la fluorescencia tras el primer segundo de iluminación, denominada fase rápida, seguida de una fase lenta donde baja la fluorescencia durante unos minutos. La fase rápida se relaciona directamente con los eventos primarios del PSII, mientras que la fase lenta se asocia principalmente con interacciones entre procesos de las membranas de los tilacoides y procesos metabólicos en el cloroplasto. El aumento de fluorescencia en la fase rápida se debe a una ganancia de electrones, que va cerrando los centros de reacción a medida que estos van aceptando electrones, lo que origina una posterior pérdida de la eficacia fotosintética y, consecuentemente, un aumento en la fluorescencia (González-Moreno *et al.*, 2008).

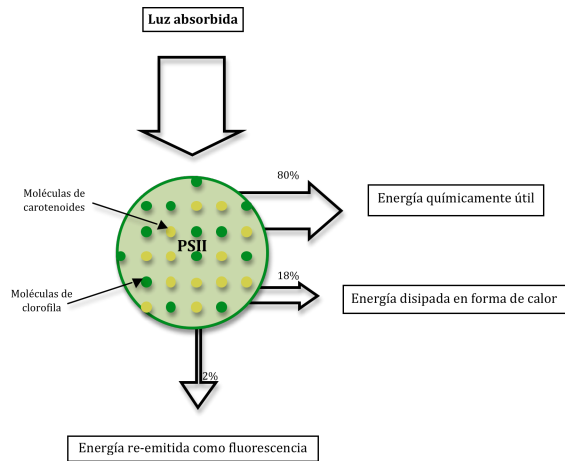


Figura 5.1. Transformación de la radiación solar absorbida por los organismos fotosintéticos. El 80% es transformado en energía químicamente útil, el 18% es disipado en forma de calor y el 2% es re-emitido como fluorescencia.



Para estimar la fotoquímica del PSII a partir de la señal de fluorescencia es necesario poder distinguir los procesos fotoquímicos de los no fotoquímicos, ya que ambos tienen lugar cuando se exponen a la luz los organismos fotosintéticos. El método de “light doubling” (o de “doble luz”) presentado por Bradbury y Baker (1981), basado en la fluorimetría de modulación pulso-amplitud (PAM), se ha convertido en la técnica principal para distinguir estos dos procesos en hoja, tilacoides y suspensiones de algas. Su éxito consiste en que es capaz de separar los eventos fotoquímicos de los no fotoquímicos mediante la aplicación de pulsos de luz saturados mediante radiación actínica continua.

Aplicando este principio, es posible medir la eficacia fotosintética a partir de la emisión de fluorescencia de la planta al ser expuesta a una luz actínica intensa, tras haber sido adaptada a la oscuridad. Se cuantifica principalmente mediante cuatro parámetros, determinados a partir de las medidas de fluorescencia registradas en el periodo de emisión de luz:  $F_o$  (fluorescencia mínima para muestras adaptadas a la oscuridad),  $F_m$  (fluorescencia máxima para muestras adaptadas a la oscuridad),  $F_v$  (fluorescencia variable para muestras adaptadas a la oscuridad),  $F_s$  (fluorescencia para muestras adaptadas a la luz en presencia de luz actínica),  $F_m'$  (fluorescencia máxima para muestras adaptadas a la luz),  $F_o'$  (fluorescencia mínima para muestras adaptadas a la luz) y  $F_v'$  (fluorescencia variable para muestras adaptadas a la luz). En la figura 5.2 se pueden distinguir las zonas del gráfico de fluorescencia de donde se obtiene cada uno de estos valores (Krause y Weis, 1991; Maxwell y Johnson, 2000; González-Moreno *et al.*, 2008).

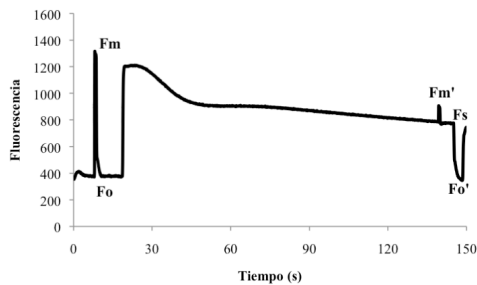


Figura 5.2. Valores de fluorescencia determinados a partir de la curva de inducción de fluorescencia o cinética de Kautsky.

Se calcula, en primer lugar, el rendimiento fotoquímico operacional del PSII,  $\Phi_{PSII}$  (5.1), que mide la proporción de energía absorbida usada para impulsar el proceso fotoquímico, midiendo así la eficacia del transporte electrónico lineal. Se trata del parámetro más empleado ya que responde rápidamente a la exposición a tóxicos (Ralph *et al.*, 2007; Buonasera *et al.*, 2011).

$$\Phi_{PSII} = \frac{(F_m' - F_s)}{F_m'} \quad (5.1)$$

En segundo lugar, se cuantifica el decaimiento fotoquímico,  $qP$  (5.2), que representa la proporción de la energía atrapada por los centros de reacción abiertos y que ha sido usada para el transporte de electrones.

$$qP = \frac{(F_m' - F_s)}{(F_m' - F_o')} \quad (5.2)$$

Y por último, el decaimiento no fotoquímico, que se puede expresar de dos maneras,  $qNP$  (5.3) y  $NPQ$  (5.4), que representan la proporción de energía disipada térmicamente. Reflejan la influencia de los procesos no fotoquímicos en la emisión de la fluorescencia de la clorofila *a* durante la transición de una muestra del estado adaptado a la oscuridad al estado adaptado a la luz.

$$qNP = \frac{F_m - F_m'}{F_m - F_o'} \quad (5.3) \quad NPQ = \frac{F_m - F_m'}{F_m'} \quad (5.4)$$

Muchos estudios se han centrado en la evaluación del efecto de distintas situaciones de estrés, llevados a cabo sobre organismos fotosintéticos tales como plantas superiores, algas o líquenes. Las condiciones ambientales de estrés más estudiadas son la temperatura (Oukarroum *et al.*, 2012), la salinidad (Wu *et al.*, 2012) o el estrés hídrico (Faraloni *et al.*, 2011). También se ha analizado el efecto de diferentes metales como cobre (Oukarroum *et al.*, 2012; Vantová *et al.*, 2013) o cadmio (da Silva *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2012). Algunos autores han estudiado también la eficiencia del proceso fotosintético debido al ozono, de manera individual o a una combinación del mismo con otras situaciones de estrés (Rai *et al.*, 2011; Calatayud *et al.*, 2011; Riddell *et al.*, 2012). Pero pocas investigaciones se han desarrollado con el objetivo de determinar las afecciones al rendimiento fotosintético (o simplemente a la

fotosíntesis) debidas a compuestos orgánicos como herbicidas (Chen *et al.*, 2011; Laviale *et al.*, 2011; Bi *et al.*, 2012) u otra sustancias no comunes en el medio ambiente, como es el caso del metolachlor, que se ha estudiado sobre fitoplancton (Thakkar *et al.*, 2013), el bisfenol A sobre plántulas de soja (Qiu *et al.*, 2013), la artemisina en algas verdes (Ni *et al.*, 2012), la 6-benciladenina (una citoquinina) sobre plántulas de berenjena (Wu *et al.*, 2012), el benz(a)antraceno y el fluoranteno también en fitoplancton (Othman *et al.*, 2012) o el TNT en dos plantas superiores (Naumann *et al.*, 2010). Tampoco se han encontrado trabajos dedicados a estudiar la inhibición del PSII por la presencia de microcontaminantes orgánicos, como fármacos o contaminantes de origen industrial, cuya toxicidad sí que ha sido estudiada sobre organismos fotosintéticos atendiendo a otras afecciones. En este sentido, se ha determinado, por ejemplo, la inhibición de la velocidad del crecimiento o la elongación de raíces de plantas, seleccionando para ello algas verdes (Cleuvers 2003 y 2004; Yamamoto *et al.*, 2007; Rosal *et al.*, 2010; Boltes y González-Naranjo, 2013; Xu *et al.*, 2013), plantas acuáticas superiores (Pomati *et al.*, 2004; Abdul *et al.*, 2012), o plantas terrestres superiores (Schmitt-Jansen *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2010 a y b; Zhao *et al.*, 2011; Furtula *et al.*, 2012; González-Naranjo y Boltes, 2013).

El objetivo del trabajo presentado en este apartado fue la evaluación del efecto tóxico combinado de dos contaminantes emergentes, el ibuprofeno y el PFOA, sobre el PSII del *Sorghum bicolor* mediante el análisis de la inhibición de la emisión de fluorescencia de la clorofila *a*, y determinar así las afecciones que la presencia de estos tóxicos puede provocar en la fisiología de una planta superior.

## 5.2 Materiales y métodos

### Muestras de suelo

El suelo empleado en este estudio fue el mismo que se utilizó para los ensayos del capítulo 4, donde se han presentado y comentado sus principales características físico-químicas.

### Bioensayo de toxicidad

Las semillas de *S. bicolor* se adquirieron en Microbiotest (Bélgica). Se plantaron tres semillas en macetas de vidrio (para evitar la adhesión de los contaminantes a las paredes del recipiente) con 200 g de suelo, saturando el suelo con 70 mL de agua destilada. Se realizaron dos repeticiones para cada una de las concentraciones a trabajar, tanto los tóxicos de manera individual como para la combinación binaria, así como dos blancos, que consistieron en suelo y semillas sin adición de contaminantes. Las semillas germinaron en oscuridad y se mantuvieron las plántulas así durante aproximadamente 10 días a 25 °C. A continuación, ya expuestas a la luz, las plantas fueron regadas según necesidad hídrica durante 15 días para completar su desarrollo foliar de tal forma que presentaran una superficie suficiente para realizar la medición. Pasado este tiempo, se les aplicó el compuesto a ensayar junto con el agua de riego. La serie de diluciones de los contaminantes que se aplicaron a las macetas se prepararon como fue explicado en el capítulo 4, pudiendo observar las concentraciones finales en la tabla 5.1:

Tabla 5.1. Diseño experimental para la determinación de los parámetros dosis-respuesta del ibuprofeno y el PFOA sobre la fotosíntesis de *Sorghum bicolor*.

<i>IBU (mg/kg)</i>	<i>PFOA (mg/kg)</i>
75	18,75
150	37,5
300	75
600	150

Las concentraciones de la combinación binaria, al igual que en el capítulo 3, se determinaron a partir de los valores de  $EC_{50}$  obtenido del ensayo aplicando ambos contaminantes de manera individual (tabla 5.2), preparando en primer lugar una dilución de la mayor concentración a aplicar.

Tabla 5.2. Diseño experimental para la determinación de los parámetros dosis-respuesta para la mezcla binaria del ibuprofeno y el PFOA sobre la fotosíntesis de *Sorghum bicolor*.

	<i>IBU</i> (mg/kg)	<i>PFOA</i> (mg/kg)
¼ ( <i>EC</i> <sub>50</sub> )	82,5	18,75
½ ( <i>EC</i> <sub>50</sub> )	165	37,5
1 ( <i>EC</i> <sub>50</sub> )	330	75
2 ( <i>EC</i> <sub>50</sub> )	660	150

### Parámetros de fluorescencia de la clorofila *a*

Los parámetros que caracterizan la emisión de fluorescencia se obtuvieron mediante las medidas de la fluorescencia modulada emitida por las hojas de las plantas, utilizando un fluorímetro modulado portátil FMS-2 (Hansatech Instruments Ltd., Inglaterra). Este fluorímetro cuenta con cuatro fuentes de luz: luz roja modulada de baja intensidad (2  $\mu\text{moles/m}^2\text{s}$ , 583 nm), pulsos de luz actínica de alta intensidad (5-20.000  $\mu\text{moles/m}^2\text{s}$ ), luz actínica blanca continua (300-600  $\mu\text{moles/m}^2\text{s}$ ) y luz rojo lejano (>710 nm); además cuenta con un detector de fluorescencia emitida en la frecuencia y la fase de luz modulada.  $F_0$ , la fluorescencia mínima, se mide bajo un pulso de luz modulada al cabo de 0,8 s;  $F_m$ , la fluorescencia máxima, se mide después de un pulso de saturación a 0,7 s; una vez alcanzado el estado estable de fotosíntesis al aplicar luz actínica, se obtiene  $F_s$ , el rendimiento del estado estable de fluorescencia. Un segundo pulso de saturación se aplica durante 0,7 s y se obtiene  $F'_m$ , la máxima fluorescencia una vez adaptada la planta a la luz. La relación  $F_v/F_m$ , que se corresponde con el quantum de máxima eficiencia del PSII, también se calcula sabiendo que  $F_v$  es la diferencia entre  $F_0$  y  $F_m$ . Y finalmente se determinan los parámetros  $\Phi_{PSII}$ ,  $qP$ ,  $qNP$  y  $NPQ$ .

### Análisis de datos

Al igual que en los capítulos 3 y 4, se aplicaron la ecuación de efecto medio y el Índice de Combinación (*CI*)-isoblograma, ambos para todos los niveles de efecto mediante el uso del software Compusyn (Chou y Martín, 2005), como se describió el capítulo 1.

### 5.3 Resultados y discusión

Las propiedades físico-químicas del suelo en el cual se llevó a cabo el experimento se mostraron en el capítulo 4, donde también fue explicada la estabilidad de las concentraciones nominales de los tóxicos en el suelo.

#### **Inhibición de los parámetros de fluorescencia de la clorofila *a***

En las figuras 5.3, 5.4 y 5.5 se observa el efecto negativo sobre *S. bicolor* al aplicar al suelo ibuprofeno, PFOA y la mezcla de ambos, respectivamente. Las hojas de la planta muestran un marchitamiento más acusado directamente relacionado con el aumento de la concentración del tóxico en el agua de riego. Así mismo, a simple vista se ve que el PFOA resulta más nocivo para el *S. bicolor* que el ibuprofeno.

Por otro lado, las curvas de inducción (o cinéticas de Kautsky) presentan formas claramente diferenciadas para las distintas concentraciones aplicadas en los tres casos (figura 5.6). En el gráfico a se ve la disminución de los máximos a medida que la concentración de ibuprofeno aumenta en el suelo, con los mayores valores de fluorescencia máxima para el blanco, tanto en adaptación a la hoja a la oscuridad ( $F_m$ ) como para la hoja adaptada a la luz ( $F_m'$ ). Para las curvas correspondientes a la aplicación de PFOA al suelo (gráfico b), la tendencia es igual que en el caso anterior, aunque este desplazamiento descendente de los gráficos es menos acusado. En el caso de la mezcla de contaminantes (gráfico c), la diferencia entre las menores concentraciones y las mayores es más fácilmente detectable, reduciéndose considerablemente los valores de  $F_m'$ .

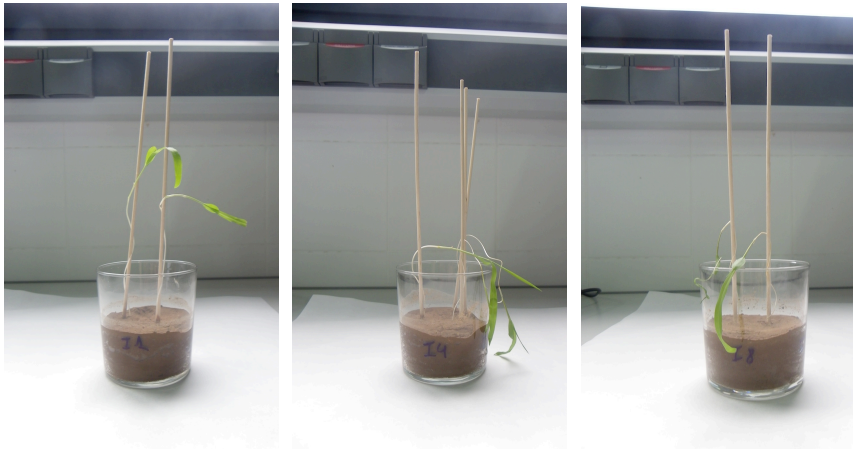


Figura 5.3. Efecto toxicológico sobre las hojas de *Sorghum bicolor* al aplicar al suelo, de izquierda a derecha, 0 mg/kg de ibuprofeno, 300 mg/kg de ibuprofeno y 600 mg/kg de ibuprofeno.

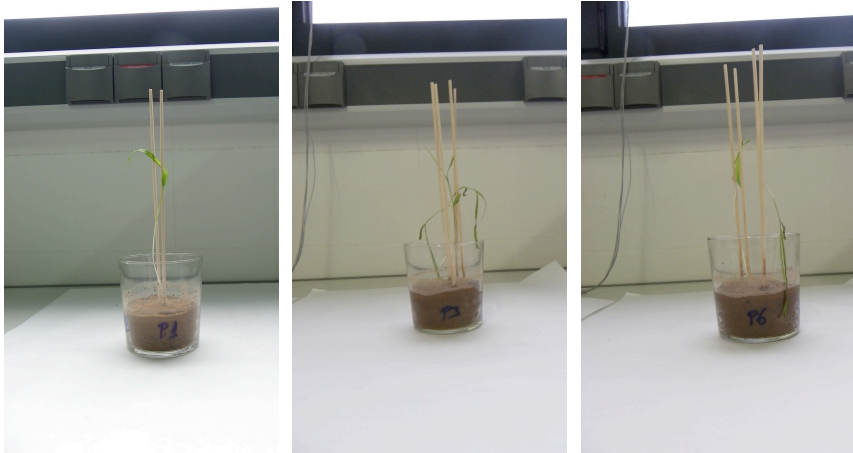


Figura 5.4. Efecto toxicológico sobre las hojas de *Sorghum bicolor* al aplicar al suelo, de izquierda a derecha, 0 mg/kg de PFOA, 75 mg/kg de PFOA y 150 mg/kg de PFOA.

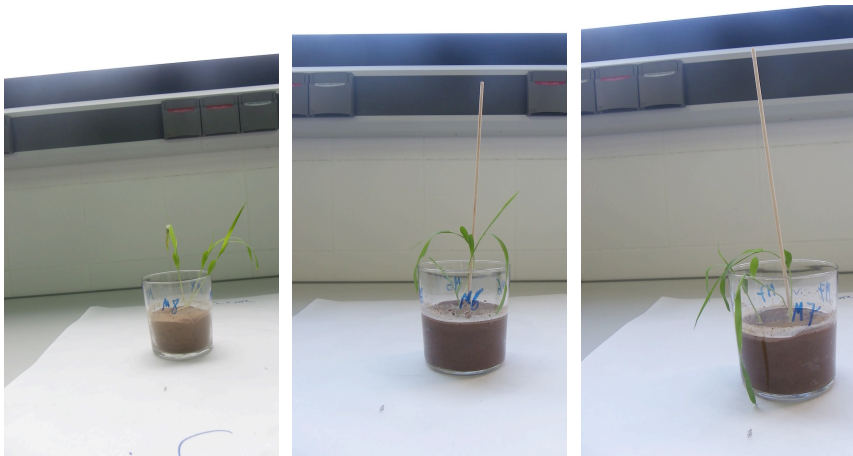


Figura 5.5. Efecto toxicológico sobre las hojas de *Sorghum bicolor* al aplicar al suelo, de izquierda a derecha, (0 mg ibuprofeno + 0 mg PFOA)/kg, (330 mg ibuprofeno + 75 mg PFOA)/kg y (660 mg ibuprofeno + 150 mg PFOA)/kg.

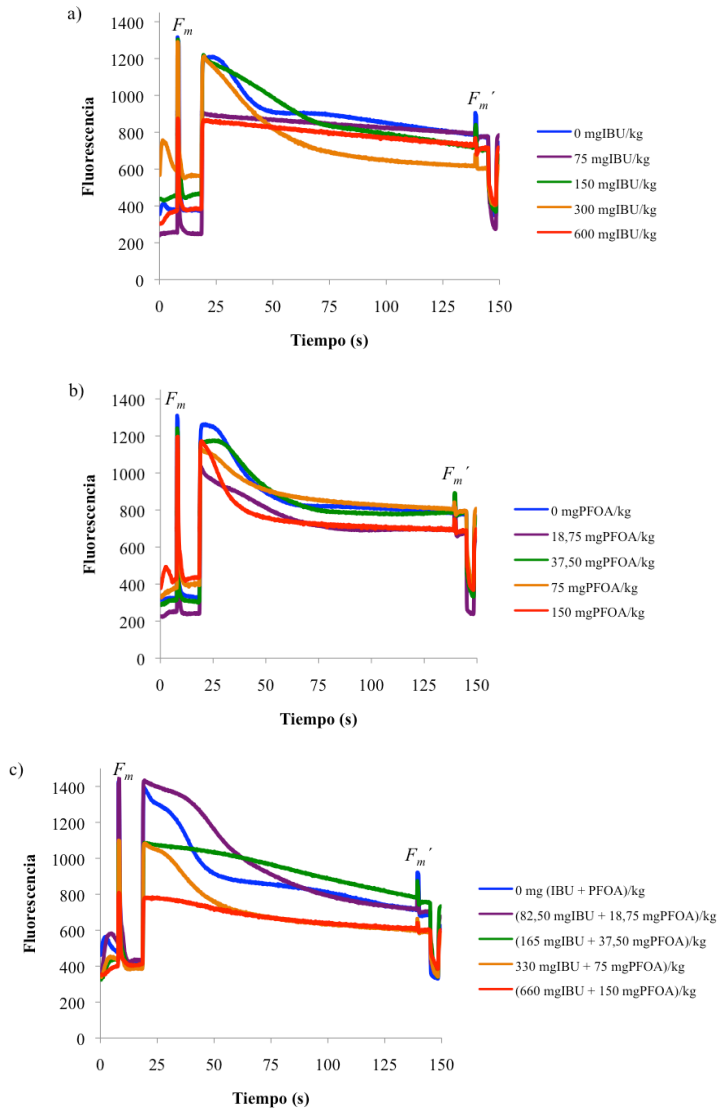


Figura 5.6. Curvas de inducción de fluorescencia (cinéticas de Kautsky) para las distintas concentraciones de ibuprofeno (a), PFOA (b) y la mezcla de ambos compuestos (c).

A partir de estos gráficos se han determinado los valores de fluorescencia característicos para cada ensayo, presentados en las tabla 5.3 y 5.4, y mediante los cuales se procede al cálculo de los parámetros más relevantes para la evaluación de la inhibición del funcionamiento del sistema fotosintético de la planta, afectando a la actividad de la clorofila *a*.



Atendiendo únicamente a los valores de fluorescencia directos (no a las relaciones entre ellos), no se observan tendencias muy marcadas. Esto es muy común en este tipo de ensayos, como se desprende de varios estudios desarrollados para la evaluación del efecto de distintos tóxicos (Wen *et al.*, 2011; Cambrollé *et al.*, 2012; Qiu *et al.*, 2013). Por tanto, no se puede relacionar de manera determinante estos resultados con las concentraciones aplicadas, exceptuando la fluorescencia mínima para la hoja adaptada a la luz,  $F_o'$ , cuya tendencia en los casos en los que los contaminantes actúan individualmente es creciente, con valores comprendidos entre 291 y 407 para el ibuprofeno y 308 y 397 para el PFOA, pero sin presentar grandes diferencias entre las distintas concentraciones, siendo la más destacada la correspondiente al primer caso, en el que se añadió el fármaco.

Tabla 5.3. Valores medios de las medidas de fluorescencia y los parámetros determinados con ellos para el ibuprofeno y el PFOA a las distintas concentraciones ensayadas.

Parámetro	Concentración de ibuprofeno (mg/kg)				Concentración de PFOA (mg/kg)			
	75	150	300	600	18,75	37,50	75	150
$F_o$	442	453	611	369	357	322	369	375
$F_m$	1.086	1.303	1.290	871	1.123	1.209	1.304	1.118
$F_v$	644	850	679	502	766	887	935	743
$F_v/F_m$	0,593	0,652	0,526	0,576	0,682	0,734	0,717	0,665
$F_s$	590	721	617	731	666	680	893	805
$F_m'$	705	840	675	756	799	803	1.015	830
$F_o'$	291	368	405	407	308	306	371	397
$F_v'$	414	472	270	349	491	497	644	433
$F_v'/F_m'$	0,587	0,562	0,400	0,462	0,615	0,619	0,634	0,522
$\text{SigmaPSII}$	0,163	0,142	0,086	0,033	0,166	0,153	0,120	0,030
$qP$	0,278	0,252	0,215	0,072	0,271	0,247	0,189	0,058
$qNP$	0,479	0,495	0,695	0,248	0,398	0,450	0,310	0,399
$NPQ$	0,540	0,551	0,911	0,152	0,406	0,506	0,285	0,347

Tabla 5.4. Valores medios de las medidas de fluorescencia y los parámetros determinados con ellos para la mezcla de ibuprofeno y PFOA a las distintas concentraciones ensayadas.

Parámetro	Concentración de ibuprofeno + PFOA (mg/kg)			
	82,5+18,75	165+37,50	330+75	660+150
$F_o$	557	437	457	396
$F_m$	1.421	1.085	988	805
$F_v$	864	648	531	409
$F_v/F_m$	0,608	0,597	0,531	0,508
$F_s$	718	784	700	609
$F_m'$	830	861	732	634
$F_o'$	358	339	408	384
$F_v'$	472	522	325	250
$F_v'/F_m'$	0,569	0,606	0,447	0,394
$\text{SigmaPSII}$	0,135	0,089	0,048	0,039
$qP$	0,237	0,148	0,102	0,100
$qNP$	0,556	0,300	0,379	0,406
$NPQ$	0,712	0,260	0,380	0,270

Por otra parte, de todos los parámetros medidos se han seleccionado dos de los más estudiados, el rendimiento fotoquímico operacional del PSII,  $\Phi_{PSII}$ , y el decaimiento fotoquímico,  $qP$  (figura 5.7), que sí presentan claras tendencias de disminución a medida que aumenta la situación de estrés a la que la planta se ve expuesta (en nuestro caso, la concentración de contaminante añadida en el agua de riego).

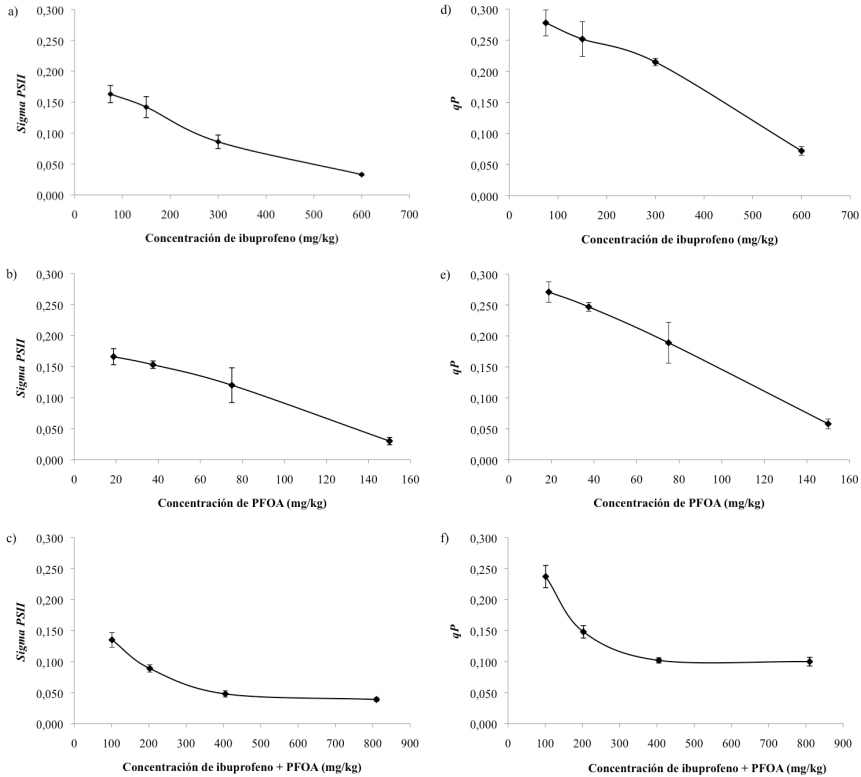


Figura 5.7. Valores medios del rendimiento fotoquímico operacional del PSII,  $\Phi_{PSII}$ , para las distintas concentraciones de ibuprofeno (a), PFOA (b) y la mezcla de ambos compuestos (c) y valores medios del decaimiento fotoquímico,  $qP$ , para las distintas concentraciones de ibuprofeno (d), PFOA (e) y la mezcla de ambos compuestos (f). Las barras de error se corresponden con las desviaciones estándar de las tres repeticiones por muestra.

Para las hojas afectadas por los dos contaminantes actuando de manera individual (a, b, d y e), se observa una tendencia descendente para los dos parámetros representados, evidenciando la inhibición del rendimiento del PSII del *S. bicolor* al estar expuesto al ibuprofeno y al PFOA. La reducción de los valores del rendimiento fotoquímico operacional y del decaimiento fotoquímico es proporcional a la concentración de los tóxicos, con una relación casi lineal, sobre todo para la exposición al compuesto perfluorado. La relación  $qP$  se ve más afectada por los contaminantes ensayados que el

$\Phi_{PSII}$ , ya que sufre una reducción mayor en el rango de concentraciones trabajado. En cuanto a la planta, cabe destacar una mayor sensibilidad al PFOA que al ibuprofeno, ya que las tendencias descendentes son más acusadas para el primero.

Resultados similares se han encontrado para otros contaminantes orgánicos, como los herbicidas metolachlor y el isoproturón causando la reducción de los valores de  $\Phi_{PSII}$  en organismos acuáticos fotosintéticos igualmente relacionada de manera directa con las concentraciones de exposición. Para el metolachlor se encontró una inhibición del 7% para una concentración de exposición de 5 mg/L, mientras que para el isoproturón se alcanzó una inhibición total a una concentración de 20 mg/L (Laviale *et al.*, 2011; Thakkar *et al.*, 2013). También sobre plantas terrestres, donde se ha estudiado la aplicación del monómero bisfenol A, se ha encontrado un efecto inhibitor del funcionamiento del PSII, como se desprende del trabajo de Qiu *et al.* (2013) con plántulas de soja.

Por su parte, la mezcla de los dos tóxicos provoca una reacción similar en estos dos parámetros, con una tendencia directamente proporcional a la cantidad de ambas sustancias añadidas al suelo, aunque esta tendencia, a diferencia de la encontrada para los contaminantes actuando de manera individual, se manifiesta de manera más suave, con pendientes menores sobre todo para las dos últimas concentraciones aplicadas. Se demuestra, por tanto, que estas curvas experimentales son mejor descritas por una ecuación potencial que por una recta, caso observado tanto para el ibuprofeno como para el PFOA como compuestos individuales. Así mismo, al contrario que en los dos casos anteriores, para la combinación binaria el rendimiento fotoquímico ( $\Phi_{PSII}$ ) resulta ser más sensible que el decaimiento fotoquímico ( $qP$ ).

### **Toxicidad del ibuprofeno y el PFOA sobre el sistema fotosintético PSII**

En la tabla 5.5 se exponen los parámetros de la curva dosis-efecto para el ibuprofeno y el PFOA sobre el *S. bicolor*,  $EC_{10}$ ,  $EC_{20}$ ,  $EC_{50}$  y  $EC_{90}$  (mg/kg), con un intervalo de confianza del 95% determinado mediante el método de interpolación lineal independiente (USEPA, 2002).

Tabla 5.5. Parámetros de la relación dosis-efecto de los compuestos individuales, ibuprofeno y PFOA, y la mezcla binaria para  $\Phi_{PSII}$  y  $qP$  en *Sorghum bicolor*.

	$\Phi_{PSII}$				<i>r</i>
	<i>EC</i> <sub>10</sub> (mg/kg)	<i>EC</i> <sub>20</sub> (mg/kg)	<i>EC</i> <sub>30</sub> (mg/kg)	<i>EC</i> <sub>90</sub> (mg/kg)	
IBU	83,19±0,89	130,56±1,27	282,15±1,10	956,96±3,01	0,993
PFOA	12,95±0,15	23,61±0,11	65,96±0,70	336,04±1,03	0,972
Mezcla (IBU+PFOA)	12,93±1,01	30,90±0,22	137,02±0,99	1.451,79±2,01	0,994
<i>CI valores</i>	<b>0,29±0,06</b>	<b>0,41±0,03</b>	<b>0,75±0,08</b>	1,98±0,26	

	<i>qP</i>				<i>r</i>
	<i>EC</i> <sub>10</sub> (mg/kg)	<i>EC</i> <sub>20</sub> (mg/kg)	<i>EC</i> <sub>30</sub> (mg/kg)	<i>EC</i> <sub>90</sub> (mg/kg)	
IBU	92,75±0,73	162,08±1,40	420,86±0,87	1.909,62±1,01	0,962
PFOA	16,99±0,18	28,57±0,96	69,50±0,12	284,27±0,88	0,954
Mezcla (IBU+PFOA)	19,71±1,05	43,36±0,33	166,92±0,52	1.413,91±0,97	0,983
<i>CI valores</i>	<b>0,37±0,14</b>	<b>0,47±0,09</b>	<b>0,73±0,02</b>	1,44±0,31	

Toxicidad de los compuestos individuales expresada como *EC*<sub>10</sub>, *EC*<sub>20</sub>, *EC*<sub>30</sub> y *EC*<sub>90</sub> sobre *S. bicolor* (mg/kg) con intervalos de confianza del 95%. Para las mezclas, los parámetros dosis-efecto y la media de los *CI* con intervalos de confianza del 95%. *EC*<sub>10</sub>, *EC*<sub>20</sub>, *EC*<sub>30</sub> y *EC*<sub>90</sub>, son las dosis que inhibieron el crecimiento un 10%, 20%, 50% y 90% respectivamente. *CI* < 1, *CI* = 1, y *CI* > 1 indican sinergismo, efecto aditivo y antagonismo respectivamente. Las respuestas sinérgicas están señaladas en negrita.

Todos los valores de *r* están por encima de 0,95, por lo que la correlación lineal de los gráficos con los que se ha trabajado el efecto medio es buena. Los resultados para la toxicidad, tomando la *EC*<sub>50</sub> como indicador, señalan que el ibuprofeno no resulta dañino para el *S. bicolor* en cuanto a las afecciones sobre la clorofila *a* según el criterio Regulation (EC) N° 1272/2008, al contrario que el PFOA que sí lo es, con valores menores a 100 mg/kg para los dos parámetros: rendimiento fotoquímico ( $\Phi_{PSII}$ ) y decaimiento fotoquímico (*qP*).

Para el fármaco, el valor de esta *EC*<sub>50</sub> para  $\Phi_{PSII}$  es muy similar al encontrado para la inhibición de la velocidad de crecimiento del alga *Pseudokirchneriella subcapitata* y para la inhibición de la elongación de las raíces del *S. bicolor* (valores presentados en los capítulos 3 y 4), resultando más sensible que *qP*, que presenta una *EC*<sub>50</sub> de 420,86 mg/kg.

Para el compuesto perfluorado se aprecian diferencias significativas entre los valores de *EC*<sub>50</sub> de estos dos ensayos anteriores y los correspondientes a  $\Phi_{PSII}$  y *qP*, muy similares entre sí. En ambos casos, la toxicidad resultó mayor, lo que destaca la mayor sensibilidad de la fotosíntesis del *S. bicolor* frente a este contaminante. Para la mezcla binaria, las concentraciones *EC*<sub>50</sub> de inhibición calculadas sobre la fluorescencia de la planta son bastante menores que las obtenidas para el alga y las raíces de la misma planta, lo que destaca la mayor sensibilidad del PSII como marcador de la toxicidad de esta combinación de tóxicos, aunque para ningún marcador alcanza niveles de peligrosidad.

A bajos niveles de efecto, presentados como  $EC_{10}$  y  $EC_{20}$ , la toxicidad sobre el aparato fotosintético del *S. bicolor* resulta muy similar a la medida a partir de la elongación de sus raíces, tanto en el caso de los compuestos actuando de manera individual como para la mezcla. Para los tres marcadores del *S. bicolor*, el PFOA resultó más dañino, influyendo el efecto de la mezcla, ya que siempre resultó más tóxica que el ibuprofeno sólo. La sensibilidad de la fluorescencia del PSII es mayor que la presentada por la elongación de las raíces cuando aumenta la concentración de exposición si atendemos a la eficiencia fotosintética, ya que su valor de  $EC_{20}$  es el menor de todos los determinados para la combinación binaria. Para ambos niveles de efecto, se obtuvieron valores menores sobre la planta que los correspondientes al organismo acuático, *P. subcapitata*, que presenta menor sensibilidad a los dos contaminantes y a su combinación. Para altos niveles de efecto, estudiados mediante la  $EC_{90}$ , destaca la diferencia para la toxicidad de los dos compuestos sobre la fotosíntesis de la planta frente a los otros dos marcadores, siendo considerablemente inferiores, sobre todo en el caso de la mezcla. Además, se trata del único nivel de efecto donde la toxicidad del ibuprofeno es mayor que la del PFOA, observándose en la inhibición de la elongación de las raíces. En todos los tests se observó una mayor sensibilidad para el rendimiento fotoquímico ( $\Phi_{PSII}$ ) que para el decaimiento fotoquímico ( $qP$ ), exceptuando el mayor nivel de efecto analizado, donde las concentraciones de toxicidad resultan muy similares. Se demuestra, como en otros trabajos anteriores (Ralph *et al.*, 2007; Buonasera *et al.*, 2011), que la velocidad de respuesta ante la presencia de tóxicos es mayor para el rendimiento fotoquímico.

En cuanto a los tóxicos, para el ibuprofeno se contempla un comportamiento muy definido para los distintos marcadores, resultando siempre menos dañino excepto en el caso de las algas para el nivel de efecto más bajo, correspondiente con la  $EC_{10}$ , y en la inhibición de la elongación de las raíces para el nivel de efecto más alto,  $EC_{90}$ . En el caso del PFOA se demostró una mayor afección a bajos niveles de efecto sobre la elongación de las raíces de la planta y una mayor sensibilidad en las medidas de las inhibiciones de  $\Phi_{PSII}$  y  $qP$  para el 50% y el 90% de población afectada. Los mismos resultados se

encontraron para la mezcla de ambos contaminantes, excepto para la  $EC_{20}$ , nivel al cual se vio más afectada la elongación de las raíces, por lo que se puede deducir una influencia determinante del PFOA sobre la toxicidad de la combinación estudiada.

Aunque no se encontraron datos experimentales de  $EC_{50}$  para los efectos toxicológicos sobre el PSII de plantas superiores causados por contaminantes orgánicos, sí que existen estudios acerca de las afecciones debidas a distintos herbicidas sobre otros organismos fotosintéticos, como plantas acuáticas o microalgas. Por ejemplo, Kumar y Han (2011) determinaron la toxicidad de la atrazina, el diurón, la hexazinona y la simazina, actuando tanto de manera individual como en combinaciones binarias, en el organismo *Lemna* sp, cuantificando la inhibición sobre la máxima eficiencia del PSII ( $F_v/F_m$ ). Los cuatro herbicidas resultaron más tóxicos que los compuestos ensayados en este trabajo, lo cual era de esperar ya que se trata de productos diseñados para afectar a organismos fotosintéticos. En cuanto a los comportamientos observados en las mezclas, la sinergia fue el predominante, aunque el antagonismo tuvo lugar cuando se expuso a la planta acuática a altas concentraciones de los tóxicos. Estos perfiles coinciden, por tanto, con los comportamientos encontrados para nuestra mezcla. Por otro lado, Magnusson *et al.* (2010) llevaron a cabo un estudio sobre el efecto de seis herbicidas (diurón, tebuthiuron, atrazina, simazina, hexazinona y desetil atrazina) sobre un grupo de microalgas, destacando la *Cylindrotheca closterium* como la más sensible de las estudiadas. Estos autores determinaron la inhibición del rendimiento fotoquímico operacional del PSII,  $\Phi_{PSII}$ , debida a estos compuestos, presentes solos o como mezclas binarias. Para estas mezclas se trabajó suponiendo que el comportamiento sería aditivo, resultando una buena estimación, al contrario de lo reflejado en nuestro trabajo. La simazina presentó una toxicidad similar a la del ibuprofeno en nuestro estudio, con un valor de  $EC_{50}$  de 242 mg/L, mientras que el tebuthiuron y la atrazina tuvieron  $EC_{50}$  de valores muy parecidos a los obtenidos por nosotros para el PFOA (76,9 y 76,7 respectivamente).

La mayor implicación de este trabajo es la utilización de la información derivada de estudios toxicológicos con combinaciones de compuestos para la evaluación del riesgo ecológico. En lo que respecta a las afecciones debidas a la acción de la mezcla que incluyen al antiinflamatorio ibuprofeno, podemos concluir que para los niveles más bajos de efecto, la elongación de las raíces del *S. bicolor* es una medida más sensible para evaluar el riesgo ambiental, mientras que para niveles de efecto elevados el organismo acuático (*P. subcapitata*) es el más afectado. Sin embargo, atendiendo a los valores de  $EC_{50}$ , los más empleados en la evaluación del riesgo ecológico, el marcador más sensible es la fluorescencia de la clorofila *a*, obteniendo las menores concentraciones tanto para el PFOA actuando de manera individual como para la mezcla.

En la Figura 5.8 se presentan los valores del Índice de Combinación,  $CI$ , frente al porcentaje de población afectado. La evolución es muy similar para ambos parámetros, el rendimiento fotosintético ( $\Phi_{PSII}$ ) y el decaimiento fotosintético ( $qP$ ). El comportamiento de la mezcla binaria atendiendo a la inhibición del  $\Phi_{PSII}$  presenta sinergia para la mayor parte del rango de fracción afectada, siendo ligeramente antagonístico a partir de  $f_a = 0,9$ . El perfil toxicológico para  $qP$  comienza igualmente con un comportamiento sinérgico hasta niveles de población afectada menores de  $f_a = 0,7$ , comenzando un comportamiento muy cercano al aditivismo hasta  $f_a = 0,8$ , valor desde el cual la mezcla muestra antagonismo. Resultados similares se encontraron para la toxicidad de esta mezcla sobre el *S. bicolor* cuando se estudió la inhibición sobre la elongación de las raíces. Pero el comportamiento sinérgico en bajos niveles de efecto tenía lugar en un rango mucho menor, con un tramo mayor donde se presentaba antagonismo, y de una manera más acusada.

Se demuestra, al igual que con los resultados previamente expuestos, una mayor sensibilidad para la fluorescencia de la clorofila *a* que para la elongación de las raíces. Como ya fue discutido en el capítulo 4, se encuentran en bibliografía muy pocos datos toxicológicos sobre plantas superiores de los microcontaminantes orgánicos, por lo que la comparativa con experiencias anteriores queda limitada a la ya presentada en ese mismo capítulo.

Aunque se ha estudiado el mismo organismo, la planta superior *S. bicolor*, cabe destacar que la inhibición de la fluorescencia de la clorofila *a* del sistema PSII aporta información en un estadio completamente distinto de la planta. En la elongación de las raíces ni siquiera existe plántula, mientras que para la toma de medidas de esta fluorescencia es necesario la aparición de hojas ya desarrolladas, midiéndose afecciones en la fisiología de esta relacionadas con su nutrición y desarrollo global.

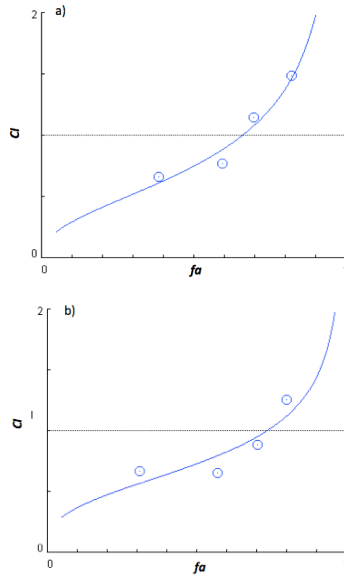


Figura 5.8. Índices de Combinación para la mezcla binaria de ibuprofeno y PFOA para  $\Phi_{PSII}$  (a) y  $qP$  (b) en *Sorghum bicolor*. La línea continua a  $CI = 1$  representa aditividad.



## 5.4 Conclusiones

La inhibición de los parámetros determinados a partir de la emisión de fluorescencia de la clorofila *a*,  $\Phi_{PSII}$  y  $qP$ , han mostrado una relación directa y muy marcada con la concentración de ibuprofeno y PFOA, tóxicos a los que se ha expuesto al organismo *S. bicolor*. Por tanto, suponen una herramienta muy útil para la cuantificación de la toxicidad en medio terrestre. El PFOA resulta más tóxico que el ibuprofeno para ambos marcadores, que además son más sensibles que otro empleados en la cuantificación de la toxicidad sobre plantas superiores. Finalmente, podemos decir que el comportamiento de la mezcla binaria de ambos compuestos es principalmente sinérgico, dejando de manifiesto que las interacciones entre los contaminantes en medio terrestre son muy relevantes a la hora de cuantificar un riesgo ecológico.

## 5.5 Bibliografía

- Abdul, J.M., Colville, A., Lim, R., Vigneswaran, S., Kandasamy, J. (2012). Use of duckweed (*Lemna disperma*) to assess the phytotoxicity of the products of Fenton oxidation of metsulfuronmethyl. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 83, 89–95.
- Bi, Y.F., Miao, S.S., Lu, Y.C., Qiu, C.B., Zhou, Y., Yang, H. (2012). Phytotoxicity, bioaccumulation and degradation of isoproturon in green algae. *Journal of Hazardous Materials*. 243, 242–249.
- Boltes, K., González-Naranjo, V. (2013). Ecological risk assessment of ibuprofen in aquatic environments: an approach for complex mixture of contaminants. *Ibuprofen: Clinical Pharmacology, Medical Uses and Adverse Effects*. Nova Publishers. pp. 85-158.
- Bradbury, M., Baker, N.R. (1981). Analysis of the slow phases of the in vivo chlorophyll fluorescence induction curve. Changes in the redox state of Photosystem II electron acceptors and fluorescence emission from Photosystems I and II. *Biochimica et Biophysica Acta*. 635, 542-551.
- Buonasera, K., Lambrea, M., Rea, G., Touloupakis, E., Giardi, M.T. (2011). Technological applications of chlorophyll *a* fluorescence for the assessment of environmental pollutants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 401, 1139-1151.
- Calatayud, V., García-Breijo, F., Cervero, J., Reig-Armiñana, J., Sanz, M.J. (2011). Physiological, anatomical and biomass partitioning responses to ozone in the Mediterranean endemic plant *Lamottea diana*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74, 1131–1138.
- Cambrollé, J., Mancilla-Leytón, J.M., Muñoz-Vallés, S., Figueroa-Luque, E., Luque, T., Figueroa, M.E. (2013). Evaluation of zinc tolerance and accumulation potential of the coastal shrub *Limoniastrum monopetalum* (L.) Boiss. *Environmental and Experimental Botany*. 85, 50–57.
- Chen, S., Zhou, F., Yin, C., Strasser, R.J., Yang, C., Qiang, S. (2011). Application of fast chlorophyll *a* fluorescence kinetics to probe action target of 3-acetyl-5-isopropyltetramic acid. *Environmental and Experimental Botany*. 71, 269–279.
- Chia, T.F., He, J. (1999). Photosynthetic capacity in oncidium (*Orchidaceae*) plants after virus eradication. *Environmental and Experimental Botany*. 42, 11–16.
- Chou, T.C., Martin, N. (2005). *CompuSyn for Drug Combinations: PC Software and User's Guide: A Computer Program for Quantification of Synergism and Antagonism in Drug Combinations and the Determination of IC50 and ED50 and LD50 Values*. ComboSyn, Inc., Paramus, NJ.
- Cleuvers, M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*. 142, 185–194.
- Cleuvers, M. (2004). Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 59, 309-315.

- da Silva, A.J., do Nascimento, C.W.A., Gouveia-Neto, A., da Silva-Jr, E.A. (2012). LED-induced chlorophyll fluorescence spectral analysis for the early detection and monitoring of cadmium toxicity in maize plants. *Water, Air, and Soil Pollution*. 223, 3527–3533.
- Díaz, M., Haro, V.D., Muñoz, M., Quiles, M.J. (2007). Chlororespiration is involved in the adaptation of *Brassica* plants to heat and high light intensity. *Plant, Cell and Environment*. 30, 1578–1585.
- Dijkman, N.A., Kroon, B.M.A. (2002). Indications for chlororespiration in relation to light regime in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 66, 179–187.
- Evain, S., Flexas, J., Moya, I. (2004). A new instrument for passive remote sensing: 2. Measurement of leaf and canopy reflectance changes at 531 nm and their relationship with photosynthesis and chlorophyll fluorescence. *Remote Sensing of Environment*. 91, 175–185.
- Faraloni, C., Cutino, I., Petruccelli, R., Leva, A.R., Lazzeri, S., Torzillo, G. (2011). Chlorophyll fluorescence techniques as a rapid tool for in vitro screening of olive cultivars (*Olea europaea* L.) tolerant to drought stress. *Environmental and Experimental Botany*. 73, 49–56.
- Furtula, V., Stephenson, G.L., Olaveson, K.M., Chambers, P.A. (2012). Effects of the veterinary pharmaceutical salinomycin and its formulation on the plant *Brassica rapa*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 63, 513–522.
- González-Moreno, S., Perales, H., Salcedo, M. (2008). La fluorescencia de la clorofila *a* como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica*, Vol. 27, No 4. Universidad Nacional Autónoma de México, México. pp. 119-129.
- González-Naranjo, V., Boltes, K. (2013). Toxicity of ibuprofeno and perfluorooctanoic acid for risk assessment of mixtures in aquatic and terrestrial environments. *International Journal of Environmental Science and Technology*. En revisión.
- Ibáñez, H., Ballester, A., Muñoz, R., Quiles, M.J. (2010). Chlororespiration and tolerance to drought, heat and high illumination. *Journal of Plant Physiology*. 167, 732–738.
- Krause, G.H., Weis, E. (1991). Chlorophyll fluorescent and photosynthesis: The basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42, 313-349.
- Kumar, K.S., Han, T. (2011). Toxicity of single and combined herbicides on PSII maximum efficiency of an aquatic higher plant, *Lemna* sp. *Toxicology and Environmental Health Sciences*. 3, 97-105.
- Laviale, M., Morin, S., Créach, A. (2011). Short term recovery of periphyton photosynthesis after pulse exposition to the photosystem II inhibitors atrazine and isoproturon. *Chemosphere*. 84, 731–734.
- Magnusson, M., Heimann, K., Quayle, P., Negri, A. (2010). Additive toxicity of herbicide mixtures and comparative sensitivity of tropical benthic microalgae. *Marine Pollution Bulletin*. 60, 1978-1987.
- Maxweel., K., Johnson, G.N. (2000). Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*. 51, 659-668.

- Naumann, J.C., Anderson, J.E., Young, D.R. (2010). Remote detection of plant physiological responses to TNT soil contamination. *Plant and Soil*. 329, 239–248.
- Ni, L., Acharya, K., Hao, X., Li, S., Li, Y., Li, Y. (2012). Effects of artemisinin on photosystem II performance of *Microcystis aeruginosa* by in vivo chlorophyll fluorescence. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 89, 1165–1169.
- Othman, H.B., Le Boulanger, C., Le Floch, E., Mabrouk, H.H., Hlaili, A.S. (2012). Toxicity of benz(a)anthracene and fluoranthene to marine phytoplankton in culture: Does cell size really matter? *Journal of Hazardous Materials*. 243, 204–211.
- Oukarroum, A., Perreault, F., Popovic, R. (2012). Interactive effects of temperature and copper on photosystem II photochemistry in *Chlorella vulgaris*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 110, 9–14.
- Pomati, F., Netting, A.G., Calamari, D., Neilan, B.A. (2004). Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis sp.* and *Lemna minor*. *Aquatic Toxicology*. 67, 387–396.
- Qiu, Z., Wang, L., Zhou, Q. (2013). Effects of bisphenol A on growth, photosynthesis and chlorophyll fluorescence in above-ground organs of soybean seedlings. *Chemosphere*. 90, 1274–1280.
- Quiles, M.J. (2006). Stimulation of chlororespiration by heat and high light intensity in oat plants. *Plant, Cell and Environment*. 29, 1463–1470.
- Rai, R., Agrawal, M., Agrawal, S.B. (2011). Effects of ambient O<sub>3</sub> on wheat during reproductive development: Gas exchange, photosynthetic pigments, chlorophyll fluorescence, and carbohydrates. *Photosynthetica*. 49, 285–294.
- Ralph, P.J., Smith, R.A., Macinnis-Ng, C.M.O., Seery, C.R. (2007). Use of fluorescence-based ecotoxicological bioassays in monitoring toxicants and pollution in aquatic systems: review. *Toxicological and Environmental Chemistry*. 89, 589–607.
- Regulation EC No. 1272/2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, Category I, EC50 < 1.
- Riddell, J., Padgett, P.E., Nash, T.H. (2012). Physiological responses of lichens to factorial fumigations with nitric acid and ozone. *Environmental Pollution*. 170, 202–210.
- Rosal, R., Rodea-Palomares, I., Boltes, K., Fernández-Piñas, F., Leganés, F., Petre, A. (2010). Ecotoxicological assessment of surfactants in the aquatic environment: Combined toxicity of docusate sodium with chlorinated pollutants. *Chemosphere*. 81, 288–293.
- Schmitt-Jansen, M., Bartels, P., Adler, N., Altenburger, R. (2007). Phytotoxicity assessment of diclofenac and its phototransformation products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 387, 1389–1396.
- Smorenburg, K., Courreges-Lacoste, G.B., Berger, M., Bushmann, C., Court, A., Del Bello, U., Langsdorf, G., Lichtenthaler, H.K., Sioris, C., Stoll, M.P., Visser, H. (2002). Remote sensing of solar-induced fluorescence of vegetation. *Proceedings of SPIE*. 4542, 178–190.
- Strasser, R.J. (1978) The grouping model of plant photosynthesis. Ed. Akoyunoglou G, Chloroplast development. Elsevier. Holanda. pp 513–524.
- Thakkar, M., Randhawa, V., Wei, L. (2013). Comparative responses of two species of marine phytoplankton to metolachlor exposure. *Aquatic Toxicology*. 126, 198–206.

- USEPA (2002). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms, 5th Edition. US Environmental Protection Agency, Washington DC EPA-812-R02-012.
- Vantová, I., Bačkor, M., Klejdus, B., Bačkorová, M., Kováčik, J. (2013). Copper uptake and copper-induced physiological changes in the epiphytic lichen *Evernia prunastri*. *Plant Growth Regulation*. 69, 1–9.
- Wen, K., Liang, C., Wang, L., Hu, G., Zhou, Q. (2011). Combined effects of lanthanum ion and acid rain on growth, photosynthesis and chloroplast ultrastructure in soybean seedlings. *Chemosphere*. 84, 601-608.
- Wu, X., Zhu, Z., Li, X., Zha, D. (2012). Effects of cytokinin on photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence parameters and antioxidative system in seedlings of eggplant (*Solanum melongena* L.) under salinity stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 34, 2105-2114.
- Xia, J.R., Li, Y.J., Zou, D.H. (2004). Effects of salinity stress on PSII in *Ulva lactuca* as probed by chlorophyll fluorescence measurements. *Aquatic Botany*. 80, 129–137.
- Xie, X., Zhou, Q., He, Z., Bao, Y., Bao, Y. (2010a). Physiological and potential genetic toxicity of chlortetracycline as an emerging pollutant in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 29, 922-928.
- Xie, X., Zhou, Q., Bao, Q., He, Z., Bao, Y. (2010b). Genotoxicity of tetracycline as an emerging pollutant on root meristem cells of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Environmental Toxicology*. 26, 417-423.
- Xu, Q., Min, H., Cai, S., Fu, Y., Sha, S., Xie, K., Du, K. (2012). Subcellular distribution and toxicity of cadmium in *Potamogeton crispus* L. *Chemosphere*. 89, 114–120.
- Xu, D., Li, C., Chen, H., Shao, B. (2013). Cellular response of freshwater green algae to perfluorooctanoic acid toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 88, 103-107.
- Yamamoto, H., Nakamura, Y., Nakamuri, Y., Kitani, C., Imari, T., Sekizawa, J., Takao, Y., Yamashita, N., Hirai, N., Oda, S., Tatarazako, N. (2007). Initial ecological risk assessment of eight selected human pharmaceuticals in Japan. *Environmental Science*. 14, 177-193.
- Zarco-Tejada, P.J., Pushnik, J.C., Dobrowski, S., Ustin, S.L. (2003). Steady-state chlorophyll *a* fluorescence detection from canopy derivative reflectance and *double-peak* red-edge effects. *Remote Sensing of Environment*. 84, 283–294.
- Zarco-Tejada, P.J., Berni, J.A.J., Suárez, L., Sepulcre-Cantó, G., Morales, F., Miller, J.R. (2009). Imaging chlorophyll fluorescence with an airborne narrow-band multispectral camera for vegetation stress detection. *Remote Sensing of Environment*. 113, 1262-1275.
- Zhao, H., Chen, C., Zhang, X., Chen, J., Quan, X. (2011). Phytotoxicity of PFOS and PFOA to *Brassica chinensis* in different Chinese soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74, 1343-1347.



## **Capítulo 6**

Riesgo ambiental del ibuprofeno en medios

acuáticos y terrestres





## CAPÍTULO 6

### Riesgo ambiental del ibuprofeno en medios acuáticos y terrestres

#### 6.1 Introducción y objetivos

##### Evaluación del riesgo ambiental de mezclas de contaminantes

La exposición medioambiental a los microcontaminantes orgánicos, tanto emergentes como prioritarios, es el resultado de patrones de comportamiento muy complejos. El grado de esta exposición dependerá de la emisión de los contaminantes y de la distribución de los mismos en los diferentes compartimentos medioambientales como suelo, sedimentos, agua o la biota; este último sólo cuando se trata de compuestos que se bioacumulan o biomagnifican, como en el caso de los perfluorinados (Lehmle, 2005; Prevedouros *et al.*, 2006). Hay que tener en cuenta, además, que los tóxicos aparecen en el medio ambiente como combinaciones multicomponente de distintas familias, y por tanto, para la evaluación del riesgo ecológico se han de contemplar los efectos de la combinación, como los antagonismos y las sinergias (Pomati *et al.*, 2008; Quinn *et al.*, 2009).

La procedencia de los contaminantes es muy variada. Pueden llegar al medio ya como mezclas debido a las emisiones de productos comerciales industriales (biocidas, cosméticos o productos farmacéuticos) que contienen normalmente ingredientes activos de distintas estructuras químicas, o a partir de residuos de una determinada actividad humana, como la aplicación de pesticidas combinados; aunque, en general, las mezclas que aparecen se deben a diversas fuentes.

Incluso para las sustancias emitidas de manera simultánea, la distribución y persistencia medioambiental puede ser diferente a la presentada por los compuestos individualmente, y consecuentemente, las mezclas encontradas pueden ser diferentes de las emitidas originalmente. Por tanto, a pesar de que la toxicidad de mezclas ha sido estudiada a partir de los resultados toxicológicos de los contaminantes actuando individualmente, es necesario

considerar el hecho de que el efecto real de la combinación puede ser específico de la mezcla. Para determinados compartimentos es posible la definición de “bloques”, agrupando así componentes extremadamente parecidos, lo que permite calcular el riesgo considerándolos una unidad (King *et al.*, 1996).

Por su parte, la diversidad de propiedades físico-químicas, ecotoxicología y potencial de degradación de los compuestos que forman las mezclas, dificultan la evaluación del riesgo ecológico de las distintas combinaciones. En general, para el cálculo de estos riesgos ecológicos se emplea el método de los índices de riesgo (Kim *et al.*, 2007a; Gros *et al.*, 2010; García-Galán *et al.*, 2011). Este procedimiento, a su vez, requiere parámetros que describan las relaciones dosis-efecto, denominados PNEC (predicted no-effect concentration), usándose comúnmente  $LC_{50}$  o  $EC_{50}$ . Consecuentemente, la precisión del índice de riesgo cuantificado dependerá del valor de PNEC seleccionado para su cálculo, y esta concentración será representativa o no dependiendo de si el modelo conceptual para estimar la toxicidad de la mezcla se escoge correctamente. Se emplean varios modelos para la cuantificación de la PNEC, atendiendo a si los componentes de la mezcla tienen un modo de acción similar (Bliss, 1939; Sumpter *et al.*, 2006; Thorpe *et al.*, 2006), si presentan una acción independiente (Loewe y Muischnek, 1926; Faust *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2002; Christiansen *et al.*, 2009) o si existen interacciones entre ellos (Rodea-Palomares *et al.*, 2010; Rosal *et al.*, 2010a; Boltos *et al.*, 2012; Boltos y González-Naranjo, 2013; González-Naranjo *et al.*, 2013). En la actualidad se aplican, principalmente, los dos primeros. El método de adición dosis-concentración ha sido el más empleado, habiéndose usado para el estudio de mezclas de antibióticos, pesticidas y otros compuestos orgánicos como clorofenoles (Verro *et al.*, 2009; Leung *et al.*, 2012; Xing *et al.*, 2012), aplicado también sumando los cocientes de riesgo individuales para pesticidas o fármacos, así como un grupo de contaminantes orgánicos persistentes (Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2007; Escher *et al.*, 2011; Qu *et al.*, 2011).

El cálculo de las PNEC mediante el método de adición dosis-concentración se realiza sumando las concentraciones de cada componente de la mezcla expresada como una fracción de su toxicidad individual (Brown, 1968; Sprague, 1970; Altenburger *et al.*, 2004). En él se supone que la acción de los tóxicos combinados es similar, lo cual tendrá lugar si todos los compuestos comparten estrictamente el mismo mecanismo de acción molecular, si surgen fuertes comportamientos sinérgicos o si pertenecen al grupo de las llamadas sustancias tóxicas de referencia (Sumpter *et al.*, 2006; Kortenkamp *et al.*, 2009). Cada compuesto de la mezcla podría, entonces, ser reemplazado por un equivalente (equitóxico) en la misma concentración (Silva *et al.*, 2002). Además, se asume que es aplicable a todo el rango de concentraciones, incluyendo aquellas que están por debajo del mínimo nivel sin efecto observado (SCHER, SCCS, y SCENIHR, 2012). Por otro lado, el método de acción independiente asume que los modos de acción de los componentes de la mezcla son independientes entre sí y que no ocurrirán fenómenos de sinergia o antagonismo (Yu *et al.*, 2012a), presentándose un comportamiento de acción no similar. En el caso de contemplar una adición en la respuesta, los parámetros de toxicidad de mezcla se calculará mediante la suma de las probabilidades de riesgo, mientras que si estamos en un caso de adición del efecto, se calculará sumando las respuestas biológicas del ensayo. Así, las mezclas de compuestos de acción independiente no suponen un riesgo si sus concentraciones son inferiores a las mínimas que no tienen efecto sobre el organismo estudiado. Es importante diferenciar, por tanto, entre el valor de la concentración sin efecto observable, NOEC (non-observed effect concentration) y la mínima concentración cuyo efecto es 0, ya que estos valores de NOEC determinados en el laboratorio no determinan, necesariamente, que a esta concentración el efecto sea nulo (SCHER, SCCS, y SCENIHR, 2012).

A pesar de todo lo aquí expuesto, no existe un acuerdo general sobre el mejor enfoque para la agrupación de los productos químicos, aplicándose comúnmente un criterio técnico basado en el estudio caso por caso. En contraposición a estos modelos de acción similar y de acción independiente, se presenta la ecuación de efecto medio, a partir del cual se determina la  $EC_{50}$

y posterior aplicación del método del Índice de Combinación (CI)-isobograma, que considera los posibles efectos de la mezcla, dependientes de sus componentes, e independientemente de la cantidad del compuesto o de su modo de acción (Chou y Talalay, 1984). Aplicando estas ecuaciones se tienen en cuenta las posibles sinergias y antagonismos que pueden darse en la mezcla objeto de estudio, dependiendo principalmente de la naturaleza de los componentes de la misma y las condiciones medioambientales.

**Presencia en ecosistemas acuáticos de microcontaminantes orgánicos: ibuprofeno, PFOA, atrazina y triclosán**

*Ibuprofeno*

A pesar de encontrar bajas concentraciones de ibuprofeno en los efluentes de las plantas depuradoras de aguas residuales, es frecuentemente detectado en muestras de las diferentes masas de agua que reciben estos efluentes (tabla 6.1). En las aguas residuales urbanas, las concentraciones de fármacos alcanzan niveles de mg/L (Boyd *et al.*, 2003; Metcalfe *et al.*, 2003), lo que condiciona su aparición en diferentes compartimentos del medio ambiente. En los últimos años, se ha detectado en numerosas muestras de agua en España, cuyas máximas concentraciones han sido 2,784 µg/L para aguas superficiales (Fernández *et al.*, 2010) y 55 µg/L para efluentes de depuradora (Santos *et al.*, 2009).

Tabla 6.1. Concentraciones de ibuprofeno detectadas en muestras de agua superficial y efluente de planta depuradora de aguas residuales.

Ibuprofeno			
Agua superficial (ng/L)	Efluente de depuradora (ng/L)	País	Referencia
62,30 <sup>a</sup>		China	Chen <i>et al.</i> 2012
	36,40 <sup>a</sup>	Reino Unido	Gardner <i>et al.</i> 2012
	< 250 <sup>a</sup>	España	Gracia-Lor <i>et al.</i> 2012
31.000 <sup>a</sup>		Kenia	K'oreje <i>et al.</i> 2012
	1,050 <sup>b</sup> 3,200 <sup>b</sup> 3,740 <sup>c</sup> 8,000 <sup>c</sup>	España	Martin <i>et al.</i> 2012
17 <sup>b</sup>	313 <sup>b</sup>	Grecia	Stasinakis <i>et al.</i> 2012
	0,081 <sup>b</sup>	Italia	Verlicchi <i>et al.</i> 2012
67 <sup>c</sup> 71 <sup>c</sup> 280 <sup>c</sup> 527 <sup>c</sup>		España	Calderón-Preciado <i>et al.</i> 2011
73,20 <sup>b</sup> 277 <sup>a</sup>	1,430 <sup>b</sup>	España	da Silva <i>et al.</i> 2011
	15,100 <sup>a</sup>	España	Gracia-Lor <i>et al.</i> 2011
79 <sup>a</sup>		Canadá	Kleywegt <i>et al.</i> 2011
43,21 <sup>a</sup>		España	López-Serna <i>et al.</i> 2011
37.000 <sup>a</sup>		Costa Rica	Spongberg <i>et al.</i> 2011
76.000 <sup>a</sup>		Singapur	Xu <i>et al.</i> 2011
	< 10 <sup>b</sup>	EEUU	Yang <i>et al.</i> 2011a
400 <sup>a</sup>	1.500 <sup>a</sup>	Suiza	Ziylan y Ince 2011
	800 <sup>b</sup> 2.880 <sup>b</sup> 3.410 <sup>b</sup> 4.350 <sup>b</sup> 8.020 <sup>b</sup>	España	Camacho-Muñoz <i>et al.</i> 2010
2.784 <sup>a</sup>		España	Fernández <i>et al.</i> 2010

1.370 <sup>b</sup>		España	Ginebreda <i>et al.</i> 2010
2.720 <sup>a</sup>			
3.800 <sup>a</sup>		China	JinLing <i>et al.</i> 2010
5.740 <sup>a</sup>			
23.580 <sup>a</sup>			
490,40 <sup>a</sup>		España	López-Roldán <i>et al.</i> 2010
186,68 <sup>c</sup>		España	López-Serna <i>et al.</i> 2010
747 <sup>a</sup>	< 0,90 <sup>c</sup>	España	Rodríguez-Gil <i>et al.</i> 2010
	135 <sup>b</sup>	España	Rosal <i>et al.</i> 2010b
40 <sup>c</sup>		Corea	Sim <i>et al.</i> 2010
50 <sup>a</sup>		Hungría	Varga <i>et al.</i> 2010
7,10 <sup>b</sup>			
40,80 <sup>b</sup>		China	Wang <i>et al.</i> 2010
75,20 <sup>b</sup>			
	29,10 <sup>b</sup>	China	Zhao <i>et al.</i> 2010a
395 <sup>b</sup>		27 Países europeos	Loos <i>et al.</i> 2009
	16 <sup>b</sup>		
	59 <sup>b</sup>	Rumanía	Moldovan <i>et al.</i> 2009
	63 <sup>b</sup>		
	26.500 <sup>a</sup>		
	40.200 <sup>a</sup>	España	Santos <i>et al.</i> 2009
	48.200 <sup>a</sup>		
	55.000 <sup>a</sup>		
2.796 <sup>a</sup>		EEUU	Wu <i>et al.</i> 2009
	3.777 <sup>a</sup>	Taiwán	Yu-Chen-Lin <i>et al.</i> 2009
100 <sup>a</sup>		Reino Unido	Kasprzyk-Horden <i>et al.</i> 2008
65 <sup>b</sup>		España	Kuster <i>et al.</i> 2008a
2.300 <sup>a</sup>		Luxemburgo	Pailler <i>et al.</i> 2008
1.417 <sup>a</sup>		China	Peng <i>et al.</i> 2008
0,60 <sup>c</sup>		Francia	Togola y Budzinski 2008
14.500 <sup>a</sup>		Taiwán	Yu-Chen-Lin <i>et al.</i> 2008
28 <sup>b</sup>	65 <sup>b</sup>	Corea	Kim <i>et al.</i> 2007b
	6.200 <sup>b</sup>	España	Santos <i>et al.</i> 2007
	786 <sup>b</sup>	Canadá	Gagné <i>et al.</i> 2006
150 <sup>a</sup>	800 <sup>a</sup>	Croacia	Gros <i>et al.</i> 2006
	384 <sup>b</sup>	Canadá	Lishman <i>et al.</i> 2006
	1.050 <sup>a</sup>	España	Petrović <i>et al.</i> 2006
2.370 <sup>a</sup>		Reino Unido	Roberts y Thomas 2006
	250 <sup>c</sup>	EEUU	Yu <i>et al.</i> 2006
	7.110 <sup>a</sup>	Suecia	Bendz <i>et al.</i> 2005
	5,50 <sup>c</sup>	Finlandia	Lindquist <i>et al.</i> 2005
8,50 <sup>c</sup>		Finlandia	Vieno <i>et al.</i> 2005
	432 <sup>b</sup>	Reino Unido	Ashton <i>et al.</i> 2004
24 <sup>a</sup>		Alemania	Wiegel <i>et al.</i> 2004
	1,30 <sup>a</sup>	Suiza	Tixier <i>et al.</i> 2003
7,80 <sup>a</sup>		Suiza	Buser <i>et al.</i> 1999
280 <sup>a</sup>		Alemania	Zwiener y Frimmel 1999
530 <sup>a</sup>	3.400 <sup>a</sup>	Alemania	Ternes 1998
3 <sup>c</sup>		Alemania	Stumpf <i>et al.</i> 1996

<sup>a</sup>: Concentración máxima

<sup>b</sup>: Concentración media

<sup>c</sup>: Concentración medida individual

Los valores usados para el cálculo del MEC están enfatizados en negrita

PFOA

El ácido perfluorooctanoico se ha detectado en multitud de muestras de aguas (tabla 6.2). Para las aguas superficiales, las concentraciones alcanzan centenares de  $\mu\text{g/L}$ . También se han medido concentraciones de este compuesto, aunque generalmente menores, en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales de multitud de países, como España, EEUU y Singapur entre otros. En nuestro país, los valores máximos determinados han sido de  $0,12 \mu\text{g/L}$  para aguas superficiales (Pico *et al.*, 2012) y  $4,3 \mu\text{g/L}$  para efluentes de depuradora (Alzaga y Bayona, 2004).

Tabla 6.2. Concentraciones de PFOA detectadas en muestras de agua superficial y efluente de planta depuradora de aguas residuales.

PFOA			
Agua superficial (ng/L)	Efluente de depuradora (ng/L)	País	Referencia
	20.700 <sup>a</sup> 34.000 <sup>a</sup>	Grecia	Arvaniti <i>et al.</i> 2012
1 <sup>b</sup>	2 <sup>b</sup>	Francia	Boiteux <i>et al.</i> 2012
1,70 <sup>c</sup> 9,10 <sup>c</sup> 9,80 <sup>c</sup> 128 <sup>c</sup>		República Checa	Kovarova <i>et al.</i> 2012
6,50 <sup>a</sup> 68 <sup>a</sup>	1,80 <sup>a</sup> 17 <sup>a</sup>	Alemania España	Llorca <i>et al.</i> 2012
13 <sup>a</sup> 7,20 <sup>c</sup>		Canadá	Myers <i>et al.</i> 2012
120,20 <sup>a</sup>		España	Pico <i>et al.</i> 2012
85 <sup>c</sup> 120 <sup>c</sup> 125 <sup>c</sup> 145 <sup>c</sup> 150 <sup>c</sup> 280 <sup>c</sup>		China	Sun <i>et al.</i> 2012a
1,20 <sup>b</sup> 1,20 <sup>b</sup> 2,70 <sup>b</sup> 6,80 <sup>b</sup> 27 <sup>b</sup>		China	Wang <i>et al.</i> 2012a
7,80 <sup>a</sup>		China	Wang <i>et al.</i> 2012b
56,80 <sup>a</sup>		China	Zhou <i>et al.</i> 2012
27,2 <sup>c</sup> 33,4 <sup>c</sup> 55,3 <sup>c</sup> 80,8 <sup>c</sup> 223 <sup>c</sup> 668 <sup>c</sup>		China	Bao <i>et al.</i> 2011
0,65 <sup>b</sup> 3,22 <sup>b</sup> 4,10 <sup>b</sup> 4,31 <sup>b</sup> 5,46 <sup>b</sup>		EEUU	de Silva <i>et al.</i> 2011
	3,38 <sup>a</sup>	España	Gómez <i>et al.</i> 2011
9,40 <sup>c</sup>		Francia	Labadie y Chevreuil 2011
15 <sup>b</sup> 32 <sup>b</sup>		China	Li <i>et al.</i> 2011
155 <sup>a</sup>		EEUU	Lindstrom <i>et al.</i> 2011
7,9 <sup>a</sup>		Canadá	Meyer <i>et al.</i> 2011
11,20 <sup>a</sup> 16,50 <sup>a</sup> 19,20 <sup>a</sup>		China	Pan <i>et al.</i> 2011
64 <sup>a</sup>		Australia	Thompson <i>et al.</i> 2011
2,30 <sup>a</sup>		China	Wang <i>et al.</i> 2011a

10,90 <sup>b</sup> 21,70 <sup>b</sup>		China	Yang <i>et al.</i> 2011b
46 <sup>a</sup>		Rio Danubio (varios países)	Loos <i>et al.</i> 2010a
3,10 <sup>b</sup> 14,30 <sup>b</sup> 42,10 <sup>b</sup>		Alemania	Möller <i>et al.</i> 2010
68,60 <sup>a</sup>		Corea	Naile <i>et al.</i> 2010
63 <sup>a</sup>		Japón	Sakurai <i>et al.</i> 2010
< 0,08 <sup>b</sup>	61,90 <sup>a</sup>	España	Sánchez-Ávila <i>et al.</i> 2010
206 <sup>a</sup>		China	Yong <i>et al.</i> 2010
	19,30 <sup>b</sup> 25,40 <sup>b</sup> 480,30 <sup>b</sup>	Taiwán	Yu-Chen-Lin <i>et al.</i> 2010
7,83 <sup>a</sup>		Alemania	Ahrens <i>et al.</i> 2009a
9,60 <sup>a</sup>	77,60 <sup>a</sup>	Alemania	Ahrens <i>et al.</i> 2009b
5,10 <sup>a</sup> 13 <sup>a</sup> 19 <sup>a</sup>		Austria	Clara <i>et al.</i> 2009
0,20 <sup>a</sup>		China	Jin <i>et al.</i> 2009
0,70 <sup>b</sup> 4,70 <sup>b</sup>		Japón	Kunacheva <i>et al.</i> 2009
12 <sup>b</sup>		Países Europeos	Loos <i>et al.</i> 2009
< 0,09 <sup>b</sup> < 0,09 <sup>b</sup> 0,15 <sup>b</sup> 1,13 <sup>b</sup> 1,20 <sup>b</sup> 1,22 <sup>b</sup>		Brasil	Quinete <i>et al.</i> 2009
18 <sup>a</sup>		Polonia	Rostkowski <i>et al.</i> 2009
0,40 <sup>a</sup>		Japón	Takazawa <i>et al.</i> 2009
< 0,04 <sup>c</sup>		India	Yeung <i>et al.</i> 2009
	138,70 <sup>a</sup> 1.057 <sup>a</sup>	Singapur	Yu <i>et al.</i> 2009
23 <sup>a</sup>		Alemania	Becker <i>et al.</i> 2008a
	5,70 <sup>a</sup> 11 <sup>a</sup> 18 <sup>a</sup> 250 <sup>a</sup>	Alemania	Becker <i>et al.</i> 2008b
37,60 <sup>a</sup>		China	Ju <i>et al.</i> 2008
2.600 <sup>a</sup>		Japón	Lein <i>et al.</i> 2008
1.270 <sup>a</sup>		Italia	Loos <i>et al.</i> 2008
13 <sup>c</sup> 107 <sup>c</sup>		Japón	Murakami <i>et al.</i> 2008
38,10 <sup>a</sup>	54,70 <sup>a</sup>	Canadá	Volkel <i>et al.</i> 2008
15,90 <sup>a</sup>		Japón	Zushi <i>et al.</i> 2008
1,70 <sup>c</sup>		Sri Lanka	Guruge <i>et al.</i> 2007
	54,70 <sup>a</sup>	EEUU	Loganathan <i>et al.</i> 2007
200 <sup>c</sup>		Italia	McLachlan <i>et al.</i> 2007
6,84 <sup>c</sup>		EEUU	Nakayama <i>et al.</i> 2007
7,90 <sup>c</sup> 36 <sup>c</sup> 39 <sup>c</sup> 100 <sup>c</sup> 110 <sup>c</sup>		EEUU	Senthikumar <i>et al.</i> 2007
2,40 <sup>a</sup> 4,40 <sup>a</sup> 4,90 <sup>a</sup> 35 <sup>a</sup> 260 <sup>a</sup>		China	So <i>et al.</i> 2007
7,85 <sup>a</sup>		China	Zhao <i>et al.</i> 2007
5,60 <sup>a</sup>		China	Jin <i>et al.</i> 2006
6,20 <sup>a</sup>		Corea del Sur	Rostkowski <i>et al.</i> 2006
	97 <sup>a</sup>	EEUU	Schultz <i>et al.</i> 2006
	1.050 <sup>c</sup>	EEUU	Sinclair y Kannan 2006



<2,50 <sup>a</sup>			
19 <sup>a</sup>			
20 <sup>a</sup>			
22 <sup>a</sup>			
27 <sup>a</sup>			
34 <sup>a</sup>		EEUU	Sinclair <i>et al.</i> 2006
46 <sup>a</sup>			
59 <sup>a</sup>			
64 <sup>a</sup>			
173 <sup>a</sup>			
260 <sup>a</sup>			
<b>33.900<sup>a</sup></b>		Alemania	Skutlarek <i>et al.</i> 2006
8,70 <sup>c</sup>	22 <sup>c</sup>	EEUU	Boulanger <i>et al.</i> 2005
0,70 <sup>a</sup>			
3,40 <sup>a</sup>		EEUU	Simcik y Dorweiler 2005
0,062 <sup>a</sup>		Oceania	
0,142 <sup>a</sup>			
0,338 <sup>a</sup>			
1,06 <sup>a</sup>		Japón	Yamashita <i>et al.</i> 2005
11,40 <sup>a</sup>		Corea del Sur	
15,30 <sup>a</sup>		China	
	4.300 <sup>a</sup>	España	Alzaga y Bayona 2004
50 <sup>a</sup>		EEUU	Boulanger <i>et al.</i> 2004
5,50 <sup>a</sup>		China	
16 <sup>a</sup>			So <i>et al.</i> 2004
320 <sup>a</sup>		Corea del Sur	
192 <sup>a</sup>		Japón	Yamashita <i>et al.</i> 2004
21,50 <sup>a</sup>		Japón	Saito <i>et al.</i> 2003
<25 <sup>b</sup>		EEUU	Hansen <i>et al.</i> 2002
2,55 <sup>c</sup>		China	Chen <i>et al.</i> 2001
0,0947 <sup>c</sup>		India	Sarin <i>et al.</i> 1989
0,0616 <sup>c</sup>		India	UNESCO 1971

<sup>a</sup>: Concentración máxima

<sup>b</sup>: Concentración media

<sup>c</sup>: Concentración medida individual

**Los valores usados para el cálculo del MEC están enfatizados en negrita**

## Atrazina

La atrazina es uno de los herbicidas más ampliamente detectado en muestras de agua en todo el mundo, con niveles que varían estacionalmente y valores máximos en primavera y verano (Solomon *et al.*, 1996). Tanto la atrazina como sus metabolitos se han encontrado en distintas muestras de agua superficial o aguas subterráneas en un rango desde los ng/L hasta los µg/L. En España se han detectado recientemente concentraciones entre 0,01 y 15.200 µg/L en aguas superficiales y de 0,9 µg/L en efluentes de depuradoras (Kuster *et al.*, 2008b; Klamerth *et al.*, 2010). En la tabla 6.3 se presentan concentraciones de atrazina detectadas en distintos países.

Tabla 6.3. Concentraciones de atrazina detectadas en muestras de agua superficial y efluente de planta depuradora de aguas residuales.

Atrazina			
Agua superficial (ng/L)	Efluente de depuradora (ng/L)	País	Referencia
739.000 <sup>b</sup>		Canadá	Caron <i>et al.</i> 2012
14,70 <sup>b</sup> 132 <sup>a</sup>		EEUU	Reilly <i>et al.</i> 2012
15 <sup>a</sup> 50 <sup>a</sup> 8.970 <sup>a</sup>		Canadá	Xing <i>et al.</i> 2012
	70 <sup>c</sup> 110 <sup>c</sup> 190 <sup>c</sup>	Irlanda	Cahill <i>et al.</i> 2011
	900 <sup>c</sup>	España	Klamerth <i>et al.</i> 2010
2,00 <sup>b</sup> 3,00 <sup>b</sup> 4,00 <sup>a</sup> 25,00 <sup>a</sup>		Río Danubio (varios países)	Loos <i>et al.</i> 2010b
57 <sup>a</sup> 107 <sup>a</sup>	500 <sup>a</sup>	Canadá	Rahman <i>et al.</i> 2010
	0,40 <sup>b</sup>	Corea	Ryu <i>et al.</i> 2011
26,20 <sup>a</sup>	1.430 <sup>b</sup>	EEUU	Battaglin <i>et al.</i> 2009
	184 <sup>c</sup> 203 <sup>c</sup> 211 <sup>c</sup> 222 <sup>c</sup> 223 <sup>c</sup> 229 <sup>c</sup>	China	Kong <i>et al.</i> 2008
901 <sup>a</sup>		España	Kuster <i>et al.</i> 2008b
620 <sup>a</sup>		EEUU	LeBlanc <i>et al.</i> 2008
130 <sup>c</sup> 480 <sup>c</sup> 820 <sup>c</sup>		Brasil	Bortoluzzi <i>et al.</i> 2007
2.000 <sup>c</sup>		Brasil	Dutra <i>et al.</i> 2007
21 <sup>a</sup>		Grecia	Hua <i>et al.</i> 2006
148 <sup>c</sup> 149 <sup>c</sup>	86 <sup>c</sup> 130 <sup>c</sup> 133 <sup>c</sup> 177 <sup>c</sup>	Canadá	Jasim <i>et al.</i> 2006
110 <sup>a</sup> 1.100 <sup>b</sup> 84.000 <sup>b</sup>		EEUU	Jiang <i>et al.</i> 2006
	380 <sup>c</sup>	EEUU	Kolpin <i>et al.</i> 2006
112 <sup>a</sup> 1.793 <sup>a</sup>		España	Planas <i>et al.</i> 2006
260 <sup>a</sup> 277 <sup>a</sup> 502 <sup>a</sup> 614 <sup>a</sup>		China	Ta Na <i>et al.</i> 2006

400 <sup>a</sup> 1.500 <sup>a</sup> 8.250 <sup>a</sup>		EEUU	Battaglin <i>et al.</i> 2005
108 <sup>a</sup>		EEUU	Harman-Fetcho <i>et al.</i> 2005
22 <sup>a</sup> 204 <sup>a</sup> 792 <sup>a</sup> 3.870 <sup>a</sup>		Grecia	Albanis <i>et al.</i> 2004
400 <sup>a</sup>		EEUU	Pfeuffer y Rand 2004
15.200 <sup>a</sup>		España	Sánchez-Martín <i>et al.</i> 2004
170 <sup>b</sup>		EEUU	Kalkhoff <i>et al.</i> 2003
29,40 <sup>a</sup>		EEUU	Key <i>et al.</i> 2003
56 <sup>a</sup>		EEUU	Pfeuffer y Matson 2003
1.900 <sup>a</sup>	4.500 <sup>a</sup> 8.000 <sup>a</sup>	Suiza	Gereke <i>et al.</i> 2002
230 <sup>a</sup>		Grecia	Lambropoulou <i>et al.</i> 2002
1.000 <sup>a</sup> 1.230 <sup>a</sup>		Grecia	Papadopoulou-Mourkidou 2002
48 <sup>a</sup>		EEUU	Scott <i>et al.</i> 2002
170 <sup>b</sup> 230 <sup>b</sup> 310 <sup>b</sup> 420 <sup>b</sup> 590 <sup>b</sup>		EEUU	Novak <i>et al.</i> 2001
224.000 <sup>a</sup>		EEUU	Battaglin <i>et al.</i> 2000
1.250 <sup>a</sup>		EEUU	Clark y Goolsby 2000
2.750 <sup>a</sup>		EEUU	Thurman <i>et al.</i> 2000
48 <sup>a</sup> 310 <sup>a</sup>		Grecia	Albanis <i>et al.</i> 1998
195 <sup>a</sup>		Grecia	Albanis y Hela 1998
10.000 <sup>a</sup>		Rio Danubio (varios países)	Bratanova <i>et al.</i> 1998
903 <sup>a</sup>		Suiza	Bucheli <i>et al.</i> 1998
3.000 <sup>a</sup> 9.300 <sup>a</sup>		Suecia	Kreuger 1998
	17,37 <sup>a</sup>	Alemania	Nitschke y Schüssler 1998
100 <sup>a</sup>		EEUU	Schottler <i>et al.</i> 1998
30 <sup>a</sup> 40 <sup>a</sup> 56 <sup>a</sup>		Grecia	Vassalakis <i>et al.</i> 1998
40 <sup>b</sup> 50 <sup>b</sup> 60 <sup>b</sup> 180 <sup>b</sup> 540 <sup>b</sup>		Canadá	House <i>et al.</i> 1997
600 <sup>a</sup>		Grecia	Miliadis y Malatou 1997
10 <sup>a</sup> 30 <sup>a</sup> 90 <sup>a</sup>		España	Planas <i>et al.</i> 1997
1.160 <sup>a</sup>		Grecia	Angelidis <i>et al.</i> 1996
630 <sup>a</sup>		Grecia	Angelidis y Albanis 1996
10.000 <sup>a</sup> 25.600 <sup>a</sup>		EEUU	Ritter <i>et al.</i> 1996
20.000 <sup>a</sup>		EEUU	Solomon <i>et al.</i> 1996
6.000 <sup>a</sup>		Eslovenia	Zagarc-Koncan 1996
240 <sup>a</sup> 4.100 <sup>a</sup>		Grecia	Albanis <i>et al.</i> 1995a
2.160 <sup>a</sup>		Grecia	Albanis <i>et al.</i> 1995b
85 <sup>a</sup>		Grecia	Albanis y Hela 1995
3.300 <sup>a</sup> 3.600 <sup>a</sup> 18.000 <sup>a</sup>		EEUU	Larson <i>et al.</i> 1995
33 <sup>a</sup> 536 <sup>a</sup>		Canadá	Lemieux <i>et al.</i> 1995
6.500 <sup>a</sup>		EEUU	Schottler <i>et al.</i> 1994
18.900 <sup>a</sup>		EEUU	Davies <i>et al.</i> 1993

229 <sup>a</sup>		
278 <sup>a</sup>		
715 <sup>a</sup>	EEUU	Pereira y Hostettler 1993
1.450 <sup>a</sup>		
4.735 <sup>a</sup>		
1 <sup>b</sup>	Egipto	
118 <sup>a</sup>	Italia	
190 <sup>a</sup>	España	Readman <i>et al.</i> 1993
260 <sup>a</sup>	Grecia	
700 <sup>a</sup>		
1.340 <sup>a</sup>	EEUU	
33 <sup>a</sup>	Francia	Tronczynski <i>et al.</i> 1993
200 <sup>a</sup>		
3.300 <sup>a</sup>	Grecia	Albanis 1992
5.900 <sup>a</sup>		
460 <sup>a</sup>	Suiza	
1.110 <sup>a</sup>	EEUU	
1.340 <sup>a</sup>		Chapman y Stranger 1992
2.000 <sup>a</sup>		
16.000 <sup>a</sup>		
81.000 <sup>a</sup>	Canadá	
84 <sup>a</sup>		
390 <sup>a</sup>	Grecia	Albanis <i>et al.</i> 1986

<sup>a</sup>: Concentración máxima

<sup>b</sup>: Concentración media

<sup>c</sup>: Concentración medida individual

**Los valores usados para el cálculo del MEC están enfatizados en negrita**

*Triclosán*

El triclosán es uno de los productos de cuidado e higiene personal que más frecuentemente se ha detectado en los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales en países de todo el mundo, demostrando su presencia en la mayoría de ecosistemas acuáticos. Dos de los tipos de agua más estudiados son los efluentes de depuradora y las aguas superficiales (tabla 6.4). Para los primeros, las concentraciones más bajas encontradas son de  $0,16 \times 10^{-3}$  µg/L (Bendz *et al.*, 2005), mientras que las más altas son de 5,37 µg/L (Kumar *et al.*, 2010). En el caso de España, el mayor nivel detectado en agua superficial alcanza los 0,285 µg/L (Kantiani *et al.*, 2008), mientras que para los efluentes de depuradora este valor es de 2,21 µg/L (Agüera *et al.*, 2003).

Tabla 6.4. Concentraciones de triclosán detectadas en muestras de agua superficial y efluente de planta depuradora de aguas residuales.

Triclosán			
Agua superficial (ng/L)	Efluente de depuradora (ng/L)	País	Referencia
5.050 <sup>c</sup> 5.170 <sup>c</sup> 7.910 <sup>c</sup> 17.930 <sup>a</sup> <b>30.360<sup>c</sup></b>		Polonia	Baranowska y Wojciechowska 2012
197 <sup>c</sup>		China	Sun <i>et al.</i> 2012b
10 <sup>c</sup>	16 <sup>b</sup>	España	Rodil <i>et al.</i> 2012
22 <sup>b</sup> 25 <sup>b</sup> 28 <sup>b</sup> 32 <sup>b</sup> 101 <sup>b</sup>		Grecia	Stasinakis <i>et al.</i> 2012
18 <sup>c</sup> 40 <sup>c</sup> 51 <sup>c</sup> 52 <sup>c</sup> 69 <sup>c</sup> 120 <sup>c</sup> 180 <sup>c</sup> 410 <sup>c</sup>		EEUU	Venkatesan <i>et al.</i> 2012
50 <sup>a</sup>		China	Wang <i>et al.</i> 2012c
170 <sup>c</sup>		EEUU	Yu <i>et al.</i> 2012b
48 <sup>b</sup>		EEUU	Braush y Rand 2011
	5 <sup>b</sup>	Alemania	Casas-Ferreira <i>et al.</i> 2011
75 <sup>a</sup>	434 <sup>a</sup>	Australia	Kookana <i>et al.</i> 2011
4,07 <sup>b</sup> 8,95 <sup>b</sup> 3.800 <sup>a</sup> 5.160 <sup>a</sup>		India	Ramaswamy <i>et al.</i> 2011
263 <sup>a</sup>		Costa Rica	Spongberg <i>et al.</i> 2011
81,30 <sup>a</sup>		China	Wang <i>et al.</i> 2011b
100 <sup>a</sup>		China	Yu <i>et al.</i> 2011
5,3 <sup>a</sup>	<b>5.370<sup>a</sup></b>	EEUU	Kumar <i>et al.</i> 2010
9,70 <sup>b</sup>		China	Li <i>et al.</i> 2010a
40 <sup>c</sup> 46 <sup>c</sup>	140 <sup>b</sup>	Reino Unido	Price <i>et al.</i> 2010
	71 <sup>c</sup>	España	Ricart <i>et al.</i> 2010
9,20 <sup>a</sup>		EEUU	Singh <i>et al.</i> 2010

138 <sup>a</sup>	178 <sup>a</sup>	España	Villaverde-de-Sáa <i>et al.</i> 2010
13,70 <sup>b</sup> 16,80 <sup>b</sup> 71 <sup>b</sup> 242 <sup>b</sup>	241 <sup>a</sup>	China	Zhao <i>et al.</i> 2010b
	190 <sup>a</sup>	EEUU	Fair <i>et al.</i> 2009
26 <sup>b</sup> 41 <sup>b</sup> 105 <sup>b</sup>	104 <sup>b</sup>	España	Montes <i>et al.</i> 2009
107,1 <sup>c</sup>	28 <sup>c</sup>	España	Regueiro <i>et al.</i> 2009
181 <sup>b</sup>	171 <sup>b</sup>	EEUU	Yu y Chu 2009
8,10 <sup>c</sup> 14,70 <sup>c</sup> 247 <sup>c</sup>		China	Zhao <i>et al.</i> 2009
	607 <sup>a</sup>	España	Brun <i>et al.</i> 2008
117,10 <sup>a</sup>		China	Chau <i>et al.</i> 2008
	360 <sup>a</sup>	Japón	Harada <i>et al.</i> 2008
	83 <sup>c</sup> 100 <sup>c</sup> 128 <sup>c</sup> 163 <sup>c</sup> 176 <sup>c</sup> 188 <sup>c</sup> 400 <sup>c</sup> 402 <sup>c</sup> 471 <sup>c</sup> 1.283 <sup>c</sup>	España	Kantiani <i>et al.</i> 2008
0,13 <sup>c</sup> 0,18 <sup>c</sup> 0,19 <sup>c</sup>		Japón	Kawaguchi <i>et al.</i> 2008
47 <sup>c</sup>	45 <sup>c</sup>	España	Kuster <i>et al.</i> 2008b
134 <sup>a</sup>		Japón	Nishi <i>et al.</i> 2008
	1.023 <sup>a</sup>	China	Peng <i>et al.</i> 2008
	76 <sup>c</sup>	Grecia	Pothitou y Voutsas 2008
	70 <sup>a</sup>	España	Sánchez-Prado <i>et al.</i> 2008
	1,10 <sup>b</sup>	Grecia	Stasinakis <i>et al.</i> 2008
	200 <sup>a</sup>	EEUU	Coogan <i>et al.</i> 2007
68 <sup>c</sup>		Eslovenia	Cuderman y Heath 2007
	400 <sup>a</sup>	España	Gómez <i>et al.</i> 2007
2,60 <sup>b</sup> 15 <sup>b</sup>		Italia	Loos <i>et al.</i> 2007
400 <sup>a</sup>	774 <sup>a</sup>	Rumanía	Moldovan <i>et al.</i> 2007
99,3 <sup>a</sup>	151 <sup>a</sup>	China	Wu <i>et al.</i> 2007
34,9 <sup>a</sup>		EEUU	Zhang <i>et al.</i> 2007
347 <sup>a</sup>		China	Chen <i>et al.</i> 2006
1.000 <sup>c</sup>		EEUU	Haggard <i>et al.</i> 2006
	270 <sup>a</sup>	Japón	Nakada <i>et al.</i> 2006
	0,16 <sup>c</sup>	Suecia	Bendz <i>et al.</i> 2005
10 <sup>a</sup>	620 <sup>a</sup>	Alemania	Bester 2005
8 <sup>a</sup>	80 <sup>a</sup>	Canadá	Hua <i>et al.</i> 2005
3,10 <sup>a</sup> 14,90 <sup>a</sup> 20 <sup>a</sup> 29 <sup>a</sup>		EEUU	Boyd <i>et al.</i> 2004
34 <sup>c</sup>	785 <sup>c</sup>	EEUU	Morall <i>et al.</i> 2004
	180 <sup>c</sup>	Noruega	Weigel <i>et al.</i> 2004
90 <sup>a</sup>		Alemania	Wind <i>et al.</i> 2004
	2.210 <sup>a</sup>	España	Agüera <i>et al.</i> 2003
	59 <sup>a</sup>	Alemania	Bester 2003
	21 <sup>a</sup>	EEUU	Boyd <i>et al.</i> 2003

80 <sup>a</sup>	340 <sup>c</sup> 1.100 <sup>c</sup>	Reino Unido	Sabaliunas <i>et al.</i> 2003
	2.300 <sup>a</sup>	EEUU	Kolpin <i>et al.</i> 2002
3,10 <sup>a</sup> 11 <sup>c</sup> 14 <sup>a</sup>	110 <sup>c</sup> 136 <sup>a</sup> 183 <sup>c</sup> 250 <sup>c</sup> 650 <sup>c</sup>	Suiza	Lindstrom <i>et al.</i> 2002
	2.700 <sup>a</sup>	EEUU	McAvoy <i>et al.</i> 2002
	2.700 <sup>a</sup>	EEUU	Reiss <i>et al.</i> 2002
42 <sup>c</sup> 58 <sup>c</sup> 103 <sup>c</sup> 123 <sup>c</sup> 173 <sup>c</sup> 213 <sup>c</sup>	213 <sup>a</sup>	Suiza	Singer <i>et al.</i> 2002

<sup>a</sup>: Concentración máxima

<sup>b</sup>: Concentración media

<sup>c</sup>: Concentración medida individual

**Los valores usados para el cálculo del MEC están enfatizados en negra**

## Presencia en ecosistemas terrestres de microcontaminantes orgánicos: ibuprofeno y PFOA

### *Ibuprofeno*

El ibuprofeno ha sido detectado en muestras de suelos y sedimentos de ríos y lagunas de distintos países (tabla 6.5). Pero en general se han llevado a cabo muy pocos estudios para su determinación en estos medios. Hay que destacar el caso de EEUU, donde en suelos se alcanzan valores de más de 100 ng/kg (Karnjanapiboonwong *et al.*, 2011), mientras que en otros países, como México, no se superan los 0,10 ng/kg (Gibson *et al.*, 2010). En España, la máxima concentración encontrada en suelos es de 0,22 ng/kg y en sedimentos de 35,83 ng/kg (Vázquez-Roig *et al.*, 2011).

Tabla 6.5. Concentraciones de ibuprofeno detectadas en muestras de suelo y sedimento.

Ibuprofeno			
Suelo (ng/kg)	Sedimentos (ng/kg)	País	Referencia
102,50 <sup>a</sup> 111,50 <sup>a</sup> 215,50 <sup>a</sup> <b>318,50<sup>a</sup></b>		EEUU	Karnjanapiboonwong <i>et al.</i> 2011
	0,0192 <sup>a</sup> (Fluviales)	España	da Silva <i>et al.</i> 2011
0,22 <sup>b</sup>	6,73 <sup>c</sup> (Lacustres) <b>35,83<sup>a</sup> (Lacustres)</b>	España	Vázquez-Roig <i>et al.</i> 2011
0,10 <sup>a</sup>		México	Gibson <i>et al.</i> 2010
	< 4 <sup>c</sup> (Fluviales)	Hungría	Varga <i>et al.</i> 2010
	< 0,06 <sup>c</sup> (Fluviales)	Eslovenia	Antonič y Heath 2007

<sup>a</sup>: Concentración máxima

<sup>b</sup>: Concentración media

<sup>c</sup>: Concentración medida individual

Los valores usados para el cálculo del MEC están enfatizados en negrita

### *PFOA*

En la tabla 6.6 se muestran las concentraciones de PFOA en suelos y sedimentos de ríos, lagos y la costa de diferentes países, encontrándose muchos más estudios destinados a su análisis en estas matrices ambientales que en el caso del ibuprofeno. Los valores de concentración de PFOA determinados en suelos van desde 0,15 ng/kg hasta 47,50 ng/kg (Li *et al.* 2010b; Pan *et al.*, 2011), mientras que para los sedimentos este rango se define entre 0,02 ng/kg y 203 ng/kg, correspondiéndose con sedimentos procedentes de un estuario y un lecho marino respectivamente (Gómez *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010b). En el caso de España, los estudios destinados a estas determinaciones son muy escasos.



Tabla 6.6. Concentraciones de PFOA detectadas en muestras de suelo y sedimento.

PFOA			
Suelo (ng/kg)	Sedimentos (ng/kg)	País	Referencia
	6,10 <sup>a</sup> (Marinos)	Indonesia	Harino <i>et al.</i> 2012
	1,24 <sup>a</sup> (Lacustres)	España	Pico <i>et al.</i> 2012
0,764 <sup>c</sup> 1,35 <sup>c</sup> 1,84 <sup>c</sup> 2,14 <sup>c</sup> 2,18 <sup>c</sup> 2,66 <sup>c</sup> 8,40 <sup>c</sup> 15,60 <sup>c</sup> 21,50 <sup>c</sup> 31,70 <sup>c</sup>		México EEUU Japón EEUU	Strynar <i>et al.</i> 2012
0,93 <sup>a</sup>	1,50 <sup>a</sup> (Fluviales)	China	Wang <i>et al.</i> 2012b
	0,29 <sup>c</sup> (Fluviales) 0,31 <sup>c</sup> (Fluviales) 0,18 <sup>c</sup> (Fluviales) 0,63 <sup>c</sup> (Fluviales) 0,61 <sup>c</sup> (Fluviales) 48 <sup>c</sup> (Fluviales)	China	Bao <i>et al.</i> 2011
	0,02 <sup>c</sup> (de estuario)	España	Gómez <i>et al.</i> 2011
	1,80 <sup>b</sup> (Fluviales) 0,89 <sup>b</sup> (Fluviales)	China	Li <i>et al.</i> 2011
320 <sup>a</sup>		EEUU	Lindstrom <i>et al.</i> 2011
0,15 <sup>b</sup> 0,16 <sup>b</sup> 0,19 <sup>b</sup> 0,27 <sup>b</sup>	0,40 <sup>b</sup> (Fluviales) 0,25 <sup>b</sup> (Fluviales) 0,90 <sup>b</sup> (Fluviales)	China	Pan <i>et al.</i> 2011
1 <sup>a</sup> 5 <sup>c</sup> 6 <sup>c</sup> 11 <sup>c</sup> 12 <sup>c</sup>		EEUU	Sepulvado <i>et al.</i> 2011
	0,16 <sup>a</sup> (Fluviales)	Australia	Thompson <i>et al.</i> 2011
2,80 <sup>a</sup>	0,68 <sup>a</sup> (Lacustres)	China	Wang <i>et al.</i> 2011a
	0,08 <sup>b</sup> (Fluviales) 0,16 <sup>b</sup> (Lacustres)	China	Yang <i>et al.</i> 2011b
3,28 <sup>c</sup> 20,40 <sup>c</sup> 35,20 <sup>c</sup> 42,30 <sup>c</sup> 42,80 <sup>c</sup> 44,00 <sup>c</sup> 46,50 <sup>c</sup> 47,50 <sup>c</sup>	5,20 <sup>c</sup> (Fluviales) 5,67 <sup>c</sup> (Fluviales) 6,39 <sup>c</sup> (Fluviales) 9,55 <sup>c</sup> (Fluviales) 10,90 <sup>c</sup> (Fluviales) 20,80 <sup>c</sup> (Fluviales) 21,20 <sup>c</sup> (Fluviales) 28,50 <sup>c</sup> (Fluviales) <b>203<sup>c</sup></b> (Fluviales)	China	Li <i>et al.</i> 2010b
	< 1,50 <sup>c</sup> (Fluviales) < 1,50 <sup>c</sup> (Fluviales) 2 <sup>c</sup> (Fluviales)	Taiwán	Yu-Chen Lin <i>et al.</i> 2010
	0,45 <sup>a</sup> (Marinos)	Japón	Zushi <i>et al.</i> 2010
	0,13 <sup>a</sup> (Fluviales) 0,14 <sup>a</sup> (Fluviales) 0,17 <sup>a</sup> (Fluviales)	China	Bao <i>et al.</i> 2009
	0,34 <sup>a</sup> (Lacustres) 2,80 <sup>a</sup> (Fluviales) 0,82 <sup>a</sup> (Lacustres)	Austria	Clara <i>et al.</i> 2009
	< 0,10 <sup>a</sup> (Marinos) 0,50 <sup>a</sup> (Marinos) 0,80 <sup>a</sup> (Marinos)	Japón	Harino <i>et al.</i> 2009
	0,04 <sup>a</sup> (Fluviales)	Alemania	Becker <i>et al.</i> 2008a
0,315 <sup>a</sup> 0,779 <sup>a</sup> 0,811 <sup>a</sup>		EEUU	Washington <i>et al.</i> 2008
	2,30 <sup>a</sup> (Fluviales) 1,60 <sup>a</sup> (Fluviales) 2,10 <sup>a</sup> (Fluviales) 1,30 <sup>a</sup> (Fluviales) 3,90 <sup>a</sup> (Fluviales)	EEUU	Senthilkumar <i>et al.</i> 2007
	1,10 <sup>a</sup> (Marinos)	Japón	Nakata <i>et al.</i> 2006
	0,63 <sup>a</sup> (Marinos)	EEUU	Higgins <i>et al.</i> 2005
7,50 <sup>c</sup>		Bélgica	Lisec 2004

<sup>a</sup>: Concentración máxima

<sup>b</sup>: Concentración media

<sup>c</sup>: Concentración medida individual

Los valores usados para el cálculo del MEC están enfatizados en negrita

## **Objetivos**

La finalidad de este apartado del trabajo presentado es la integración de toda la información recopilada sobre efectos toxicológicos medidos para los compuestos estudiados, ejerciendo su acción de manera individual y combinada sobre los organismos representativos de ecosistemas acuáticos (el alga verde) y terrestre (la planta superior), para llevar a cabo la valoración del riesgo ecológico que conlleva la aparición de dichos contaminantes en los compartimientos mencionados.

Se pretende utilizar los parámetros toxicológicos obtenidos en este trabajo para la evaluación del riesgo mediante el cálculo de los cociente de riesgo, HQ (Hazard Quotient). La principal particularidad consiste en la utilización del método del Índice de Combinación para estimar los índices de riesgo y la comparación de los valores así estimados con los que se obtienen a partir de los modelos convencionales de aditividad y acción independiente.

## 6.2 Análisis de datos

### Determinación de los parámetros de toxicidad de la mezcla

Para los tests sobre la microalga verde *Pseudokirchneriella subcapitata*, y sobre la planta superior, el *Sorghum bicolor*, desarrollados en los capítulos 3, 4 y 5, se determinaron los valores de toxicidad de todos los compuestos y combinaciones de los mismos (ibuprofeno, PFOA, atrazina y triclosán para el organismo acuático e ibuprofeno y PFOA para el organismo terrestre). Se aplicaron los tres modelos más empleados para estos cálculos, todos para tres niveles de efecto, cuantificando las  $EC_{10}$ ,  $EC_{50}$  y  $EC_{90}$ . Primero se aplicó la ecuación de efecto medio, calculando posteriormente el Índice de Combinación (CI)-isobograma. Y a continuación se aplicaron las ecuaciones correspondientes a los modelos de Adición de Concentración y de Acción Independiente, con el software Excel de Microsoft (capítulo 1).

### Cálculo de los cocientes de riesgo

Los riesgos ecológicos potenciales para los contaminantes y para las mezclas se evaluaron mediante los cocientes de riesgo (HQ), explicado en el capítulo 1, para los tres niveles de efecto estudiados. Las concentraciones para dos compartimentos ambientales acuáticos (aguas superficiales y efluentes de depuradora), así como para dos compartimentos ambientales terrestres (suelos y sedimentos de distinta procedencia) se obtuvieron de la revisión bibliográfica presentada en el apartado 6.1. Se seleccionaron las mayores concentraciones ambientales para trabajar de una manera preventiva, contemplando siempre el peor escenario posible. Para las mezclas binarias, ternarias y cuaternaria, esta concentración de exposición se determinó sumando las individuales para cada compartimento. Finalmente, los valores de PNEC se calcularon dividiendo las  $EC_i$  entre un factor conservativo de 1.000 (Sanderson *et al.*, 2003; EMEA, 2006; Von der Ohe *et al.*, 2011).

## 6.3 Resultados y discusión

### Evaluación del riesgo ecológico en medios acuáticos y terrestres

En el presente apartado se presentan los resultados de la evaluación del riesgo potencial que supone para el medio, tanto acuático como terrestre, la presencia de distintos contaminantes orgánicos, emergentes y prioritarios, actuando de manera individual y en forma de mezclas. Para el medio acuático se han elegido cuatro contaminantes: ibuprofeno, PFOA, atrazina y triclosán, cuya toxicidad ha sido analizada sobre el organismo acuático *Pseudokirchneriella subcapitata*. Se trata de una microalga verde ampliamente empleada en investigaciones de carácter similar, sobre la cual se ha ensayado las combinaciones de los cuatro contaminantes, determinando la inhibición de su crecimiento al verse expuesta a éstos. Y para el medio terrestre se ha empleado el organismo *Sorghum bicolor*. Se trata de una planta superior, la cual se ha expuesto a dos de estos compuestos, el ibuprofeno y el PFOA. Se ha determinado el efecto de esta exposición sobre tres marcadores: la elongación de las raíces, el rendimiento fotosintético y el decaimiento fotoquímico. Para todos los ensayos se han calculado posteriormente los cocientes de riesgo para evaluar el riesgo ecológico en el medio ambiente debido a estos compuestos y sus mezclas. Con el fin de validar las interacciones que tienen lugar entre los componentes de las mezclas estudiadas, se han estimado los riesgos ecológicos para cada una de las combinaciones aplicando tres modelos: por un lado el modelo del Índice de Combinación (*CI*), y por otro los dos modelos clásicos empleados en trabajos ambientales, el modelo de Adición de Concentración (*CA*) y el modelo de Acción Independiente (*IA*), todos explicados en el capítulo 1. Posteriormente, estos tres modelos fueron comparados como indicadores de riesgo ambiental.

#### *Medios acuáticos*

En las tablas 6.7, 6.8 y 6.9 se pueden observar los valores de las concentraciones ambientales (MEC), las menores concentraciones sin efecto (PNEC) y los correspondientes cocientes de riesgo (HQ) para los tres niveles de efecto evaluados a partir de las  $EC_{10}$ ,  $EC_{50}$  y  $EC_{90}$  determinadas en el caso de las mezclas mediante tres métodos (*CI*, *CA* y *IA*).

En primer lugar se analizan los contaminantes actuando de manera individual a nivel de efecto medio. Para el ibuprofeno existe un posible riesgo en ambos compartimentos, resultado similar a los presentados por diversos autores que han calculado el riesgo ambiental para este fármaco, con un rango para los cocientes de riesgo entre 0,003 y 0,67 (Grung *et al.*, 2008; Camacho-Muñoz *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Vázquez-Roig *et al.*, 2011). El PFOA, por su parte, presenta un posible riesgo sólo en el agua superficial. Para la atrazina y el triclosán, los cocientes de riesgo alcanzaron valores superiores a 100, mayores a los encontrados en la bibliografía, en general entre 10 y 100 (Van der Brink *et al.*, 2009; Brausch and Rand, 2011; Stasinakis *et al.*, 2012). Se demuestra un alto riesgo para estos dos tóxicos, siendo los que mayores  $EC_{50}$  presentaban para el alga. El peligro que supone la aparición de los compuestos estudiados en el medio acuático, sobre todo la atrazina y el triclosán, queda patente encontrando altos valores de HQs incluso al utilizar las  $EC_{90}$ , siempre mayores a 10.

Tabla 6.7. Valores de las menores concentraciones sin efecto para la inhibición del 10% de la población del organismo *P. subcapitata* (PNEC) obtenidas mediante los métodos del Índice de Combinación (CI), Adición de Concentración (CA) y Acción Independiente (IA) y concentraciones ambientales usadas para el cálculo de los cocientes de riesgo (HQ) para ibuprofeno, PFOA, atrazina y triclosán y las combinaciones binarias, ternarias y cuaternaria. I: Ibuprofeno; P: PFOA; A: Atrazina y T: Triclosán.

	$EC_{10}$										
	Agua superficial	Efluente de depuradora	PNEC ( $\mu\text{M}$ )			HQ Agua superficial			HQ Efluente de depuradora		
	MEC ( $\mu\text{M}$ )	MEC ( $\mu\text{M}$ )	CI	CA	IA	CI	CA	IA	CI	CA	IA
IBU	0,3684	0,2666	0,0578	0,0578	0,0578	6,376	6,376	6,376	4,614	4,614	4,614
PFOA	0,1049	0,0185	0,0476	0,0476	0,0476	2,202	2,202	2,202	0,389	0,389	0,389
ATR	3,4263	0,0371	0,0000	0,0000	0,0000	196542,553	196542,553	196542,553	2127,660	2127,660	2127,660
TRI	0,0819	0,0821	0,0000	0,0000	0,0000	5086,600	5086,600	5086,600	5101,605	5101,605	5101,605
I+P	0,4503	0,3487	0,3335	0,0571	0,0495	1,350	7,886	9,088	1,046	6,107	7,039
A+P	3,5082	0,1192	0,0213	0,0137	0,0122	164,846	255,727	288,344	5,601	8,689	9,797
T+P	0,1867	0,1007	0,0382	0,0188	0,0185	4,891	9,923	10,092	2,637	5,349	5,440
I+A	3,7947	0,3037	0,2576	0,0405	0,0092	14,733	93,707	414,623	1,179	7,500	33,185
I+T	0,4733	0,2852	0,1538	0,0478	0,0112	3,077	9,902	42,211	1,854	5,966	25,434
T+A	3,5312	0,0556	0,0001	0,0000	0,0170	38726,576	210902,896	207,827	610,186	3323,041	3,275
I+A+P	3,8766	0,3858	0,2184	0,0402	0,0303	17,747	96,384	127,797	1,766	9,593	12,719
I+T+P	0,5552	0,3673	0,1968	0,0454	0,0370	2,822	12,242	14,987	1,867	8,099	9,915
T+A+P	3,6130	0,1377	0,0145	0,0426	0,0404	249,184	84,854	89,353	9,500	3,235	3,407
I+T+A	3,8996	0,3223	1,0296	0,0447	0,0334	3,788	87,314	116,671	0,313	7,216	9,642
ITAP	3,9815	0,4044	0,0266	0,0341	0,0252	149,780	116,897	157,907	15,212	11,873	16,038

Tabla 6.8. Valores de las menores concentraciones sin efecto para la inhibición del 50% de la población del organismo *P. subcapitata* (PNEC) obtenidas mediante los métodos del Índice de Combinación (CI), Adición de Concentración (CA) y Acción Independiente (IA) y concentraciones ambientales usadas para el cálculo de los cocientes de riesgo (HQ) para ibuprofeno, PFOA, atrazina y triclosán y las combinaciones binarias, ternarias y cuaternaria. I: Ibuprofeno; P: PFOA; A: Atrazina y T: Triclosán.

	EC <sub>50</sub>										
	Agua superficial	Efluente de depuradora	PNEC (µM)			HQ Agua superficial			HQ Efluente de depuradora		
	MEC (µM)	MEC (µM)	CI	CA	IA	CI	CA	IA	CI	CA	IA
IBU	0,3684	0,2666	1,1278	1,1278	1,1278	0,327	0,327	0,327	0,236	0,236	0,236
PFOA	0,1049	0,0185	0,2337	0,2337	0,2337	0,449	0,449	0,449	0,079	0,079	0,079
ATR	3,4263	0,0371	0,0002	0,0002	0,0002	17186,047	17186,047	17186,047	186,047	186,047	186,047
TRI	0,0819	0,0821	0,0001	0,0001	0,0001	655,337	655,337	655,337	657,271	657,271	657,271
I+P	0,4503	0,3487	1,3131	0,6093	0,7913	0,343	0,739	0,569	0,266	0,572	0,441
A+P	3,5082	0,1192	0,2194	0,1039	0,0960	15,991	33,777	36,539	0,543	1,148	1,242
T+P	0,1867	0,1007	0,2434	0,1155	0,1112	0,767	1,617	1,679	0,414	0,872	0,905
I+A	3,7947	0,3037	2,2496	0,6215	0,1145	1,687	6,106	33,143	0,135	0,489	2,653
I+T	0,4733	0,2852	1,1924	0,6282	0,1338	0,397	0,753	3,538	0,239	0,454	2,132
T+A	3,5312	0,0556	0,0006	0,0002	0,1445	5734,272	22196,760	24,443	90,351	349,738	0,385
I+A+P	3,8766	0,3858	1,3934	0,4348	0,4035	2,782	8,915	9,607	0,277	0,887	0,956
I+T+P	0,5552	0,3673	1,1711	0,4479	0,4882	0,474	1,240	1,137	0,314	0,820	0,752
T+A+P	3,6130	0,1377	0,2663	0,3244	0,3519	13,568	11,137	10,267	0,517	0,425	0,391
I+T+A	3,8996	0,3223	2,8575	0,5635	0,4277	1,365	6,920	9,118	0,113	0,572	0,754
ITAP	3,9815	0,4044	0,4286	0,3458	0,2948	9,289	11,515	13,507	0,943	1,169	1,372

Tabla 6.9. Valores de las menores concentraciones sin efecto para la inhibición del 90% de la población del organismo *P. subcapitata* (PNEC) obtenidas mediante los métodos del Índice de Combinación (CI), Adición de Concentración (CA) y Acción Independiente (IA) y concentraciones ambientales usadas para el cálculo de los cocientes de riesgo (HQ) para ibuprofeno, PFOA, atrazina y triclosán y las combinaciones binarias, ternarias y cuaternaria. I: Ibuprofeno; P: PFOA; A: Atrazina y T: Triclosán.

	EC <sub>90</sub>										
	Agua superficial	Efluente de depuradora	PNEC (µM)			HQ Agua superficial			HQ Efluente de depuradora		
	MEC (µM)	MEC (µM)	CI	CA	IA	CI	CA	IA	CI	CA	IA
IBU	0,3684	0,2666	22,0113	22,0113	22,0113	0,017	0,017	0,017	0,012	0,012	0,012
PFOA	0,1049	0,0185	1,1463	1,1463	1,1463	0,091	0,091	0,091	0,016	0,016	0,016
ATR	3,4263	0,0371	0,0023	0,0023	0,0023	1503,346	1503,346	1503,346	16,274	16,274	16,274
TRI	0,0819	0,0821	0,0010	0,0010	0,0010	84,475	84,475	84,475	84,724	84,724	84,724
I+P	0,4503	0,3487	5,1704	6,5005	12,6387	0,087	0,069	0,036	0,067	0,0536	0,028
A+P	3,5082	0,1192	2,2615	0,7864	0,7577	1,551	4,461	4,630	0,053	0,1516	0,157
T+P	0,1867	0,1007	1,5522	0,7083	0,6682	0,120	0,264	0,279	0,065	0,1421	0,151
I+A	3,7947	0,3037	19,6480	9,5388	1,4324	0,193	0,398	2,649	0,015	0,0318	0,212
I+T	0,4733	0,2852	9,2436	8,2558	1,5960	0,051	0,057	0,297	0,031	0,0345	0,179
T+A	3,5312	0,0556	0,0040	0,0014	1,1758	887,173	2440,466	3,003	13,979	38,4526	0,047
I+A+P	3,8766	0,3858	8,8889	4,7010	5,3674	0,436	0,825	0,722	0,043	0,0821	0,072
I+T+P	0,5552	0,3673	6,9700	4,4228	6,4333	0,080	0,126	0,086	0,053	0,0830	0,057
T+A+P	3,6130	0,1377	4,8907	2,4717	3,0627	0,739	1,462	1,180	0,028	0,0557	0,045
I+T+A	3,8996	0,3223	7,9309	7,1106	5,4724	0,492	0,548	0,713	0,041	0,0453	0,059
ITAP	3,9815	0,4044	6,9118	3,5103	3,4463	0,576	1,134	1,155	0,059	0,1152	0,117

Para el estudio de las mezclas se han representado gráficamente los datos relativos a las medias de las combinaciones binarias, ternarias y cuaternaria que contienen ibuprofeno en su composición. Se presentan los gráficos también para los tres mismos niveles de efecto y las dos masas de agua de donde se han obtenido las MECs. A bajos niveles de efecto (figura 6.1), cuantificados aquí a partir de las  $EC_{10}$ , se puede apreciar como el método *IA* resulta más conservativo independientemente del número de componentes de la mezcla, ya que le corresponden los valores más altos de los cocientes de riesgo, tanto en agua superficial como en efluente de depuradora. En los casos de los métodos *CI* y *CA*, los resultados varían notablemente según la complejidad de la mezcla, siendo sólo en la cuaternaria cuando el HQ para el método *CI* es superior al relativo al *CA*, lo que se repite en ambos escenarios acuáticos.

Los índices de riesgo ambiental de las mezclas aquí contempladas, estimados por medio de los valores de  $EC_{50}$  (figura 6.2), demuestran que todas estas combinaciones y en ambos escenarios acuáticos, suponen un riesgo ecológico, independientemente de cual sea el método aplicado para calcular el efecto de la mezcla. Para las aguas superficiales este riesgo es moderado excepto para las mezclas binarias, donde sólo se observa la posibilidad de aparición de riesgo si se aplica el *CI*. Y es con este método, en el cual se contemplan todas las posibles interacciones entre los contaminantes, con el que se obtienen los menores HQs, superando la unidad (límite a partir del cual existe riesgo, aunque moderado) en la mezclas ternarias y la cuaternaria para el agua superficial. De la misma figura 6.2 se desprende que el método *IA* es el que arroja valores más elevados de HQ, seguido de *CA*, en las dos masas de agua evaluadas. La mayor diferencia entre los procedimientos de cálculo se puede ver en las muestras binarias, coincidiendo además con los mayores índices de riesgo en efluentes de depuradora. Cuando se estudiaron las mayores fracciones de población afectadas (figura 6.3), los cocientes de riesgo estimados son notoriamente inferiores a los presentados anteriormente. Aquí el patrón es igual a los observados en los otros dos niveles de efecto, siendo siempre mayores los HQs para la *IA* y menores para el *CI*, exceptuando las mezclas ternarias, caso en el que el HQ del efluente de

depuradora calculado mediante el método *CA* supera ligeramente al relativo al método *IA*. Estos resultados evidencian la importancia de las sinergias que tienen lugar en las mezclas de los compuestos seleccionados, pudiendo estar sobreestimando los riesgos ambientales que suponen estas sustancias en el medio acuático al aplicar los métodos de *CA* y *IA*, a pesar de ser los de uso más extendido.

En general, debido a las concentraciones ambientales siempre superiores para el agua superficial, los riesgos ecológicos son mayores en este medio. Esto ocurre tanto para los tóxicos actuando individualmente como para las mezclas ensayadas.

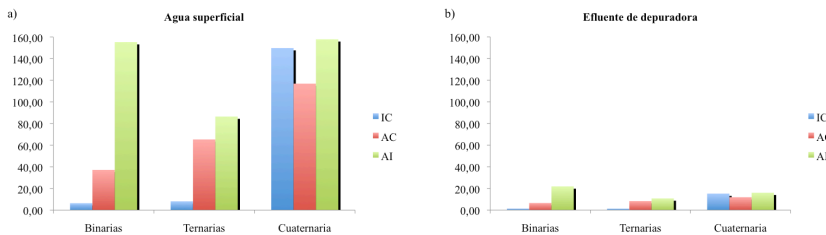


Figura 6.1. Perfiles de los cocientes de riesgo (HQ) determinados a partir de los valores de  $EC_{10}$  (calculados mediante los métodos del Índice de Combinación (*IC*), Adición de Concentración (*CA*) y Acción Independiente (*IA*)) en agua superficial (a) y efluente de depuradora (b) para las mezclas que contienen ibuprofeno.

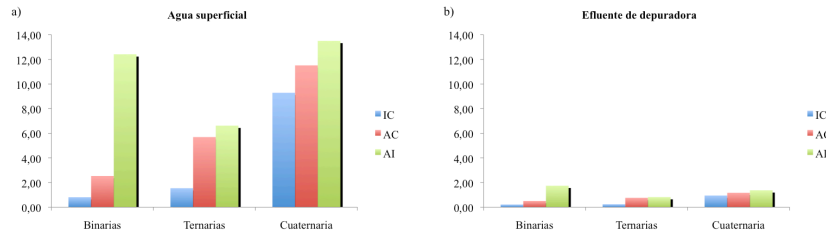


Figura 6.2. Perfiles de los cocientes de riesgo (HQ) determinados a partir de los valores de  $EC_{50}$  (calculados mediante los métodos del Índice de Combinación (*IC*), Adición de Concentración (*CA*) y Acción Independiente (*IA*)) en agua superficial (a) y efluente de depuradora (b) para las mezclas que contienen ibuprofeno.

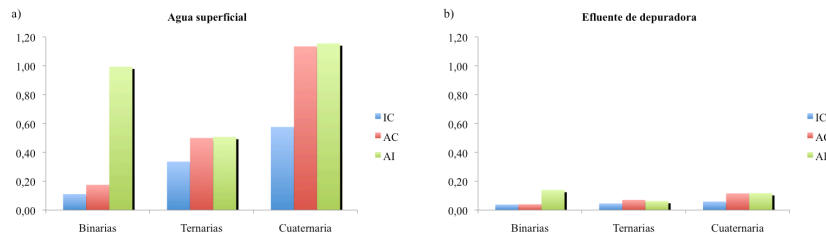


Figura 6.3. Perfiles de los cocientes de riesgo (HQ) determinados a partir de los valores de  $EC_{90}$  (calculados mediante los métodos del Índice de Combinación (*IC*), Adición de Concentración (*CA*) y Acción Independiente (*IA*)) en agua superficial (a) y efluente de depuradora (b) para las mezclas que contienen ibuprofeno.



Con lo anteriormente expuesto, queda patente la importancia de la selección del modelo para el estudio de la toxicidad de una mezcla de contaminantes. Para los menores niveles de efecto, se aprecia que para combinaciones binarias y ternarias, los modelos clásicos, *CA* y *IA*, no son capaces de interpretar desviaciones del aditivismo que nuestros tóxicos presentan, mientras que para la mezcla cuaternaria los riesgos estimados son muy parecidos. En el caso del cálculo de la  $EC_{50}$ , la diferencia entre modelos es más clara, acentuándose para la mezcla más compleja. Las sinergias que tienen lugar provocan que los índices calculados sin tenerlas en cuenta sean mayores a los estimados mediante el método *CI*. Estas diferencias son más acusadas aun para los mayores niveles de efecto, ya que los HQ correspondientes a *CA* y *IA* llegan a doblar los determinados atendiendo a estas sinergias. Se pone de manifiesto, por tanto, la relevancia de la elección del modelo que mejor estima las concentraciones tóxicas de mezclas, sobre todo cuando las sinergias pueden ser el principal comportamiento exhibido. Esta conclusión es común a las presentadas en investigaciones anteriores. Para mezclas binarias, Cedergreen *et al.* (2008) desarrollaron un estudio donde se demostró la ineficiencia de los modelos más usados, Adición de Concentración y Acción Independiente, para el cálculo de la toxicidad. Y González-Pleiter *et al.* (2013) encontraron grandes diferencias para mezclas de antibióticos multicomponente entre los tres modelos aquí empleados, destacando las sinergias existentes, predominantes en sus escenarios de contaminación.

### *Medios terrestres*

Para las toxicidades en medio terrestre se han calculado los correspondientes cocientes de riesgo, presentados en las tablas 6.10, 6.11 y 6.12, junto con las MEC y los PNEC, para los tres niveles de efecto contemplados en este estudio. Se pueden observar resultados tanto para el ibuprofeno y el PFOA como contaminantes individuales, como para la mezcla binaria, utilizando en este último caso los tres métodos, *CI*, *CA* y *IA*, al igual que para el medio acuático. De estos datos se desprende que el riesgo debido al PFOA es siempre mayor que para el ibuprofeno, con una única excepción, correspondiente al riesgo determinado tomando la elongación de las raíces

como indicador para el mayor nivel de efecto. Para las  $EC_{50}$  se ha determinado que siempre existe riesgo moderado por parte del PFOA en el suelo y el sedimento, al igual que para el ibuprofeno en el suelo atendiendo a la elongación de las raíces y la eficiencia fotosintética como marcadores. En el caso del sedimento, el fármaco sólo presenta un posible riesgo atendiendo a estos mismos marcadores. A altos niveles de efecto puede existir riesgo en el suelo debido a la presencia de ambos contaminantes, y sólo debido al PFOA en sedimentos tomando las dos medidas de fluorescencia de la clorofila como indicadores. Para las menores fracciones de población afectada, los HQ más bajos se corresponden con el fármaco, destacando el caso del sedimento, mientras que los HQ más altos se obtienen para el PFOA, destacando el caso del suelo. En la literatura no se han encontrado datos de riesgo ecológico en medio terrestre, exceptuando un estudio con ibuprofeno de Martín *et al.* (2012). Estos autores evaluaron el riesgo en un suelo acondicionado por adición de lodos de depuradora, estimando el PNEC a partir de la toxicología en medio acuático y el coeficiente de distribución sólido-agua. El valor del cociente calculado fue de 0,03, por lo que no detectaron riesgo alguno para el medicamento.

Tabla 6.10. Valores de las menores concentraciones sin efecto para la inhibición del 10% de la población del organismo *S. bicolor* (PNEC) obtenidas mediante los métodos del Índice de Combinación (CI), Adición de Concentración (CA) y de Acción Independiente (IA), determinadas sobre la inhibición de la elongación de raíces, la eficiencia fotosintética y el decaimiento fotoquímico, y concentraciones ambientales usadas para el cálculo de los cocientes de riesgo (HQ) para ibuprofeno y PFOA y la combinación de ambos.

$EC_{10}$											
Elongación de raíces											
		PNEC ( $\mu$ M)			HQ Suelo			HQ Sedimento			
	MEC ( $\mu$ M) Suelo	MEC ( $\mu$ M) Sedimento	CI	CA	IA	CI	CA	IA	CI	CA	IA
IBU	1,544	0,174	0,322	0,322	0,322	4,801	4,801	4,801	0,540	0,540	0,540
PFOA	0,773	0,490	0,014	0,014	0,014	53,345	53,345	53,345	33,841	33,841	33,841
IBU+PFOA	2,317	0,664	0,037	0,07429	0,06	62,932	31,185	37,030	18,035	8,937	10,612
Eficiencia fotosintética											
		PNEC ( $\mu$ M)			HQ Suelo			HQ Sedimento			
	MEC ( $\mu$ M) Suelo	MEC ( $\mu$ M) Sedimento	CI	CA	IA	CI	CA	IA	CI	CA	IA
IBU	1,544	0,174	0,403	0,403	0,403	3,829	3,829	3,829	0,431	0,431	0,431
PFOA	0,773	0,490	0,031	0,031	0,031	24,712	24,712	24,712	15,676	15,676	15,676
IBU+PFOA	2,317	0,664	0,054	0,18	0,23056	43,161	12,647	10,049	12,369	3,624	2,880
Decaimiento fotoquímico											
		PNEC ( $\mu$ M)			HQ Suelo			HQ Sedimento			
	MEC ( $\mu$ M) Suelo	MEC ( $\mu$ M) Sedimento	CI	CA	IA	CI	CA	IA	CI	CA	IA
IBU	1,544	0,174	0,450	0,450	0,450	3,434	3,434	3,434	0,386	0,386	0,386
PFOA	0,773	0,490	0,041	0,041	0,041	18,835	18,835	18,835	11,948	11,948	11,948
IBU+PFOA	2,317	0,664	0,082	0,22	0,27	28,323	10,483	8,453	8,117	3,004	2,422

Tabla 6.11. Valores de las menores concentraciones sin efecto para la inhibición del 50% de la población del organismo *S. bicolor* (PNEC) obtenidas mediante los métodos del Índice de Combinación (CI), Adición de Concentración (CA) y de Acción Independiente (IA), determinadas sobre la inhibición de la elongación de raíces, la eficiencia fotosintética y el decaimiento fotoquímico, y concentraciones ambientales usadas para el cálculo de los cocientes de riesgo (HQ) para ibuprofeno y PFOA y la combinación de ambos.

*EC<sub>50</sub>*

		Elongación de raíces									
		PNEC (µM)			HQ Suelo			HQ Sedimento			
	MEC (µM) Suelo	MEC (µM) Sedimento	CI	CA	IA	CI	CA	IA	CI	CA	IA
IBU	1,544	0,174	1,424	1,424	1,424	1,084	1,084	1,084	0,122	0,122	0,122
PFOA	0,773	0,490	0,340	0,340	0,340	2,275	2,275	2,275	1,443	1,443	1,443
IBU+PFOA	2,317	0,664	1,703	0,74	1,17	1,361	3,134	1,988	0,390	0,898	0,570
		Eficiencia fotosintética									
		PNEC (µM)			HQ Suelo			HQ Sedimento			
	MEC (µM) Suelo	MEC (µM) Sedimento	CI	CA	IA	CI	CA	IA	CI	CA	IA
IBU	1,544	0,174	1,368	1,368	1,368	1,129	1,129	1,129	0,127	0,127	0,127
PFOA	0,773	0,490	0,159	0,159	0,159	4,851	4,851	4,851	3,077	3,077	3,077
IBU+PFOA	2,317	0,664	0,569	0,75	1,06	4,074	3,101	2,183	1,167	0,889	0,626
		Decaimiento fotoquímico									
		PNEC (µM)			HQ Suelo			HQ Sedimento			
	MEC (µM) Suelo	MEC (µM) Sedimento	CI	CA	IA	CI	CA	IA	CI	CA	IA
IBU	1,544	0,174	2,040	2,040	2,040	0,757	0,757	0,757	0,085	0,085	0,085
PFOA	0,773	0,490	0,168	0,168	0,168	4,605	4,605	4,605	2,921	2,921	2,921
IBU+PFOA	2,317	0,664	0,701	0,95	1,18	3,304	2,446	1,969	0,947	0,701	0,564

Tabla 6.12. Valores de las menores concentraciones sin efecto para la inhibición del 90% de la población del organismo *S. bicolor* (PNEC) obtenidas mediante los métodos del Índice de Combinación (CI), Adición de Concentración (CA) y de Acción Independiente (IA), determinadas sobre la inhibición de la elongación de raíces, la eficiencia fotosintética y el decaimiento fotoquímico, y concentraciones ambientales usadas para el cálculo de los cocientes de riesgo (HQ) para ibuprofeno y PFOA y la combinación de ambos.

*EC<sub>90</sub>*

		Elongación de raíces									
		PNEC (µM)			HQ Suelo			HQ Sedimento			
	MEC (µM) Suelo	MEC (µM) Sedimento	CI	CA	IA	CI	CA	IA	CI	CA	IA
IBU	1,544	0,174	6,303	6,303	6,303	0,245	0,245	0,245	0,028	0,028	0,028
PFOA	0,773	0,490	7,962	7,962	7,962	0,097	0,097	0,097	0,062	0,062	0,062
IBU+PFOA	2,317	0,664	78,758	7,36	21,70	0,029	0,315	0,107	0,008	0,090	0,031
		Eficiencia fotosintética									
		PNEC (µM)			HQ Suelo			HQ Sedimento			
	MEC (µM) Suelo	MEC (µM) Sedimento	CI	CA	IA	CI	CA	IA	CI	CA	IA
IBU	1,544	0,174	4,639	4,639	4,639	0,333	0,333	0,333	0,037	0,037	0,037
PFOA	0,773	0,490	0,812	0,812	0,812	0,952	0,952	0,952	0,604	0,604	0,604
IBU+PFOA	2,317	0,664	6,026	3,05	4,88	0,384	0,760	0,474	0,110	0,218	0,136
		Decaimiento fotoquímico									
		PNEC (µM)			HQ Suelo			HQ Sedimento			
	MEC (µM) Suelo	MEC (µM) Sedimento	CI	CA	IA	CI	CA	IA	CI	CA	IA
IBU	1,544	0,174	9,257	9,257	9,257	0,167	0,167	0,167	0,019	0,019	0,019
PFOA	0,773	0,490	0,686	0,686	0,686	1,126	1,126	1,126	0,714	0,714	0,714
IBU+PFOA	2,317	0,664	5,869	4,05956	5,05	0,395	0,571	0,459	0,113	0,164	0,131

A partir de las concentraciones para las mezclas a los distintos niveles de efecto,  $EC_{10}$ ,  $EC_{50}$  y  $EC_{90}$ , se han estimado los índices de riesgo para cada uno de los marcadores estudiados. Para el nivel de población afectada del 10% (figura 6.4), el *CI* resulta, para los tres marcadores y los dos compartimentos ambientales, más sensible, mientras que el que menores HQ proporciona es el método *IA*. Para los cocientes de riesgo a nivel medio, determinando los valores de  $EC_{50}$ , el perfil cambia (figura 6.5). Se pueden apreciar diferencias entre los marcadores, resultando siempre el *CI* más conservador atendiendo a las medidas de fluorescencia de la clorofila, marcadores donde el método *IA* aporta los menores valores de HQ. Por el contrario, para la elongación de las raíces es el método *CA* el que da mayor riesgo ambiental y el *CI* el menor. Por último, para los más altos niveles de efecto, vuelve a cambiar la sensibilidad de los tres métodos de evaluación de toxicidad de mezclas (figura 6.6). En todos los casos destacan los altos niveles de HQ obtenidos mediante *CA*, siendo los menores los relativos al *CI*, aunque muy próximos a los obtenidos con *IA* en el caso de los sedimentos.

Con todos estos datos se demuestra la importancia de los comportamientos sinérgicos que tienen lugar al mezclar estos contaminantes, ya que el Índice de Combinación da los mayores riesgos para la afección del 50% de la población para los marcadores más sensibles.

En cuanto a los marcadores considerados (elongación de las raíces, eficiencia fotosintética y deficiencia fotoquímica), hay que destacar la diferencia entre sus sensibilidades según el nivel de efecto. Para los bajos niveles de efecto, la elongación de las raíces siempre da mayor riesgo, pero para los niveles medios se obtienen los menores cocientes con este indicador. Se trata del valor más utilizado y al que se hace referencia en la evaluación de riesgos ambientales, estimado a partir de la  $EC_{50}$  para el organismo objeto de estudio. Las determinaciones en hoja, midiendo la fluorescencia de la clorofila, resultan más conservadoras que las relativas a la inhibición de la elongación de las raíces.

Finalmente, en relación a los dos escenarios de contaminación analizados, podemos observar claramente como los riesgos ecológicos son siempre mayores en suelo, debido a que las concentraciones ambientales en él determinadas, son considerablemente superiores a las detectadas en los sedimentos.

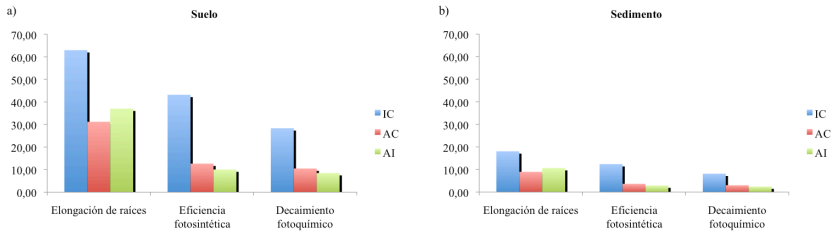


Figura 6.4. Perfiles de los cocientes de riesgo (HQ) determinados a partir de los valores de  $EC_{10}$  (calculados mediante los métodos del Índice de Combinación (IC), Adición de Concentración (CA) y Acción Independiente (AI)) en suelo (a) y sedimento (b) para la inhibición de la elongación de raíces, la eficiencia fotosintética y el decaimiento fotoquímico.

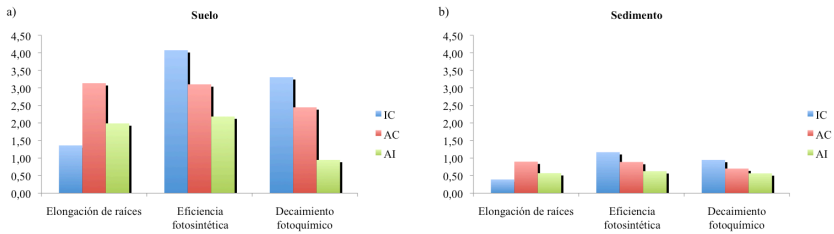


Figura 6.5. Perfiles de los cocientes de riesgo (HQ) determinados a partir de los valores de  $EC_{50}$  (calculados mediante los métodos del Índice de Combinación (IC), Adición de Concentración (CA) y Acción Independiente (AI)) en suelo (a) y sedimento (b) para la inhibición de la elongación de raíces, la eficiencia fotosintética y el decaimiento fotoquímico.

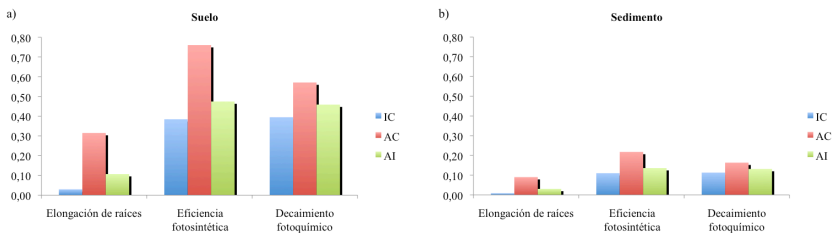


Figura 6.6. Perfiles de los cocientes de riesgo (HQ) determinados a partir de los valores de  $EC_{90}$  (calculados mediante los métodos del Índice de Combinación (IC), Adición de Concentración (CA) y Acción Independiente (AI)) en suelo (a) y sedimento (b) para la inhibición de la elongación de raíces, la eficiencia fotosintética y el decaimiento fotoquímico.

## 6.4 Conclusiones

Los riesgos ecológicos para cuatro microcontaminantes orgánicos, el ibuprofeno, el PFOA, la atrazina y el triclosán, han sido estimados para tres niveles de efecto y en sus distintas combinaciones. Se han calculado mediante los cocientes de riesgo para las cuatro sustancias en medio acuático y para el ibuprofeno y el PFOA en medio terrestre. Las concentraciones toxicológicas,  $EC_{10}$ ,  $EC_{50}$  y  $EC_{90}$ , se han obtenido aplicando tres métodos: Adición de Concentración, Acción Independiente y el Índice de Combinación.

Para el medio acuático, cuyas toxicidades se han evaluado sobre la microalga verde *P. subcapitata*, la mezcla más tóxica resultó ser la cuaternaria, con mayores valores para los índices de riesgo. Para el nivel de efecto medio, empleado en las evaluaciones de riesgo, los mayores valores se correspondieron con el método de Acción Independiente, al igual que para los mayores niveles de efecto, donde la diferencia con el Adición de Concentración fueron mucho menores. En todos los casos, los riesgos fueron mayores en el agua superficial, frente a los relacionados con el efluente de depuradora, debido a las mayores concentraciones determinadas siempre en esta matriz.

En el caso del medio terrestre, donde se estudió la toxicología sobre la planta superior *S. bicolor*, es el Índice de Combinación el que proporcionó los mayores cocientes de riesgo, atendiendo a los indicadores relacionados con la fluorescencia de la clorofila. Estos resultaron más sensibles que la elongación de las raíces a la acción de ambos compuestos, sobre todo la eficiencia fotosintética. Los riesgos estimados fueron siempre superiores para el suelo que para el sedimento, lo cual concuerda con las concentraciones ambientales detectadas en ambas matrices, superiores para el suelo. En definitiva, para organismos terrestres, afectados por ibuprofeno y PFOA, las sinergias juegan un papel decisivo en la toxicidad de mezclas, evidenciando la ineficiencia de los métodos clásicos empleados, el de Adición de Concentración y el de Acción Independiente.

## 6.5 Bibliografía

- Agüera, A., Fernández-Alba, A.R., Piedra, L., Mézcua, M., Gómez, M.J. (2003). Evaluation of triclosan and biphenylol in marine sediments and urban wastewaters by pressurized liquid extraction and solid phase extraction followed by gas chromatography mass spectrometry and liquid chromatography mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 480, 193–205.
- Ahrens, L., Felizeter, S., Ebinghaus, R. (2009a). Spatial distribution of polyfluoroalkyl compounds in seawater of the German Bight. *Chemosphere*. 76, 179–184.
- Ahrens, L., Felizeter, S., Sturm, R., Xie, Z., Ebinghaus, R. (2009b). Polyfluorinated compounds in waste water treatment plant effluents and surface waters along the River Elbe, Germany. *Marine Pollution Bulletin*. 58, 1326–1333.
- Albanis, T.A., Pomonis, P.J., Sdoukos, A.T. (1986). Seasonal fluctuations of organochlorine and triazine pesticides in the aquatic systems of Ioannina basin (Greece). *Science of the Total Environment*. 58, 243-253.
- Albanis, T.A. (1992). Herbicide losses in run-off from the agricultural area of Thessaloniki in Thermaikos Gulf. *The Science of the Total Environment*. 114, 59-71.
- Albanis, T.A., Hela, D.G. (1995). Multiresidue analysis of pesticides in various environmental water simulated samples using solid phase extraction disks followed by gas chromatography techniques with FTD and MSD. *Journal of Chromatography A*. 707, 283-292.
- Albanis, T.A., Danis, T.G., Voutsas, D., Kouimtzis, T. (1995a). Evaluation of chemical parameters in Aliakmon river Northern Greece. Part III. Pesticides. *Journal of Environmental Science and Health A*. 30, 1945-1956.
- Albanis, T.A., Danis, T.G., Hela, D.G. (1995b). Transportation of pesticides in estuaries of Louros and Arachthos rivers. *The Science of the Total Environment*. 171, 85-93.
- Albanis, T.A., Hela, D.G. (1998). Pesticide concentration in Louros river and their fluxes into marine environment. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 70, 105-120.
- Albanis, T.A., Hela, D.G., Sakellarides, T.M., Konstantinou, I.K. (1998). Monitoring of pesticide residues and their metabolites in surface and underground waters of Imathia (N. Greece) by means of solid-phase extraction disks and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 823, 59-71.
- Albanis, T.A., Hela, D.G., Lambropoulou, D.A., Sakkas, V.A. (2004). Gas chromatographic mass spectrometric methodology using solid phase microextraction for the multiresidue determination of pesticides in surface waters (N.W. Greece). *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 84, 1079-1092.
- Altenburger, R., Walter, H., Grote, M. (2004). What contributes to the combined effect of a complex mixture?. *Environmental Science and Technology*. 38, 6353-6362.
- Alzaga, R., Bayona, J.M. (2004). Determination of perfluorocarboxylic acids in aqueous matrices by ion-pair solid-phase microextraction-in-port derivatization-gas chromatography-negative ion Chemicals ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1042, 155–162.

- Angelidis, M.O., Markantonatos, P.G., Bacalis, N.Ch., Albanis, T.A. (1996). Seasonal fluctuations of nutrients and pesticides in the basin of Evrotas river, Greece. *Journal of Environmental Science and Health A*. 31, 387-410.
- Angelidis, M.O., Albanis, T.A. (1996). Pesticide residues and heavy metals in the Evros river delta, N.E. Greece. *Toxicological Environmental Chemistry*. 53, 33-44.
- Antonić, J., Heath, E. (2007). Determination of NSAIDs in river sediment samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1337-1342.
- Arvaniti, O.S., Venturi, E.I., Stasinakis, S., Thomaidis, N.S. (2012). Occurrence of different classes of perfluorinated compounds in Greek wastewater treatment plants and determination of their solid-water distribution coefficients. *Journal of Hazardous Materials*. 239–240, 24–31.
- Ashton, D., Hilton, M., Thomas, K.V. (2004). Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Science of the Total Environment*. 333, 167-184.
- Bao, J., Jin, Y.H., Liu, W., Ran, X.R., Zhang, Z.X. (2009). Perfluorinated compounds in sediments from the Daliao River system of northeast China. *Chemosphere*. 77, 652–657.
- Bao, J., Liu, W., Liu, L., Jin, Y., Dai, J., Ran, X., Zhang, Z., Tsuda, S. (2011). Perfluorinated compounds in the environment and the blood of residents living near Fluorochemical Plants in Fuxin, China. *Environmental Science and Technology*. 45, 8075-8080.
- Baranowska, I., Wojciechowska, I. (2012). Development of SPE/HPLC-DAD to determine residues of selected disinfectant agents in surface water. *Polish Journal of Environmental Studies*. 21, 269-277.
- Battaglin, W.A., Furlong, E.T., M.R., Burkhardt, Peter, C.J. (2000). Occurrence of sulfonylurea, sulfonamide, imidazolinone, and other herbicides in rivers, reservoirs and ground water in the Midwestern United States, 1998. *The Science of the Total Environment*. 248, 123-133.
- Battaglin, W.A., Kolpin, D.W., Scribner, E.A., Kuivila, K.M., Sandstrom, M.W. (2005). Glyphosate, other herbicides, and transformation products in Midwestern Streams. *Journal of the American Water Resources Association*. 41, 323-332.
- Battaglin, W.A., Rice, K.C., Focazio, M.J., Salmons, S., Barry, R.X. (2009). The occurrence of glyphosate, atrazine, and other pesticides in vernal pools and adjacent streams in Washington, DC, Maryland, Iowa, and Wyoming, 2005–2006. *Environmental Monitoring and Assessment*. 155, 281-307.
- Becker, A.M., Gerstmann, S., Frank, H. (2008a). Perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate in the sediment of the Roter Main river, Bayreuth, Germany. *Environmental Pollution*. 156, 818–820.
- Becker, A.M., Gerstmann, S., Frank, H. (2008b). Perfluorooctane surfactants in waste waters, the major source of river pollution. *Chemosphere*. 72, 115-121.
- Bendz, D., Paxéus, N.A., Ginn, T.R., Loge, F.J. (2005). Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden. *Journal of Hazardous Materials*. 122, 195–204.
- Bester, K. (2003). Triclosan in a sewage treatment process—balances and monitoring data. *Water Research*. 37, 3891–3896.



- Bester, K. (2005). Fate of triclosan and triclosan-methyl in sewage treatment plants and surface. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 49, 9–17.
- Bliss, C.I. (1939). The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of Applied Biology*. 26, 585–615.
- Boiteux, V., Dauchy, X., Rosin, C., Munoz, J. (2012). National screening study on 10 perfluorinated compounds in raw and treated tap water in France. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 63, 1–12.
- Boltes, K., Rosal, R., García-Calvo, E. (2012). Toxicity of mixtures of perfluorooctane sulphonic acid with chlorinated chemicals and lipid regulators. *Chemosphere*. 86, 24-29.
- Boltes, K., González-Naranjo, V. (2013). Ecological risk assessment of ibuprofen in aquatic environments: an approach for complex mixture of contaminants. *Ibuprofen: Clinical Pharmacology, Medical Uses and Adverse Effects*. Nova Publishers. pp. 85-158.
- Bortoluzzi, E.C., Rheinheimer, D.S., Gonçalves, C.S, Pellegrini, J.B.R., Maroneze, A.M., Kurz, M.H.S., Bacar, A.M., Zanella, R. (2007). Investigation of the occurrence of pesticide residues in rural wells and surface water following application to tobacco. *Quimica Nova*. 30, 1872-1876.
- Boulanger, B., Vargo, J., Schnoor, J.L., Hornbuckle, K.C. (2004). Detection of perfluorooctane surfactants in great lakes water. *Environmental Science and Technology*. 38, 4064–4070.
- Boulanger, B., Vargo, J.D., Schnoor, J.L., Hornbuckle, K.C. (2005). Evaluation of perfluorooctane surfactants in a wastewater treatment system and in a commercial surface protection product. *Environmental Science and Technology*. 39, 5524–5530.
- Boyd, G.R., Reemstma, H., Grimm, D.A., Mitra, S. (2003). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. *The Science of the Total Environment*. 311, 135–149.
- Boyd, G.R., Palmeri, J.M., Zhang, S., Grimm, D.A. (2004). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine disrupting chemicals (EDCs) in stormwater canals and Bayou St. John in New Orleans, Louisiana, USA. *Science of the Total Environment*. 333, 137– 148.
- Bratanova, Z., Kovacicova, J., Gopina, G. (1998). A review of existing data on the occurrence of pesticides in water of the river Danube and its tributaries. *Fresenius Environmental Bulletin*. 7, 495-501.
- Braush, J.M., Rand, G.M. (2011). A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere*. 82, 1518-1532.
- Brown, V.M. (1968). The calculation of the acute toxicity of mixture of poisons to rainbow trout. *Water Research*. 2, 723-733.
- Brun, E.M., Bonet, E., Puchades, M., Maquieira, A. (2008). Selective enzyme-linked immunosorbent assay for triclosan. Application to wastewater treatment plant effluents. *Environmental Science and Technology*. 42, 1665–1672.
- Bucheli, T., Müller, S., Heberle, S., Schwarzenbach, R.P. (1998). Occurrence and behavior of pesticides in rainwater, roof runoff, and artificial stormwater infiltration. *Environmental Science and Technology*. 32, 3457-3464.
- Buser, H.R., Poiger, T., Muller, M.D. (1999). Occurrence and environmental behavior of the

- chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewater. *Environmental and Science Technology*. 33, 2529-2535.
- Cahill, M.G., Caprioli, G., Stack, M., Vittory, S., James, K.J. (2011). Semi-automated liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS/MS) method for basic pesticides in wastewater effluents. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 400, 587-594.
- Calderón-Preciado, D., Matamoros, V., Bayona, J.M. (2011). Occurrence and potential crop uptake of emerging contaminants and related compounds in an agricultural irrigation network. *Science of the Total Environment*. 412-413, 14-19.
- Camacho-Muñoz, D., Martín, J., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E. (2010). Occurrence, temporal evolution and risk assessment of pharmaceutically active compounds in Doñana Park (Spain). *Journal of Hazardous Materials*. 183, 602-608.
- Caron, E., Lafrance, P., Auclair, J.C. (2012). Temporal evolution of atrazine and metolachlor concentrations exported in runoff and subsurface water with vegetated filter strips. *Agronomy for sustainable development*. 32, 935-943.
- Casas-Ferreira, A.M., Möder, M., Laespada, M.E. (2011). GC-MS determination of parabens, triclosán and methyltriclosán in water by in situ derivatisation and stir-bar sorptive extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 399, 945-953.
- Cedergreen, N., Christensen, A.M., Kamper, A., Kudsk, P., Mathianssen, S.K., Streibig, J.C., Sørensen, H. (2008). A review of independent action compared to concentration addition as reference models for mixtures of compounds with different molecular target sites. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 27, 1621-1632.
- Chapman, R.N., Stranger, J.M. (1992). Horticultural pesticide residues in water: a review of potencial for water contamination by pesticides used in the vegetable industry in Victoria, Melbourne, Australia: Department of Food and Agriculture. pp. 137.
- Chau, W.C., Wu, J., Cai, Z. (2008). Investigation of levels and fate of triclosan in environmental Waters from the analysis of gas chromatography coupled with ion trap mass spectrometry. *Chemosphere*. 73, S13–S17.
- Chen, Z.Y., Li, J.F., Shen, H.T., Wang, Z.H. (2001). Yangtze River of China: historical analysis of discharge variability and sediment flux. *Geomorphology*. 41, 77–91.
- Chen, B., Duan, J.C., Mai, B.X., Luo, X.J., Yang, Q.S., Sheng, G.Y., Fu, J.M. (2006). Distribution of alkylphenols in the Pearl River Delta and adjacent Northern South China Sea, China. *Chemosphere*. 63, 652-661.
- Chen, H., Li, X., Zhu, S. (2012). Occurrence and distribution of selected pharmaceuticals and personal care products in aquatic environments: a comparative study of regions in China with different urbanization levels. *Environ Science and Pollution Research*. 19, 2381–2389.
- Chou, T.C., Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose–effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*. 22, 27–55.
- Christiansen, S., Scholze, M., Dalgaard, M., Vinggaard, A.M., Axelstad, M., Kortenkamp, A., Hass, U. (2009). Synergistic disruption of external male sex organ development by a mixture of four antiandrogens. *Environmental Health Perspectives*. 117, 1839-1846.
- Clara, M., Gans, O., Weiss, S., Sanz-Escribano, D., Scharf, S., Scheffknecht, C. (2009).

- Perfluorinated alkylated substances in the aquatic environment: an Austrian case study. *Water Research*. 43, 4760–4768.
- Clark, G.M., Goolsby, D.A. (2000). Occurrence and load of selected herbicides and metabolites in the lower Mississippi River. *The Science of the Total Environment*. 248, 101-113.
- Coogan, M.A., Edziyie, R.E., La Point, T.W., Venables, B.J. (2007). Algal bioaccumulation of triclocarban, triclosan, and methyl-triclosan in a North Texas wastewater treatment plant receiving stream. *Chemosphere*. 67, 1911–1918.
- Cuderman, P., Heath, E. (2007). Determination of UV filters and antimicrobial agents in environmental water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 387, 1343-1350.
- Davies, R.K., Pederson, D.T., Blum, D.A., Carr, J.D. (1993). Atrazine in a stream-aquifer system: estimation of aquifer properties from atrazine concentration profiles. *Groundwater Monitoring and Remediation*. 13, 134-141.
- da Silva, B.F., Jelic, A., López-Serna, R., Mozeto, A.A., Petrovic, M., Barceló, D. (2011). Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain. *Chemosphere*. 85, 1331-1339.
- de Silva, A.O., Spencer, C., Scott, B.F., Backus, S., Muir, D.C.G. (2011). Detection of acyclic perfluorinated acid, perfluoroethylcyclohexane sulfonate, in the Great Lakes of North America. *Environmental Science and Technology*. 45, 8060-8066.
- Dutra, E., Monteiro, R.T., Antunes, P., dos Santos, M.A., de Camargo, P., Abakerli, R. (2007). Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do rio Corumbataí e principais afluentes. *Química Nova*. 5, 1119-1127.
- EMA (2006). European Chemical Agency. Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medicinal products for human use.
- Escher, B.I., Baumgartner, R., Koller, M., Treyer, K., Lienert, J., McArdell, C.S. (2011). Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. *Water Research*. 45, 75-92.
- Fair, P.A., Lee, H.B., Adams, J., Darling, C., Pacepavicius, G., Alae, M., Bossart, G.D., Henry, N., Muir, D. (2009). Occurrence of triclosan in plasma of wild Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and in their environment. *Environmental Pollution*. 157, 2248–2254.
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M., Grimme, L.H. (2003). Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquatic Toxicology*. 63, 43-63.
- Fernández, C., González-Doncel, M., Pro, J., Carbonell, G., Tarazona, J.V. (2010). Occurrence of pharmaceutically active compounds in surface waters of the Henares-Jarama-Tajo river system (Madrid, Spain) and a potential risk characterization. *Science of the Total Environment*. 408, 543-551.
- Gagné, F., Blaise, C., André, C. (2006). Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 64, 329-336.
- García-Galán, M.J., Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D. (2011). Occurrence of sulfonamide residues along the Ebro river basin: removal in wastewater treatment plants and environmental

- impadct assessment. *Environment International*. 37, 462-473.
- Gardner, M., Comber, S., Scrimshaw, M.D., Cartmell, E., Lester, J., Ellor, B. (2012). The significance of hazardous chemicals in wastewater treatment works effluents. *Science of the Total Environment*. 437, 363–372.
- Gerecke, A.C., Schärer, M., Singer, H.P., Müller, S., Schwarzenbach, R.P., Sägesser, M., Ochsenein, U., Popow, G. (2002). Sources of pesticides in surface waters in Switzerland: pesticide load through waste water treatment plants—current situation and reduction potencial. *Chemosphere*. 48, 307–315.
- Gibson, R., Durán-Álvarez, J.C., León, K., Chávez, A., Jiménez, B. (2010). Accumulation and leaching potential of some pharmaceuticals and potencial endocrine disruptors in soils irrigated with wastewater in the Tula Valley, Mexico. *Chemosphere*. 81, 1437-1445.
- Ginebreda, A., Muñoz, I., de Alda, M.L., Brix, R., López-Doval, J., Barceló, D. (2010). Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: Relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain). *Environment International*. 36, 153-162.
- Gómez, M.J., Martínez Bueno, M.J., Lacorte, S., Fernández-Alba, A.R., Agüera, A. (2007). Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere*. 66, 993–1002.
- Gómez, C., Vicente, J., Echavarrri-Erasun, B., Parte, C., Lacorte, S. (2011). Occurrence of perfluorinated compounds in water, sediment and mussels from the Cantabrian Sea (North Spain). *Marine Pollution Bulletin*. 62, 948-955.
- Gómez-Gutiérrez, A., Garnacho, E., Bayona, J.M., Albaigés, J. (2007). Screening ecological risk assessment of persistent organic pollutants in Mediterranean sea sediments. *Environment International*. 33, 867–876.
- González-Naranjo, V., Boltes, K. (2013). Toxicity of ibuprofeno and perfluorooctanoic acid for risk assessment of mixtures in aquatic and terrestrial environments. *International Journal of Environmental Science and Technology*. En revisión.
- González-Pleiter, M., Gonzalo, S., Rodea-Palomares, I., Leganés F., Rosal, R., Boltes, K., Marco, E., Fernández-Piñas, F. (2013). Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. *Water Research*. 47, 2050-2064.
- Gracia-Lor, E., Sancho, J.V., Hernández, F. (2011). Multi-class determination of around 50 pharmaceuticals, including 26 antibiotics, in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1218, 2264-2275.
- Gracia-Lor, E., Sancho, J.V., Serrano, R., Hernández, F. (2012). Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia. *Chemosphere*. 87, 453-462.
- Gros, M., Petrovic, M., Barceló, D. (2006). Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta*. 70, 678-690.

- Gros, M., Petrović, M., Ginebrada, A., Barceló, D. (2010). Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environment International*. 36, 15-26.
- Grung, M., Källqvist, T., Sakshaug, S., Skurtveit, S., Thomas, K.V. (2008). Environmental assessment of Norwegian priority pharmaceuticals based on the EMEA guideline. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 71, 328 – 340.
- Guruge, K.S., Taniyasu, S., Yamashita, N., Manage, P.M. (2007). Occurrence of perfluorinated acids and fluorotelomers in waters from Sri Lanka. *Marine Pollution Bulletin*. 54, 1667–1672.
- Haggard, B.E., Galloway, J.M., Green, W.R., Meyer, M.T. (2006). Pharmaceuticals and Other Organic Chemicals in Selected North-Central and Northwestern Arkansas Streams. *Journal of Environmental Quality*. 35, 1078-1087.
- Hansen, K.J., Johnson, H.O., Eldridge, J.S., Butenhoff, J.L., Dick, L.A. (2002). Quantitative characterization of trace levels of PFOS and PFOA in the Tennessee River. *Environmental Science and Technology*. 36, 1681–1685.
- Harada, A., Komori, K., Nakada, N., Kitamura, K., Suzuki, Y. (2008). Biological effects of PPCPs on aquatic lives and evaluation of river waters affected by different wastewater treatment level. *Water Science and Technology*. 58, 1541–1546.
- Harino, H., Iwasaki, N., Arai, T., Ohji, M., Miyasaki, N. (2009). Occurrence of antifouling biocides and fluorinated alkyl compounds in sediment core from deep sea: Suruga Bay, Tosa Bay, and Nankai Trough, Japan. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 57, 661-669.
- Harino, H., Arifin, Z., Rumengan, I.F.M., Arai, T., Ohji, M., Miyazaki, N. (2012). Distribution of antifouling biocides and perfluoroalkyl compounds in sediments from selected locations in Indonesian Coastal waters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 63, 13-21.
- Harman-Fetcho, J.A., Hapeman, C.J., McConnell, L.L., Potter, T.L., Rice, C.P., Sadeghi, A.M., Smith, R.D., Bialek, K., Sefton, K.A., Schaffer, B.A., Curry, R. (2005). Pesticide occurrence in selected South Florida canals and Biscayne Bay during high agricultural activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 6040-6048.
- Higgins, C.P., Field, J.A., Criddle, C.S., Luthy, R.G. (2005). Quantitative determination of perfluorochemicals in sediments and domestic sludge. *Environmental Science and Technology*. 39, 3946–3956.
- House, W.A, Leach, D., Long, J.L.A., Cranwell, P., Smith, C., Bharwaj, L., Meharg, A., Ryland, G., Orr, D.O., Wright, J. (1997). Microorganic compounds in the Humber Rivers. *The Science of the Total Environment*. 194/195, 357-371.
- Hua, W.Y., Bennett, E.R., Letcher, R.J. (2005). Triclosan in waste and surface waters from the upper Detroit River by liquid chromatography-electrospray-tandem quadrupole mass spectrometry. *Environment International*. 31, 621–630.
- Hua, W.Y., Bennett, E.R., Maio, X.S., Metcalfe, C.D., Letcher, R.J. (2006). Seasonality effects on pharmaceuticals and s-triazine herbicides in wastewater effluent and surface water from the Canadian side of the upper Detroit River. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 25, 2356–2365.

- Jasim, S.Y., Irabelli, A., Yang, P., Ahmed, S., Schweitzer, L. (2006). Presence of pharmaceuticals and pesticides in Detroit River water and the effect of ozone on removal. *Ozone: Science and Engineering*. 28, 415–423.
- Jiang, H., Adams, C., Graziano, N., Roberson, A., Maguire, M., Khiari, D. (2006). Occurrence and removal of chloro-s-triazines in Water Treatment Plants. *Environmental Science and Technology*. 40, 3609-3616.
- Jin, Y.H., Ding, M., Di, C., Wang, L., Dong, G.H., Shu, W.Q., Zhang, Y.H. (2006). Monitoring the status of PFOS and PFOA pollution in Sanxia reservoir area of the Yangtze river and surface water of Wuhan. *Ecology and Environment*. 15, 486–489.
- Jin, Y.H., Liu, W., Sato, I., Nakayama, S.F., Sasaki, K., Saito, N., Tsuda, S. (2009). PFOS and PFOA in environmental and tap water in China. *Chemosphere*. 77, 605–611.
- JinLing, C., JangHong, S., Rui, H., YingXia, L., Zhifeng, Y. (2010). Seasonal variations in the occurrence and distribution of estrogens and pharmaceuticals in the Zhangweinyun River System. *Chinese Science Bulletin*. 55, 3138-3144.
- Ju, X.D., Jin, Y.H., Sasaki, K., Saito, N. (2008). Perfluorinated surfactants in surface, subsurface water and microlayer from Dalian Coastal waters in China. *Environmental Science and Technology*. 42, 3538–3542.
- Kalkhoff, S.J., Lee, K.E., Porter, S.D., Terrio, P.J., Thurman, E.M. (2003). Herbicides and herbicide degradation products in upper Midwest agricultural streams during august base-flow conditions. *Journal of Environmental Quality*. 32, 1025-1035.
- Kantiani, L., Farré, M., Asperger, D., Rubio, F., González, S., López de Alda, M.J., Petrović, M., Shelver, W.L., Barceló, D. (2008). Triclosan and methyl-triclosan monitoring study in the northeast of Spain using a magnetic particle enzyme immunoassay and confirmatory analysis by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Hydrology*. 361, 1–9.
- Karnjanapiboonwong, A., Suski, J., Shah, A., Cai, Q., Morse, A., Anderson, T. (2011). Occurrence of PPCPs at a wastewater treatment plant and in soil and groundwater at a land application site. *Water, Air, and Soil Pollution*. 216, 257–273.
- 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.
- Kawaguchi, M., Ito, R., Honda, H., Endo, N., Okanouchi, N., Saito, K., Seto, Y., Nakazawa, H. (2008). Stir bar sorptive extraction and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry for trace analysis of triclosan in water sample. *Journal of Chromatography A*. 1206, 196–199.
- Key, P., Fulton, M., Harman-Fetcho, J., McConnell, L. (2003). Acetylcholinesterase activity in grass shrimp and aqueous pesticide levels from South Florida drainage canals. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 45, 371-377.
- Kim, Y., Choi, K., Jung, J., Park, S., Kim, P.G., Park, L. (2007a). Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. *Environment International*. 33, 370-375.
- Kim, S.D., Cho, J., Kim, I.S., Vanderford, B.J., Snyder, S.A. (2007b). Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water Research*. 41, 1013-1021.

- King, D.J., Lyne, R.L., Girling, A., Peterson, D.R., Stephenson, R., Short, D. (1996). Environmental risk assessment of petroleum substances: The hydrocarbon block method. CONCAWE 96/52. Conservation of Clean Air and Water in Europe. Bruselas, Bélgica. pp. 19.
- Klamerth, N., Malato, S., Maldonado, M.I., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R. (2010). Application of Photo-Fenton as a Tertiary Treatment of Emerging Contaminants in Municipal Wastewater. *Environmental Science and Technology*. 44, 1792-1798.
- Kleywegt, S., Pileggi, V., Yang, P., Hao, C., Zhao, X., Rocks, C., Thach, S., Cheung, P., Whitehead, B. (2011). Pharmaceuticals, hormones and bisphenol A in untreated source and finished drinking water in Ontario, Canada - Occurrence and treatment efficiency. *Science of the Total Environment*. 409, 1481-1488.
- 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, 1202-1211.
- Kolpin, D.W., Thurman, E.M., Lee, E.A., Meyer, M.T., Furlong, E.T., Glassmeyer, S.T. (2006). Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. *Science of the Total Environment*. 354, 191-197.
- Kong, X., Li, D., Cao, L., Zhang, X., Zhao, Y., Lv, Y., Zhang, J. (2008). Evaluation of municipal sewage treatment Systems for pollutant removal efficiency by measuring levels of micropollutants. *Chemosphere*. 72, 59-66.
- Kookana, R.S., Ying, G.G., Waller, N.J. (2011). Triclosan: its occurrence, fate and effects in the Australian environment. *Water Science and Technology*. 63, 598-604.
- K'oreje, K.O., de Meester, K., Wispelaere, P., Vergeynst, L., Dewulf, J., Langenhove, H.V. (2012). From multi-residue screening to target analysis of pharmaceuticals in water: Development of a new approach based on magnetic sector mass spectrometry and application in the Nairobi River basin, Kenya. *Science of the Total Environment*. 437, 153-164.
- Kortenkamp, A., Backhaus, T., Faust, M. (2009). State of the Art Report on Mixture Toxicity. Final report.
- Kovarova, J., Marsalek, P., Blahova, J., Jurcikova, J., Kasikova, B., Svobodova, Z. (2012). Occurrence of perfluoroalkyl substances in fish and water from the Svitava and Svratka Rivers, Czech Republic. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 88, 456-460.
- Kreuger, J. (1998). Pesticides in stream water within an agricultural catchment in southern Sweden, 1990-1996. *The Science of the Total Environment*. 216, 227-251.
- Kumar, K.S., Priya, S.M., Peck, A.M., Sajwan, K.S. (2010). Mass loadings of triclosan and triclocarban from four wastewater treatment plants to three rivers and landfill in Savannah, Georgia, USA. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 58, 275-285.
- Kunacheva, C., Boontanon, S.K., Fujii, S., Tanaka, S., Musirat, C., Artsalee, C., Wongwattana, T. (2009). Contamination of perfluorinated compounds (PFCs) in Chao Phraya River and Bangpakong River, Thailand. *Water Science and Technology*. 60, 975-982.

- Kuster, M., López de Alda, M.J., Hernando, M.D., Petrović, M., Martín-Alonso, J., Barceló, D. (2008a). Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *Journal of Hydrology*. 358, 112-123.
- Kuster, M., López de Alda, M.J., Barata, C., Raldúa, D., Barceló, D. (2008b). Analysis of 17 polar to semi-polar pesticides in the Ebro River delta Turing the main growing season of rice by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*. 75, 390-401.
- Labadie P., Chevreuil, M. (2011). Partitioning behaviour of perfluorinated alkyl contaminants between water, sediment and fish in the Orge River (nearby Paris, France). *Environmental Pollution*. 159, 391-397.
- Lambropoulou, D.A., Sakkas, V.A., Hela, D.G., Albanis, T.A. (2002). Application of solid phase microextraction (SPME) in monitoring of priority pesticides in Kalamas River (N.W. Greece). *Journal Chromatography A*. 963, 107-116.
- Larson, S.J., Capel, P.D., Goolsby, S.D., Zaugg, S.D., Sandstrom, M.W. (1995). Relations between pesticide use and riverine flux in the Mississippi River basin. *Chemosphere*. 31, 3305-3321.
- Leblanc, L.A., Kuivila, K.M. (2008). Occurrence, distribution and transport of pesticides into the Salton Sea Basin, California, 2001-2002. *Hydrobiologia*. 604, 151-172.
- Lehmle, H.J. (2005). Synthesis of environmentally relevant fluorinated surfactants - a review. *Chemosphere*. 58, 1471-1496.
- Lein, N.P.H. Fujii, S., Tanaka, S., Nozoe, M., Tanaka, H. (2008). Contamination of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in surface water of the Yodo River basin (Japan). *Desalination*. 226, 338-347.
- Lemieux, C., Quémerais, B., Lum, K. (1995). Seasonal patterns of atrazine loading for the St Lawrence river (Canada) and its tributaries. *Water Research*. 29, 1491-1504.
- Leung, H.W., Minh, T.B., Murphy, M.B., J.C.W., Lam, M.K., So, Martin, M., Lam, P.K.S., Richardson, B.J. (2012). Distribution, fate and risk assessment of antibiotics in sewage treatment plants in Hong Kong, South China. *Environment International*. 42, 1-9.
- Li, X., Ying, G., Su, H., Yang, X., Wang, L. (2010a). Simultaneous determination and assessment of 4-nonylphenol, bisphenol A and triclosan in tap water, bottled water and baby bottles. *Environment International*. 36, 557-562.
- Li, F., Zhang, C., Qu, Y., Chen, J., Chen, L., Liu, Y., Zhou, Q. (2010b). Quantitative characterization of short- and long-chain perfluorinated acids in solid matrices in Shanghai, China. *Science of the Total Environment*. 408, 617-623.
- Li, F., Sun, H., Hao, Z., He, N., Zhao, L., Zhang, T., Sun, T. (2011). Perfluorinated compounds in Haihe River and Dagu Drainage Canal in Tianjin, China. *Chemosphere*. 84, 265-271.
- Lindquist, N., Tuhkanen, T., Kronberg, L. (2005). Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters. *Water Research*. 39, 2219-2228.
- Lindstrom, A., Buerge, I.J., Poiger, T., Bergqvist, P., Müller, M.D., Buser, H. (2002). Occurrence and environmental behavior of the bactericide triclosan and its methyl derivative in surface waters and in wastewater. *Environmental Science and Technology*. 36, 2322-2329.



- Lindstrom, A., Stryner, M., Delinsky, A., Nakayama, S., McMillan, L., Libelo, E.L., Neill, M., Thomas, L. (2011). Application of WWTP biosolids and resulting perfluorinated compound contamination of surface and well water in Decatur, Alabama, USA. *Environmental Science and Technology*. 45, 8015-8021.
- Lisec, 2004., Descriptive site investigation 3M Belgium NV, Zwijndrecht, in Dutch. Lisec, Genk, Belgium.
- Lishman, L., Smyth, S.A., Sarafin, K., Kleywegt, S., Toito, J., Peart, T., Lee, B., Servos, M., Beland, M., Seto, P. (2006). Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogens by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada. *Science of the Total Environment*. 367, 544-558.
- Llorca, M., Farré, M., Picó, Y., Müller, J., Knepper, T.P., Barceló, D. (2012). Analysis of perfluoroalkyl substances in waters from Germany and Spain. *Science of the Total Environment*. 431, 139-150.
- Loewe, S., Muischnek, H. (1926). Über Kombinationswirkungen. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*. 114, 313-326.
- Loganathan, B.G., Sajwan, K.S., Sinclair, E., Kumar, K.S., Kannan, K. (2007). Perfluoroalkyl sulfonates and perfluorocarboxylates in two wastewater treatment facilities in Kentucky and Georgia. *Water Research*. 41, 4611-4620.
- Loos, R., Wollgast, J., Huber, T., Hanke, G. (2007). Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in Northern Italy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 387, 1469-1478.
- Loos, R., Locoro, G., Huber, T., Wollgast, J., Christoph, E.H., de Jager, A., Manfred, B., Hanke, G., Umlauf, G., Zaldivar, J.M. (2008). Analysis of perfluorooctanoate (PFOA) and other perfluorinated compounds (PFCs) in the River Po watershed in N-Italy. *Chemosphere*. 71, 306-313.
- Loos, R., Gawlik, B.M., Locoro, G., Rimaviciute, E., Contini, S., Bidoglio, G. (2009). EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environmental Pollution*. 157, 561-568.
- Loos, R., Locoro, G., Comero, S., Contini, S., Schwesig, D., Werres, F., Balsaa, P., Gans, O., Weiss, S., Blaha, L., Bolchi, M., Gawlik, B.M. (2010a). Pan-European Survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. *Water Research*. 44, 4115-4126.
- Loos, R., Locoro, G., Contini, S. (2010b). Occurrence of polar organic contaminants in the dissolved water phase of the Danube River and its major tributaries using SPE-LC-MS2 analysis. *Water Research*. 44, 2325-2335.
- López-Roldán, R., de Alda, M.L., Gros, M., Petrovic, M., Martín-Alonso, J., Barceló, D. (2010). Advanced monitoring of pharmaceuticals and estrogens in the Llobregat River basin (Spain) by liquid chromatography-triple quadrupole-tandem mass spectrometry in combination with ultra performance liquid chromatography-time of flight-mass spectrometry. *Chemosphere*. 80, 1337-1344.
- López-Serna, R., Pérez, S., Ginebreda, A., Petrovic, M., Barceló, D. (2010). Fully automated determination of 74 pharmaceuticals in environmental and waste waters by online solid

- phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Talanta*. 83, 410-424.
- López-Serna, R., Petrovic, M., Barceló, D. (2011). Development of a fast instrumental method for the analysis of pharmaceuticals in environmental and wastewaters based on ultra high performance liquid chromatography (UHPLC)-tandem mass spectrometry (MS/MS). *Chemosphere*. 85, 1390-1399.
- Martín, J., Camacho-Muñoz, D., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E. (2012). Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants: Removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal. *Journal of Hazardous Materials*. 239– 240, 40– 47.
- McAvoy, D.C., Schatowitz, B., Jacob, M., Hauk, A., Eckhoff, W.S. (2002). Measurement of triclosan in wastewater treatment Systems. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21, 1323-1329.
- McLachlan, M.S., Holmstrom, K.E., Reth, M., Berger, U. (2007). Riverine discharge of perfluorinated carboxylates from the European continent. *Environmental Science and Technology*. 41, 7260–7265.
- Metcalfe, C.D., Miao, X.S., Koenig, B.G., Struger, J. (2003). Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22, 2881–2889.
- Meyer, T., de Silva, A.O., Spencer, C., Wania, F. (2011). Fate of perfluorinated compounds and sulfonates Turing snowmelt within an urban watershed. *Environmental Science and Technology*. 45, 8113-8119.
- Miliadis, G.E., Malatou, P.Th. (1997). Monitoring of the pesticide levels in natural waters of Greece. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 59, 917-923.
- Moldovan, Z., Schmutzer, G., Tusa, F., Calin, R., Alder, A.C. (2007). An overview of pharmaceuticals and personal care products contamination along the river Somes watershed, Romania. *Journal of Environmental Monitoring*. 9, 986-993.
- Moldovan, Z., Chira, R., Alder, A.C. (2009). Environmental exposure of pharmaceuticals and musk fragrances in the Somes River before and after upgrading the municipal wastewater treatment plant Cluj-Napoca, Romania. *Environmental Science and Pollution Research*. 16 (Suppl 1), S46-S54.
- Möller, A., Ahrens, L., Surm, R., Westerveld, J., van der Wielen, F., Ebinghous, R., de Voogt, P. (2010). Distribution and sources of polyfluoroalkyl substances (PFAS) in the River Rhine watershed. *Environmental Pollution*. 158, 3243-3250.
- Montes, R., Rodríguez, I., Rubí, E., Cela, R. (2009). Dispersive liquid-liquid microextraction applied to the simultaneous derivatization and concentration of triclosan and methyltriclosan in water samples. *Journal of Chromatography A*. 1216, 205–210.
- Morall, D., McAvoy, D., Schatowitz, B., Inauen, J., Jacob, M., Hauk, A., Eckhoff, W. (2004). A field study of triclosan loss rates in river water (Cibolo Creek, TX). *Chemosphere*. 54, 653–660.
- Murakami, M., Imamura, E., Shinohara, H., Kiri, K., Muramatsu, Y., Harada, A., Takada, H. (2008). Occurrence and sources of perfluorinated surfactants in Rivers in Japan. *Environmental Science and Technology*. 42, 6566–6572.

- Myers, A.L., Crozier, P.W., Helm, P.A., Brimacombe, C., Furdui, V.I., Reiner, E.J., Burniston, D., Marvin, C.H. (2012). Fate, distribution, and contrasting temporal trends of perfluoroalkyl substances (PFASs) in Lake Ontario, Canada. *Environment International*. 44, 92–99.
- Naile, J.E., Khim, J.S., Wang, T., Chen, C., Luo, W., Kwon, B.O., Park, J., Koh, C.H., Jones, P.D., Lu, Y., Giesy, J.P. (2010). Perfluorinated compounds in water, sediment, soil and biota from estuarine and coastal areas of Korea. *Environmental Pollution*. 158, 1237–1244.
- Nakada, N., Tanishima, T., Shinohara, H., Kiri, K., Takada, H. (2006). Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. *Water Research*. 40, 3297–3303.
- Nakata, H., Kannan, K., Nasu, T., Cho, H.S., Sinclair, E., Takemura, A. (2006). Perfluorinated contaminants in sediments and aquatic organisms collected from shallow water and tidal flat areas of the Ariake Sea, Japan: environmental fate of perfluorooctane sulfonate in aquatic ecosystems. *Environmental Science and Technology*. 40, 4916–4921.
- Nakayama, S., Strynar, M.J., Helfant, L., Egeghy, P., Ye, X.B., Lindstrom, A.B. (2007). Perfluorinated compounds in the Cape Fear Drainage Basin in North Carolina. *Environmental Science and Technology*. 41, 5271–5276.
- Nishi, I., Kawakami, T., Onodera, S. (2008). Monitoring of Triclosan in the Surface Water of the Tone Canal, Japan. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 80, 163–166.
- Nitschke, L., Schüssler, W. (1998). Surface water pollution by herbicides from effluents of waste water treatment plants. *Chemosphere*. 36, 35–41.
- Novak, J.M., Watts, D.W., Stone, K.C., Johnson, M.H. (2001). Seasonal occurrence and export of five herbicides from a North Carolina coastal plain watershed. *American Society of Agricultural Engineers*. 44, 1201–1206.
- Paillet, J.Y., Guignard, C., Barnich, F., Iffly, J.F. (2008). Xenobiotic concentrations in river waters of Luxembourg Etude De Xenobiotiques Dans Les Eaux De Surface Au Luxembourg. *European Journal of Water Quality*. 39, 127–143.
- Pan, Y., Shi, Y., Wang, J., Jin, X., Cai, Y. (2011). Pilot Investigation of Perfluorinated Compounds in River Water, Sediment, Soil and Fish in Tianjin, China. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 87, 152–157.
- Papadopoulou-Mourkidou, E. (2002). Quality of surface waters of Macedonia- Thrace, Northern Greece, Quality control program, Final Report (in Greek). Ministry of Agriculture, Thessaloniki, Greece.
- Peng, X., Yua, Y., Tang, C., Tana, J., Huang, Q., Wang, Z. (2008). Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China. *Science of the Total Environment*. 397, 158–166.
- Pereira, W.E., Hostettler, F.D. (1993). Nonpoint source contamination of the Mississippi River and its tributaries by herbicides. *Environmental Science and Technology*. 27, 1542–1452.

- Petrović, M., Gros, M., Barceló, D. (2006). Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1124, 68-81.
- Pfeuffer, R., Matson, F. (2003). Pesticide Surface Water and Sediment Quality Report: October 2003 Sampling Event; The South Florida Water Management District: West Palm Beach, FL.
- Pfeuffer, R., Rand, G. (2004). South Florida ambient pesticide monitoring program. *Ecotoxicology*. 13, 195-205.
- Pico, Y., Blasco, C., Farré, M., Barceló, D. (2012). Occurrence of perfluorinated compounds in water and sediment of L'Albufera Natural Park (València, Spain). *Environmental Science and Pollution Research*. 19, 946-957.
- Planas, C., Caixach, L., Santos, F.J., Rivera, J. (1997). Occurrence of pesticides in Spanish surface waters. Analysis by high resolution gas chromatography coupled to mass spectrometry. *Chemosphere*. 11, 2393-2406.
- Planas, C., Puig, A., Rivera, J., Caixach, J. (2006). Analysis of pesticides and metabolites in Spanish surface waters by isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry with previous automated solid-phase extraction: Estimation of the uncertainty of the analytical results. *Journal of Chromatography A*. 1131, 242-252.
- Pomati, F., Orlandi, C., Clerici, M., Luciani, F., Zuccato, E. (2008). Effects and interactions in an environmentally relevant mixture of pharmaceuticals. *Toxicological Sciences*. 102, 129-137.
- Pothitou, P., Voutsas, D. (2008). Endocrine disrupting compounds in municipal and industrial wastewater treatment plants in Northern Greece. *Chemosphere*. 73, 1716-1723.
- Prevedouros, K., Cousins, I.T., Buck, R.C., Korzeniowski, S.H. (2006). Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates. *Environmental Science and Technology*. 40, 32-44.
- Price, O.R., Williams, R.J., Egmond, R.V., Wilkinson, M.J., Whelan, M.J. (2010). Predicting accurate and ecologically relevant regional scale concentrations of triclosan in rivers for use in higher-tier aquatic risk assessments. *Environment International*. 36, 521-526.
- Qu, C.S., Chen, W., Bi, J., Huang, L., Li, F.Y. (2011). Ecological risk assessment of pesticide residues in Taihu Lake wetland, China. *Ecological Modelling*. 222, 287-292.
- Quinete, N., Wu, Q., Zhang, T., Yun, S.H., Moreira, I., Kannan, K. (2009). Specific profiles of perfluorinated compounds in surface and drinking waters and accumulation in mussels, fish, and dolphins from southeastern Brazil. *Chemosphere*. 77, 863-869.
- Quinn, B., Gagné, F., Blaise, C. (2009). Evaluation of the acute chronic and teratogenic effects of a mixture of eleven pharmaceuticals on the cnidarian, *Hydra attenuate*. *Science of the Total Environment*. 407, 1072-1079.
- Rahman, M.F., Yanful, E.K., Jasim, S.Y., Bragg, L.M., Servos, M.R., Ndiongue, S., Borikar, D. (2010). Advanced oxidation treatment of drinking water: Part I. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine-disrupting compounds from Lake Huron water. *Ozone: Science & Engineering*. 32, 217-229.
- Ramaswamy, B.R., Shanmugama, G., Velu, G., Rengarajana, B., Larsson, D.G.J. (2011). GC-MS analysis and ecotoxicological risk assessment of triclosan, carbamazepine and parabens in Indian Rivers. *Journal of Hazardous Materials*. 186, 1586-1593.

- Readman, J.W., Albanis, T.A., Barcelo, D., Galassi, S., Tronczynski, J., Gabrielides, G.P. (1993). Herbicide contamination of Mediterranean estuarine Waters: Results from a MED POL pilot survey. *Marine Pollution Bulletin*. 26, 613-619.
- Regueiro, J., Beceril, E., Garcia-Jares, C., Llompart, M. (2009). Trace analysis of parabens, triclosan and related chlorophenols in water by headspace solid-phase microextraction with in situ derivatization and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1216, 693–702.
- Reilly, T.J., Smalling, K.L., Orlando, J.L., Kuivila, K.M. (2012). Occurrence of boscalid and other selected fungicides in surface water and groundwater in three targeted use areas in the United States. *Chemosphere*. 89, 228-234.
- Reiss, R., Mackay, N., Habig, C., Griffin, J. (2002). An ecological risk assessment for triclosan in lotic systems following discharge from wastewater treatment plants in the United States. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21, 2483–2492.
- Ricart, M., Guasch, H., Alberch, M., Barceló, D., Bonnineau, C., Geiszinger, A., Farré, M., Ferrer, J., Ricciardi, F., Romani, A.M., Morin, S., Proia, L., Sala, L., Sureda, D.M., Sabater, S. (2010). Triclosan persistence through wastewater treatment plants and its potential toxic effects on river biofilms. *Aquatic Toxicology*. 100, 346–353.
- Ritter, W.F., Chirside, A.E.M., Scarborough, R.W. (1996). Movement degradation of triazines, alachlor and metolachlor in sandy soils. *Journal of Environmental Science and Health part A- Toxic/Hazardous substances and Environmental Engineering*. 31, 2699-2721.
- Roberts, P.H., Thomas, K.V. (2006). The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Science of the Total Environment*. 356, 143-153.
- Rodea-Palomares, I., Petre, A.L., Boltes, K., Leganés, F., Perdígón-Melón, J.A., Rosal, R., Fernández-Piñas, F. (2010). Application of the combination index (CI)–isobologram equation to study the toxicological interactions of lipid regulators in two aquatic bioluminescent organisms. *Water Research*. 44, 427–438.
- Rodil, R., Quintana, J.B., Concha-Graña, E., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D. (2012). Emerging pollutants in sewage, surface and drinking water in Galicia (NW Spain). *Chemosphere*. 86, 1040-1049.
- Rodríguez-Gil, J.L., Catalá, M., Alonso, S.G., Maroto, R.R., Valcárcel, Y., Segura, Y., Molina, R., Melero, J.A., Martínez, F. (2010). Heterogeneous photo-Fenton treatment for the reduction of pharmaceutical contamination in Madrid rivers and ecotoxicological evaluation by a miniaturized fern spores bioassay. *Chemosphere*. 80, 381-388.
- Rosal, R., Rodea-Palomares, I., Boltes, K., Fernández-Piñas, F., Leganés, F., Petre, A. (2010a). Ecotoxicological assesment of surfactants in the aquatic environment: Combined toxicity of docusate with chlorinated pollutants. *Chemosphere*. 81, 288-293.
- Rosal, R., Rodríguez, A., Perdígón-Melón, J.A., Petre, A., García-Calvo, E., Gómez, M.J., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R. (2010b). Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Research*. 44, 578-588.
- Rostkowski, P., Yamashita, N., So, I.M.K., Taniyasu, S., Lam, P.K.S., Falandysz, J., Lee, K.T., Kim, S.K., Khim, J.S., Im, S.H., Newsted, J.L., Jones, P.D., Kannan, K., Giesy, J.P.

- (2006). Perfluorinated compounds in streams of the Shihwa industrial zone and Lake Shihwa, South Korea. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 25, 2374–2380.
- Rostkowski, P., Taniyasu, S., Yamashita, N., Falandysz, J.J., Zegrarowski, L., Chojnacka, A., Pazdro, K., Falandysz, J. (2009). Survey of perfluorinated compounds (PFCs) in surface waters of Poland. *Journal of Environmental Science and Health*. A. 44, 1518-1527.
- Ryu, J., Yoon, Y., Oh, J. (2011). Occurrence of endocrine disrupting compounds and pharmaceuticals in 11 WWTPs in Seoul, Korea. *Journal of Civil Engineering*. 15, 57-64.
- Sabaliunas, D., Webb, S.F., Hauk, A., Jacob, M., Eckhoff, W.S. (2003). Environmental fate of Triclosan in the River Aire Basin, UK. *Water Research*. 37, 3145–3154.
- Saito, N., Sasaki, K., Nakatome, K., Harada, K., Yoshinaga, T., Koizumi, A. (2003). Perfluorooctane sulfonate concentrations in surface water in Japan. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 45, 149–158.
- Sakurai, T., Serizawa, S., Isobe, T., Kobayashi, J., Kodama, K., Kume, G., Lee, J.H., Maki, H., Imaizumi, Y., Suzuki, N., Horiguchi, T., Morita, M., Shiraiishi, H. (2010). Spatial, phase, and temporal distributions of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in Tokyo Bay, Japan. *Environmental Science and Technology*. 44, 4110–4115.
- Sánchez-Avila, J., Meyer, J., Lacorte, S. (2010). Spatial distribution and sources of perfluorochemicals in the NW Mediterranean coastal waters (Catalonia, Spain). *Environmental Pollution*. 158, 2833–2840.
- Sánchez-Martin, M.J., Sanchez-Camacho, M., Lorenzo, L.F. (2004). Occurrence and temporal distribution of atrazine and alachlor residues in surface and ground waters of irrigated maize growing areas. *Agrochimica*. 48, 192-203.
- Sánchez-Prado, L., Barro, R., Garcia-Jarès, C., Llompарт, M., Lores, M., Petrakis, C., Kalogerakis, N., Mantzavinos, D., Psillakis, E. (2008). Sonochemical degradation of triclosan in water and wastewater. *Ultrasonics Sonochemistry Journal*. 15, 689–694.
- Sanderson, H., Johnson, D.J., Wilson, C.J., Brain, R.A., Solomon, K.R. (2003). Probabilistic hazard assessment of environmentally occurring pharmaceuticals toxicity to fish, daphnids and algae by ECOSAR screening. *Toxicological Letters*. 144, 383-395.
- Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E. (2007). Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater treatment plants. A case study: Seville city (Spain). *Environmental International*. 33, 596-601.
- Santos, J.L., Aparicio, I., Callejón, M., Alonso, E. (2009). Occurrence of pharmaceutically active compounds during 1-year period in wastewaters from four wastewater treatment plants in Seville (Spain). *Journal of Hazardous Materials*. 164, 1509-1516.
- Sarin, M.M., Krishnaswami, S., Dilli, K., Somayajulu, B.L.K., Moore, W.S. (1989). Major ion chemistry of the Ganga-Brahmaputra river system - weathering processes and fluxes to the Bay of Bengal. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*. 53, 997–1009.
- SCHER, SCCS, & SCENIHR (2012). Opinion on the Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures.
- Schottler, S.P., Eisenreich, S.J., Capel, P.D. (1994). Atrazine, alachlor and cyanazine in a large river system. *Environmental Science and Technology*. 28, 1079-1089.
- Scholter, S.P., Eisenreich, S.J., Hines, N.A., Warren, G. (1998). Temporal and spatial trends of atrazine, desethylatrazine, and desisopropylatrazine in the Great Lakes. Ed. American

- Chemical Society. EEUU. Triazine Herbicides: Risk Assessment. Chapter 18, pp 208-226.
- Schultz, M.M., Barofsky, D.F., Field, J.A. (2006). Quantitative determination of fluorinated alkyl substances by large-volume-injection liquid chromatography tandem mass spectrometry-characterization of municipal wastewaters. *Environmental Science and Technology*. 40, 289–295.
- Scott, G., Fulton, M., Wirth, E., Chandler, G., Key, P., Daugomah, J., Bearden, D., Chung, K., Strozier, E., DeLorenzo, M., Silvertsen, S., Dias, A., Sanders, M., Macauley, J., Goodman, L., LaCroix, G., Thayer, G., Kucklick, J. (2002). Toxicological studies in tropical ecosystems: an ecotoxicological risk assessment of pesticide runoff in South Florida estuarine ecosystems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 4400-4408.
- Senthilkumar, K., Ohi, E., Sajwan, K., Takasuga, T., Kannan, K. (2007). Perfluorinated compounds in river water, river sediment, market fish, and wildlife samples from Japan. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 79, 427–431.
- Sepulvado, J.G., Blaine, A.G., Hundal, L.S., Higgins, C.P. (2011). Occurrence and fate of perfluorochemicals in soil following the land application of municipal biosolids. *Environmental Science and Technology*. 45, 8106-8112.
- Silva, E., Rajapakse, N., Kortenkamp, A. (2002). Something from “nothing”-eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environmental Science and Technology*. 36, 1751-1756.
- Sim, W., Lee, J., Oh, J. (2010). Occurrence and fate of pharmaceuticals in wastewater treatment plants and rivers in Korea. *Environmental Pollution*. 158, 1938-1947.
- Simcik, M.F., Dorweiler, K.J. (2005). Ratio of perfluorochemical concentrations as a tracer of atmospheric deposition to surface waters. *Environmental Science and Technology*. 39, 8678–8683.
- Sinclair, E., Kannan, K. (2006). Mass loading and fate of perfluoroalkyl surfactants in wastewater treatment plants. *Environmental Science and Technology*. 1408–1414.
- Sinclair, E., Mayack, D.T., Roblee, K., Yamashita, N., Kannan, K. (2006). Occurrence of perfluoroalkyl surfactants in water, fish, and birds from New York State. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 50, 398–410.
- Singer, H., Müller, S., Tixier, C., Pillonel, L. (2002). Triclosan: occurrence and fate of a widely used biocide in the aquatic environment: field measurements in wastewater treatment plants, surface waters, and lake sediments. *Environmental Science and Technology*. 36, 4998-5004.
- Singh, S.P., Azua, A., Chaudhary, A., Khab, S., Willett, K.L., Gardinali, P.R. (2010). Occurrence and distribution of steroids, hormones and selected pharmaceuticals in South Florida coastal environments. *Ecotoxicology*. 19, 338–350.
- Skutlarek, D., Exner, M., Färber, H. (2006). Perfluorinated surfactants in surface and drinking waters. *Environmental Science and Pollution Research*. 13, 299–307.
- So, M.K., Taniyasu, S., Yamashita, N., Giesy, J.P., Zheng, J., Fang, Z., Im, S.H., Lam, P.K.S. (2004). Perfluorinated compounds in coastal waters of Hong Kong, South China, and Korea. *Environmental Science and Technology*. 38, 4056–4063.

- So, M.K., Miyake Y., Yeung W.Y., Ho Y.M., Taniyasu S., Rostkowski P., Yamashita, N., Zhou, B.S., Shi, X.J., Wang, J.P., Giesy, J.P., Yu, H., Lam, P.K.S. (2007). Perfluorinated compounds in the Pearl River and Yangtze River of China. *Chemosphere*. 68, 2085–2095.
- Solomon, K.R., Baker, D.B., Richards, R.P., Dixon, D.R., Klaine, S.J., LaPoint, T.W., Kendall, R.J., Weisskopf, C.P., Giddings, J.M., Giesy, J.P., Hall, L.W., Williams, W.M. (1996). Ecological risk assessment of atrazine in North American surface Waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 15, 31-76.
- Sponberg, A.L., Witter, J.D., Acuña, J., Vargas, J., Murillo, M., Umaña, G., Gómez, E., Pérez, G. (2011). Reconnaissance of selected PPCP compounds in Costa Rican surface Waters. *Water Research*. 45, 6709-6717.
- Sprague, J.B. (1970). Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilizing and applying bioassay results. *Water Research*. 4, 3-32.
- Stasinakis, A.S., Gatidoua, G., Mamais, D., Thomaidis, N.S., Lekkas, T.D. (2008). Occurrence and fate of endocrine disrupters in Greek sewage treatment plants. *Water Research*. 42, 1796-1804.
- Stasinakis, A.S., Memigka, S., Samaras, V.G., Farmaki, E., Thomaidis, N.S. (2012). Occurrence of endocrine disrupters and selected pharmaceuticals in Aisonas River (Greece) and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environmental Science and Pollution Research*. 19, 1574-1583.
- Strynar, M.J., Lindstrom, A.B., Nakayama, S.F., Egeghy, P.P., Helfant, L.J. (2012). Pilot scale application of a method for the analysis of perfluorinated compounds in surface soils. *Chemosphere*. 86, 252-257.
- Stumpf, M., Ternes, T.A., Haberer, K., Seel, P., Basumann, W. (1996). Determination of pharmaceuticals in sewage plants and river water. *Vom Wasser*. 86, 291-303.
- Sumpter, J.P., Johnson, A.C., Williams, R.J., Kortenkamp, A., Scholze, M. (2006). Modeling effects of mixtures of endocrine disrupting chemicals at the river catchment scale. *Environmental Science and Technology*. 40, 5478-5489.
- Sun, H., Zhang, X., Wang, L., Zhang, T., Li, F., He, N., Alder, A. (2012a). Perfluoroalkyl compounds in municipal WWTPs in Tianjin, China—concentrations, distribution and mass flow. *Environmental Science and Pollution Research*. 19, 1405–1415.
- Sun, J., Yi, C., Zhao, R., Wang, X., Jiang, W., Wang, X. (2012b). Determination of trace triclosan in environmental water by microporous bamboo-activated charcoal solid-phase extraction combined with HPLC-ESI-MS. *Journal of Separation Science*. 35, 2781-2786.
- Ta Na, Z.F., Gao, Z., Zhong, M., Sun, C. (2006). The status of pesticide residues in the drinkingwater sources in Meiliangwan Bay, Taihu Lake of China. *Environmental Monitoring and Assessment*. 123, 351–370.
- Takazawa, Y., Nishino, T., Sasaki, Y., Yamashita, H., Suzuki, N., Tanabe, K., Shibata, Y. (2009). Occurrence and distribution of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid in the Rivers of Tokyo. *Water, Air, and Soil Pollution*. 202, 57-67.
- Ternes, T.A., (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and Rivers. *Water Research*. 32, 3245-3260.



- Thompson, J., Roach, A., Eaglesham, G., Bartkow, M.E., Edge, K., Mueller, J.F. (2011). Perfluorinated alkyl acids in water, sediment and wildlife from Sydney Harbour and surroundings. *Marine Pollution Bulletin*. 62, 2869-2875.
- Thorpe, K.L., Gross-Sorokin, M., Johnson, I., Brighty, G., Tyler, C.R. (2006). An assessment of the model of concentration addition for predicting the estrogenic activity of chemicals mixtures in wastewater treatment works effluents. *Environmental Health Perspectives*. 114, 90-97.
- Thurman, E.M., Bastian, K.C., Mollhagen, T. (2000). Occurrence of cotton herbicides and insecticides in playa lakes of the High Plains of West Texas. *The Science of the Total Environment*. 248, 189-200.
- Tixier, C., Singer, H.P., Oellers, S., Müller, S.R. (2003). Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. *Environmental Science and Technology*. 37, 1061-1068.
- Togola A., Budzinski H. (2008). Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*. 1177, 150–158.
- Tronczynski, J., Munsch, C., Durand, G., Barcelo, D. (1993). Monitoring of trace-levels of herbicides and their degradation products in the river Rhone, France, by gas chromatography-mass spectrometry. *Science of the Total Environment*. 132, 327-337.
- UNESCO (1971) Discharge of selected rivers of the world. *Monthly and Annual Discharges Recorded at Various Selected Stations*, vol II, pp 194.
- Van der Brink, P.J., Crum, S.J.H., Gylstra, R., Bransen, F., Cuppen, J.G.M., Brock, T.C.M. (2009). Effects of a herbicide-insecticide mixture in freshwater microcosms: Risk assessment and ecological effect chain. *Environmental Pollution*. 157, 237–249.
- Varga, M., Dobor, J., Helenkár, A., Jurecska, L., Yao, J., Zárny, G. (2010). Investigation of acidica pharmaceuticals in river water and sediment by microwave-assisted extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Microchemical Journal*. 95, 353-358.
- Vassilakis, I., Tsiipi, D., Scoullou, M. (1998). Determination of a variety of chemical classes of pesticides in surface and ground waters by off-line solid-phase extraction, gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection, and high performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*. 823, 49-58.
- Vázquez-Roig, P., Andreu, V., Onghena, M., Blasco, C., Picó, Y. (2011). Assessment of the occurrence and distribution of pharmaceuticals in a Mediterranean wetland (L'Albufera, Valencia, Spain) by LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 400, 1287–1301.
- Venkatesana, A.K., Pyckea, B.F.G., Barberb, L.B., Leec, K.E., Haldena, R.U. (2012). Occurrence of triclosan, triclocarban, and its lesser chlorinated congeners in Minnesota freshwater sediments collected near wastewater treatment plants, *Journal of Hazardous Materials*. 229–230, 29– 35.
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Galletti, A., Petrovic M., Barceló, D. (2012). Hospital effluent: Investigación on the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *Science of the Total Environment*. 430, 109-118.
- Verro, R., Finizio, A., Otto, S., Vighi, M. (2009). Predicting pesticide environmental risk in

- intensive agricultural areas. II: Screening level risk assessment of complex mixtures in surface waters. *Environmental Science and Technology*. 43, 530-537.
- Vieno N.M., Tuhkanen T., Kronberg L. (2005). Seasonal variation in the occurrence of pharmaceuticals in effluents from a sewage treatment plant and in the recipient water. *Environment Science and Technology*. 39, 8220-8226.
- Villaverde-de-Sáa, E., González-Mariño, I., Quintana, J.B., Rodil, R., Rodriguez, I., Cela, R. (2010). In-sample acetylation-non-porous membrane-assisted liquid-liquid extraction for the determination of parabens and triclosan in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 397, 2559–2568.
- Volkel, W., Genzel-Boroviczeny, O., Demmelmair, H., Gebauer, C., Koletzko, B., Twardella, D., Raab, U., Fromme, H. (2008). Perfluorooctane sulphonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in human breast milk: results of a pilot study. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 211, 440–446.
- Von der Ohe, P.C., Dulio, V., Slobodnik, J., De Deckere, E., Kühne, R., Ebert, R.U., Ginebreda, A., De Cooman, W., Schüürmann, G., Brack, W. (2011). A new risk assessment approach for the prioritization of 500 classical and emerging organic microcontaminants as potential river basin specific pollutants under the European Water Framework Directive. *Science of the Total Environment*. 409, 2064-2077.
- Wang, C., Ying, G., Zhao, J., Yang, X., Chen, F., Tao, R., Liu, S., Zhou, L. (2010). Occurrence and risk assessment of acidic pharmaceuticals in the Yellow River, Hai River and Liao River of north China. *Science of the Total Environment*. 408, 3139-3147.
- Wang, T., Chen, C., Naile, J.E., Khim, J.S., Giesy, J.P. Lu, Y. (2011a). Perfluorinated compounds in water, sediment and soil from Guanting Reservoir, China. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 87, 74-79.
- Wang, L., Ying, G., Zhao, J., Liu, S., Yang, B., Zhou, L., Tao, R., Su, H. (2011b). Assessing estrogenic activity in surface water and sediment of the Liao River system in northeast China using combined chemical and biological Tools. *Environmental Pollution*. 159, 148-156.
- Wang, T., Khim, J.S., Chen, C., Naile, J.E., Lu, Y., Kannan, K., Park, J., Luo, W., Jiao, W., Hu, W., Giesy, J.P. (2012a). Perfluorinated compounds in surface waters from Northern China: Comparison to level of industrialization. *Environment International*. 42, 37-46.
- Wang, T., Lu, Y., Chen, C., Naile, J.E., Khim, J.S., Giesy, J.P. (2012b). Perfluorinated compounds in a coastal industrial area of Tianjin, China. *Environmental Geochemistry and Health*. 34, 301-311.
- Wang, L., Ying, G., Chen, F., Zhang, L., Zhao, J., Lai, H., Chen, Z., Tao, R. (2012c). Monitoring of selected estrogenic compounds and estrogenic activity in surface water and sediment of the Yellow River in China using combined chemicals and biological Tools. *Environmental Pollution*. 165, 241-249.
- Washington, J.W., Henderson, W.M., Ellington, J.J., Jenkins, T.M., Evans, J.J. (2008). Analysis of perfluorinated carboxylic acids in soils II: Optimization of chromatography and extraction. *Journal of Chromatography A*. 1181, 21-32.
- Weigel, S., Berger, U., Jensen, E., Kallenborn, R., Thoresen, H., Hühnerfuss, H. (2004). Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from

- Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. *Chemosphere*. 56, 583–592.
- Wiegel, S., Aulinger, A., Brockmeyer, R., Harms, H., Löffler, J., Reincke, H., Schmidt, S., Stachel, B., von Tümpling, W., Wanke, A. (2004). Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries. *Chemosphere*. 54, 107-126.
- Wind, T., Werner, U., Jacob, M., Hauk, A. (2004). Environmental concentrations of boron, LAS, EDTA, NTA and triclosan simulated with GREAT-ER in the river Itter. *Chemosphere*. 54, 1135-1144.
- Wu J.L., Lam N.P., Martens D., Kettrup A., Cai, Z. (2007). Triclosan determination in water related to wastewater treatment. *Talanta*. 72, 1650–1654.
- Wu, C., Witter, J., Spongberg, A.L., Czajkowski, K.P. (2009). Occurrence of selected pharmaceuticals in an agricultural landscape, western Lake Erie basin. *Water Research*. 43, 3407-3416.
- Xing, Z., Chow, L., Cook, A., Benoy, G., Rees, H., Ernst, B., Meng, F., Li, S., Zha, T., Murphy, C., Batchelor, S., Hewitt, L.M. (2012) Pesticide application and detection in variable agricultural intensity watersheds and their river systems in the maritime region of Canada. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 63, 471–483.
- Xing, L., Liu, H., Giesy, J.P., Zhang, X., Yu, H. (2012). Probabilistic ecological risk assessment for three chlorophenols in surface waters of China. *Journal of Environmental Sciences*. 24, 329–334.
- Xu. Y., Pal, A., Yew-Hoong, K., Reinhard, M. (2011). Occurrence of emerging organic contaminants in a tropical urban catchment in Singapore. *Chemosphere*. 83, 963-969.
- Yamashita, N., Kannan, K., Taniyasu, S., Horii, Y., Okazawa, T., Petrick, G., Gamo, T. (2004). Analysis of perfluorinated acids at parts-per-quadrillion levels in seawater using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Environmental Science and Technology*. 38, 5522–5528.
- Yamashita, N., Kannan, K., Taniyasu, S., Horii, Y., Petrick, G., Gamo, T. (2005). A global survey of perfluorinated acids in oceans. *Marine Pollution Bulletin*. 51, 658–668.
- Yang, X., Flowers, R.C., Weinberg, H.S., Singer, P.C. (2011a). Occurrence and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in an advanced wastewater reclamation plant. *Water Research*. 45, 5218-5228.
- Yang, L., Zhu, L., Liu, Z. (2011b). Occurrence and partition of perfluorinated compounds in water and sediment from Liao River and Taihu Lake, China. *Chemosphere*. 83, 806-814.
- Yeung, L.W.Y., Yamashita, N., Taniyasu, S., Lam, P.K.S., Sinha, R.K., Borole, D.V., Kannan, K. (2009). A survey of perfluorinated compounds in surface water and biota including dolphins from the Ganges River and in other waterbodies in India. *Chemosphere*. 76, 55–62.
- Yong, Q., He, J., Hanchang, S. (2010). Perfluorocarboxylic acids (PFCAs) and perfluoroalkyl sulfonates (PFASs) in surface and tap water around Lake Taihu in China. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*. 4, 301-310.
- Yu, J.T., Bouwer, E.J., Coelhan, M. (2006). Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent. *Agr. Water Management*. 86, 72-80.

- Yu, C., Chu, K. (2009). Occurrence of pharmaceuticals and personal care products along the West Prong Little Pigeon River in east Tennessee, USA. *Chemosphere*. 75, 1281–1286.
- Yu, J., Hu, J., Tanaka, S., Fujii, S. (2009). Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in sewage treatment plants. *Water Research*. 43, 2399–2408.
- Yu, Y., Huang, Q., Wang, Z., Zhang, K., Tang, C., Cui, J., Feng, J., Peng, X. (2011). Occurrence and behavior of pharmaceuticals, steroid hormones, and endocrine-disrupting personal care products in wastewater and the recipient river water of the Pearl River Delta, South China. *Journal of Environmental Monitoring*. 13, 871–878.
- Yu, Q.J., Cao, Q., Connell, D.W. (2012a). An overall risk probability-based method for quantification of synergistic and antagonistic effects in health risk assessment for mixtures: theoretical concepts. *Environmental Science and Pollution Research*. 19, 2627–2633.
- Yu, J.T., Bisceglia, K.J., Bouwer, E.J., Roberts, A.L., Coelhan, M. (2012b). Determination of pharmaceuticals and antiseptics in water by solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry: analysis via pentafluorobenzoylation and stable isotope dilution. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 403, 583–591.
- Yu-Chen-Lin, A., Yu, T., Lin, C. (2008). Pharmaceutical contamination in residential, industrial, and agricultural waste streams: Risk to aqueous environments in Taiwan. *Chemosphere*. 74, 131–141.
- Yu-Chen-Lin, A., Yu, T.H., Lateef, S.K. (2009). Removal of pharmaceuticals in secondary wastewater treatment processes in Taiwan. *Journal of Hazardous Materials*. 167, 1163–1169.
- Yu-Chen-Lin, A., Panchangan, S.C., Ciou, P.S. (2010). High levels of perfluorochemicals in Taiwan's wastewater treatment plants and downstream rivers pose great risk to local aquatic ecosystems. *Chemosphere*. 80, 1167–1174.
- Zagarc-Koncan, J. (1996). Effects of atrazine and alachlor on self-purification processes in receiving streams. *Water Science and Technology*. 33, 181–187.
- Zhang, S., Zhang, Q., Darisaw, S., Ehie, O., Wang, G. (2007). Simultaneous quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Mississippi river water, in New Orleans, Louisiana, USA. *Chemosphere*. 66, 1057–1069.
- Zhao, X., Li, J., Shi, Y., Cai, Y., Mou, S., Jiang, G. (2007). Determination of perfluorinated compounds in wastewater and river water samples by mixed hemimicelle-based solid-phase extraction before liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*. 1154, 52–59.
- Zhao, J., Ying, G., Wang, L., Yang, J., Yang, X., Yang, L., Li, X. (2009). Determination of phenolic endocrine disrupting chemicals and acidic pharmaceuticals in surface water of the Pearl Rivers in South China by gas chromatography–negative chemicals ionization–mass spectrometry. *Science of the Total Environment*. 407, 962–974.
- Zhao, J.L., Ying, G., Liu, Y., Chen, F., Yang, J., Wang, L., Yang, X.B., Stauber, J.L., Warne, M.S. (2010a). Occurrence and a screening-level risk assessment of human pharmaceuticals in the pearl river system, south china. *Environmental Toxicology and*

Chemistry. 29, 1377-1384.

- Zhao, J., Ying, G., Liu, Y., Chen, F., Yang, J., Wang, L. (2010b). Occurrence and risks of triclosan and triclocarban in the Pearl River system, South China: From source to the receiving environment. *Journal of Hazardous Materials*. 179, 215–222.
- Zhou, Z., Shi, Y., Li, W., Xu, L., Cai, Y. (2012). Perfluorinated compounds in surface water and organisms from Baiyangdian Lake in North China: Source Profiles, bioaccumulation and potential risk. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 89, 519-524.
- Ziylan, A., Ince, N.H. (2011). The occurrence and fate of anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in sewage and fresh water: Treatability by convencional and non-conventional processes. *Journal of Hazardous Materials*. 187, 24-36.
- Zushi, Y., Takeda, T., Masunaga, S. (2008). Existence of nonpoint source of perfluorinated compounds and their loads in the Tsurumi River basin, Japan. *Chemosphere*. 71, 1566–1573.
- Zushi, Y., Tamada, M., Kanai, Y., Masunaga, S. (2010). Time trends of perfluorinated compounds from the sediment core of Tokyo Bay, Japan (1950s-2004). *Environmental Pollution*. 158, 756–763.
- Zwiener, C., Frimmel, F.H. (1999). Oxidative treatment of pharmaceuticals in water. *Water Research*. 34, 1881-1885.



## **Capítulo 7**

### Conclusiones generales





## CAPÍTULO 7

### Conclusiones generales

En esta Tesis Doctoral se ha analizado la movilidad del ibuprofeno en suelos y agua. En el caso del suelo se ha estudiado la disponibilidad del mismo en la planta superior *Sorghum bicolor*, y en el caso del agua el estudio se ha realizado con la microalga verde *Pseudokirchneriella subcapitata*. A continuación se han desarrollado una serie de experimentos para la determinación de la toxicidad del compuesto, actuando de manera individual y combinada con otros contaminantes orgánicos, en ambos medios. Y finalmente se han calculado los riesgos ambientales asociados a su presencia en el medio ambiente y la sinergias existentes entre los distintos compuestos. De esta investigación se han obtenido las siguientes conclusiones:

- El ibuprofeno presenta una gran movilidad en el suelo, por lo que al menos se encontrará en dos compartimentos ambientales: el acuático y el terrestre.
- No existen estudios de toxicidad en suelos con plantas superiores, las cuales actúan como buenos bioindicadores para este medio.
- La sinergia juega un papel importante en la ecotoxicología de mezclas que contienen ibuprofeno.
- Los efectos de las mezclas de contaminantes orgánicos en el suelo son fácilmente observables con los ensayos en planta realizados.
- El perfil toxicológico de la planta superior varía en función de la respuesta medida y su estado de desarrollo, siendo mayores los efectos sobre los procesos fotosintéticos en hoja ya desarrollada que sobre la elongación de las raíces en los primeros días de crecimiento.
- La determinación de la inhibición que el ibuprofeno y sus combinaciones produce sobre el proceso fotosintético de la planta superior es una herramienta sencilla, económica y precisa para la determinación de toxicidad en medio terrestre.

- Los modelos más usados en toxicología de mezclas, que son el de Adición de Concentración y el de Acción Independiente, no son idóneas cuando aparecen sinergias.
- El modelo del Índice de Combinación (no empleado en otras experiencias de toxicidad en suelos y sólo utilizado en algunas experiencias de toxicidad en medio acuático), describe con gran precisión los comportamientos sinérgicos.
- El método que mejor funciona en el cálculo del riesgo ambiental en medios acuáticos y terrestres es el Índice de Combinación.

EFFECTOS SINÉRGICOS EN EL  
ANÁLISIS ECOTOXICOLÓGICO DEL  
IBUPROFENO. APROXIMACIÓN  
CUANTITATIVA DEL RIESGO  
AMBIENTAL

Victor González Naranjo

2013





EFFECTOS SINÉRGICOS EN EL  
ANÁLISIS ECOTOXICOLÓGICO DEL  
IBUPROFENO. APROXIMACIÓN  
CUANTITATIVA DEL RIESGO  
AMBIENTAL

Victor González Naranjo

2013