



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

MÁSTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL

**DETERMINACIÓN DE ECOTOXICIDAD DE TRES FÁRMACOS DE AMPLIO USO
MEDIANTE ENSAYOS DE BIOLUMINISCENCIA Y RESPIROMETRÍA.
COMPROBACIÓN DE RESULTADOS EN ENSAYOS CONTINUOS DE
BIODEGRADACIÓN AEROBIA**

Autor:

Rodríguez Cuerno, Lara

Tutor:

García Encina, Pedro

Irusta Mata, Rubén

**Departamento de Ingeniería Química y
Tecnología del Medio Ambiente**

Valladolid, Julio de 2015.

Pedro García Encina y Rubén Irusta Mata, profesores del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente de la Universidad de Valladolid.

INFORMAN:

Que D^a. Lara Rodríguez Cuerno ha realizado bajo su dirección el Trabajo Fin de Máster titulado “Determinación de ecotoxicidad de tres fármacos de amplio uso mediante ensayos de bioluminiscencia y respirometría. Comprobación de resultados en ensayos continuos de biodegradación aerobia”.

Valladolid, día 06 de julio de 2015

Fdo. Pedro García Encina

Fdo. Rubén Irusta Mata

Reunido el Tribunal designado por el Comité Académico del Master en Ingeniería Ambiental, para la evaluación de Trabajos Fin de Master, y después de estudiar la memoria y atender a la defensa del trabajo “Determinación de ecotoxicidad de tres fármacos de amplio uso mediante ensayos de bioluminiscencia y respirometría. Comprobación de resultados en ensayos continuos de biodegradación aerobia”, presentado por el alumno D^a. Lara Rodríguez Cuerno, decidió otorgarle la calificación de _____.

Valladolid, día ____ de Julio de 2015

El Presidente

El Secretario

Fdo.:

Fdo.:

Vocal

Fdo.:

ÍNDICE

Palabras clave.....	2
Keywords.....	2
Resumen.....	2
Abstract.....	2
1. Introducción.....	3
2. Objetivos.....	5
2.1. Objetivo general.....	5
2.2. Objetivos específicos.....	5
3. Materiales y métodos.....	6
3.1. Fármacos.....	6
3.2. Ensayos de ecotoxicidad.....	7
3.2.1. Análisis in vitro de ecotoxicidad aguda mediante técnicas de bioluminiscencia.....	8
3.2.2. Análisis in vitro de ecotoxicidad aguda mediante pruebas respirométricas.....	9
3.3. Análisis de biodegradabilidad.....	10
4. Resultados y discusión.....	12
4.1. Análisis in vitro de ecotoxicidad aguda mediante técnicas de bioluminiscencia.....	12
4.1.1. Acetaminofén.....	12
4.1.2. Sulfametoxazol.....	13
4.1.3. Cefaclor.....	13
4.2. Análisis in vitro de ecotoxicidad aguda mediante pruebas respirométricas.....	14
4.2.1. Acetaminofen.....	14
4.2.2. Sulfametoxazol.....	15
4.2.3. Cefaclor.....	15
4.3. Comparación entre ambos análisis de ecotoxicidad.....	16
4.4. Análisis de biodegradabilidad en continuo, en reactor biológico aerobio.....	16
5. Conclusiones.....	19
6. Futuros trabajos.....	20
7. Bibliografía.....	22
Anexos.....	23
Caracterización del fango.....	23

Palabras clave.

Biodegradabilidad; CE50; Ecotoxicidad; Fangos activos; PPCPs.

Keywords.

Biodegradability; EC50; Ecotoxicity; PPCPs; Activated sludge.

Resumen.

Actualmente la presencia de productos farmacéuticos y de higiene personal (PPCPs) en el medio ambiente supone un grave problema debido a su ecotoxicidad. La preocupación por el efecto que pueden tener estos contaminantes en los microorganismos presentes en las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales hace que los estudios en éste ámbito hayan aumentado significativamente. Por lo tanto, se hace necesario conocer los efectos de ecotoxicidad aguda y crónica que presentan, así como los efectos que pueden tener a largo plazo sobre la biomasa presente en las depuradoras.

En el presente trabajo se plantea determinar el nivel de ecotoxicidad de tres compuestos activos farmacéuticos (Cefaclor, Acetaminophen y Sulfametoxazol), mediante bioluminiscencia de *Vibrio fischeri*, hallándose la Concentración Efectiva Media (CE₅₀), siendo para el acetaminofén de 478 mg/l y para el sulfametoxazol de 47.43 mg/l, y no alcanzándose la del cefaclor. La CE₅₀ del acetaminofén, se introduce posteriormente en un reactor biológico. Se tomaron muestras cada tres días del efluente para determinar la evolución temporal de la biodegradabilidad del sustrato y del acetaminofén. Se determinó la Demanda Química de Oxígeno del influente y del efluente y mediante técnicas de bioluminiscencia se vieron los efectos que tenía el acetaminofén sobre la bacteria *Vibrio fischeri*.

Se concluye que tanto el acetaminofén como el sulfametoxazol son compuestos activos que tienen una ecotoxicidad aguda alta y que en altas concentraciones el acetaminophen tendría una gran toxicidad sobre los fangos activos de las depuradoras.

Abstract.

Nowadays the presence of pharmaceuticals and personal care products in the environment is a serious issue due to their ecotoxicity. The worry about the effect these pollutants can have in the microorganisms present in sewage treatment plants has made the number of studies in this field grow significantly. Therefore, it is necessary to know the ecotoxicity acute and chronic effects, together with the long term effects they could have on the purifier's biomass.

In this study the toxicity of three active pharmaceutical compounds (Cefaclor, Acetaminophen and sulfamethoxazole) is raised. The median effective concentration (EC₅₀) was calculated, the concentration was 478 mg/l to acetaminophen and 47.48 mg/l to sulfamethoxazole and cefaclor's EC₅₀ wasn't reached. In the case of acetaminophen, commonly known as paracetamol and widely used worldwide, it is subsequently introduced into a biological reactor to determine the temporal evolution of degradation. The Chemical Oxygen Demand of the influent and the effluent was determined and by using techniques of bioluminescence the effects of the acetaminophen on *Vibrio fischeri* were known.

Conclusion shows acetaminophen and sulfamethoxazole are active compounds with a high acute ecotoxicity and also the acetaminophen does have a chronic toxic effect on the activated sludge when it is in high concentration.

1. Introducción

En España las actividades antrópicas han afectado de manera negativa a la calidad de las aguas, quedando inhabilitadas en muchos casos para uso doméstico y agrícola. En este contexto la Directiva Marco del Agua ha establecido un marco legal para la protección de las aguas superficiales, subterráneas, costeras y de estuario. Establece, entre otros, el control progresivo de los contaminantes provocados por el consumo de productos activos farmacéuticos y de higiene personal (PPCPs) , necesitándose para ello nuevas herramientas y metodologías de análisis que permitan su rápida detección (Libro Blanco del Agua en España, 2000).

Estos contaminantes, junto con otros, se denominan contaminantes emergentes, cuyo estudio se encuentra entre las líneas de investigación prioritarias de los principales organismos dedicados a la protección de la salud pública y medioambiental, tales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Agencia para la Protección del Medio Ambiente (EPA), o la Comisión Europea, se definen como contaminantes previamente desconocidos o no reconocidos como tales cuya presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva pero sí la preocupación por las posibles consecuencias de la misma. Los contaminantes emergentes son compuestos de los cuales se sabe relativamente poco o nada acerca de su presencia e impacto en los distintos compartimentos ambientales, razón por la cual y a su vez consecuencia de que no hayan sido regulados, y de que la disponibilidad de métodos para su análisis sea nula o limitada (Damiá & López, 2011). Otra particularidad de estos compuestos, es que debido a su elevada producción y consumo, y a la como consecuente continua introducción de los mismos en el medio ambiente, no necesitan ser persistentes para ocasionar efectos negativos (Petrovic, González & Barceló, 2003).

Se ha constatado que estos compuestos se encuentran en gran variedad de medios: aguas superficiales y subterráneas, suelo... y como consecuencia influyen en los organismos que en ellos habitan; pero sobre todo son muy abundantes en las aguas residuales, ya que después de administrarse los fármacos al organismo, éstos son absorbidos y metabolizados para luego ser excretados (Suárez & Omil, 2008).

En función de sus propiedades fisicoquímicas, la mayoría de estas sustancias al ser utilizadas y/o excretadas por los seres vivos, pasan a formar parte de las aguas residuales municipales o de los sistemas acuáticos naturales, para luego distribuirse en lodos, tejido graso, o permanecer en la fase acuosa. Debido a la gran variedad de PPCPs que pudieran estar presentes en estos medios, se considera que los mismos forman una matriz compleja cuyo estudio requiere un nivel de profundización mayor al que suministran los parámetros fisicoquímicos convencionales (Irusta, Ortiz, García & Pinto, 2011).

La presencia de medicamentos representa un riesgo ambiental dada su persistencia y distribución en el medio, pero no se ha estudiado lo suficiente la gravedad de este riesgo.

Su amplio uso (hospitalario, veterinario, doméstico) provoca que las descargas sigan aumentando y la de sus subproductos, consecuencia de la transformación de los fármacos en el ambiente, manifestándose la toxicidad en los organismos vivos de los ecosistemas (García-Gómez, 2011).

En España, los compuestos activos farmacéuticos más prescritos y la cantidad estimada de consumo de los mismos para el año 2009 fue de: paracetamol 1460 t/año, amoxicilina 198 t/año, ácido acetilsalicílico (AsA) 183 t/año e ibuprofeno 218 t/año (Ortiz, Pinto, Garcia & Irusta, 2013)

En publicaciones recientes, se indica que en países como España, Italia, Alemania, Canadá, Brasil, Grecia y Francia hay descargas al agua de aproximadamente quinientas toneladas de analgésicos al año (Cartagena, 2011).

La mayor parte de los experimentos que se utilizan en toxicología se llevan a cabo en mamíferos, lo cual supone gran presión pública. Intentando minimizar esta problemática se utilizan también organismos con sensibilidad limitada y/o no protegidos por la ley, como hongos, plantas, bacterias, algas e invertebrados (Repetto *et al*, 2001).

El primer estudio que se realizó sobre la presencia de fármacos en efluentes de depuradoras y de sus efectos adversos sobre la fauna y flora se realizó en 1976 en Kansas, Estados Unidos lo que permitió a la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos y a la Unión Europea orientar muchos de sus estudios hacia la evaluación de los impactos ambientales de los fármacos y al desarrollo de tecnologías de tratamiento, estudio de metabolitos, toxicidad, remoción, biorremediación y técnicas instrumentales para su identificación y cuantificación (Cartagena, 2011).

Durante los años 60 y 70 comenzaron a utilizarse las bacterias *Vibrio fischeri* para determinar la toxicidad en aguas, sedimentos y diversos productos. Esta especie habita en ambientes marinos de forma natural, ya sea en un estado planctónico de vida libre o como un simbiote de ciertos peces o calamares. La determinación de la ecotoxicidad mediante este método se basa en la medición de la luminiscencia que emiten las bacterias después de exponerlas a una muestra problema durante un periodo de entre 5 y 30 minutos. Se compara la luminiscencia producida por las bacterias expuestas con la producida por bacterias en condiciones óptimas (Pica y Trujillo, 2008).

Otro ejemplo de evaluación de ecotoxicidad es la respirometría, la cual en un principio se basó en determinar la demanda de oxígeno del agua residual. A partir de mediados de los ochenta se comenzó a incrementar su uso para determinar las características biocinéticas de los procesos biológicos, siendo en la actualidad considerado como el método más usado para obtener información de los procesos de depuración de fangos activados (Villaseca i Vallvé, 2007).

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Evaluación de la ecotoxicidad y de la biodegradabilidad de tres fármacos mediante técnicas respirométricas y de bioluminiscencia para estimar las consecuencias de su presencia sobre los ecosistemas acuáticos.

2.2. Objetivos específicos

- Efectuar ensayos de ecotoxicidad aguda mediante inhibición de la bacteria *Vibrio fischeri*.
- Realizar ensayos de ecotoxicidad aguda mediante respirometría sobre una población típica presente en fangos activos para conocer el grado de inhibición de los fármacos sobre ésta.
- Evaluar la biodegradabilidad de los compuestos farmacéuticos mediante un reactor de mezcla perfecta con fangos activos.

3. Materiales y métodos

3.1. Fármacos

Se escogieron tres fármacos para realizar el presente trabajo, acetaminofén, comúnmente conocido como paracetamol, sulfametoxazol y cefaclor, los dos primeros escogidos dado su amplio consumo y por tanto su abundancia en el medio. De éstos, dos son antibióticos (cefaclor y sulfametoxazol) y uno es analgésico (acetaminofen).

En la Tabla 1 se presentan los tres PPCPs analizados en el presente estudio, con los valores típicos de concentración en distintas aguas naturales (ríos, lagos, subterráneas) y residuales (hospitalarias, urbanas, efluentes de EDARs).

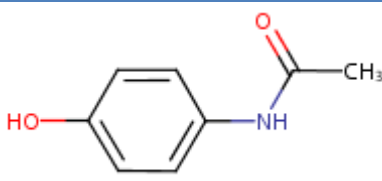
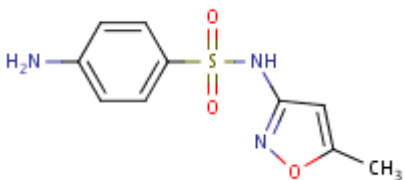
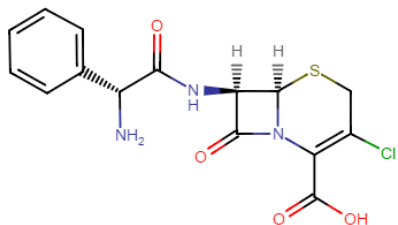
Tabla 1: Medios en los que se encuentran presentes los tres fármacos y concentraciones típicas.

Tipo	Nombre	Medio en el que está presente	Concentración (ng/l)	Referencia
Analgésico	Acetaminofen	Influente EDAR	23202	Rosal et al., 2010
		Efluente EDAR	6000	Ternes, 1998
		Efluentes hospitalarios	186500	Fatta-Kassinis et al., 2011
		Aguas naturales	10000	Kolpin et al., 2002
		Ríos (Madrid, aguas abajo de las principales plantas de tratamiento).	188 710 2813	Valcárcel et al., 2011
Antibiótico	Sulfametoxazol	Influente EDAR	332	Teijón et al., 2010
		Efluente EDAR	199.5 650	Teijón et al., 2010 García Galán et al., 2010
		Efluentes hospitalarios	9,9-1110	Fatta-Kassinis et al., 2011
	Ríos	210-12800	Fatta-Kassinis et al., 2011	
	Cefaclor	Ríos	1,11	Ginebreda et al., 2010
		Aguas residuales urbanas	1800	Fatta-Kassinis et al., 2011
Ríos		60 200		

Cada PPCP tiene unas propiedades fisicoquímicas distintas, lo que hace que tengan un comportamiento diferente ante estímulos externos.

Los parámetros fisicoquímicos de los tres compuestos activos se consultaron en el catálogo de productos de Santa Cruz Biotechnology Inc. (2015) y en Chem ID Plus Lite (United States National Library of Medicine, 2013). En la tabla 2 se muestran los parámetros estudiados para los diferentes fármacos, que son la fórmula química del compuesto activo y su estructura molecular, peso molecular, solubilidad en mg/l y coeficiente de reparto sólido/agua (K_{oc}), el cual es importante dado que se refiere a la movilidad del sólido en la fase acuosa, cuanto más móvil es menor es la tendencia que tiene el compuesto a adsorberse. La solubilidad y los coeficientes de reparto se clasificaron según indicaciones de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO,2000).

Tabla 2: Características principales de los fármacos utilizados.

Nombre	Estructura y fórmula molecular	Peso molecular	Solubilidad (mg/l)	K_{oc}
Acetaminofen	 <chem>CC(=O)Nc1ccc(O)cc1</chem> $C_8H_9NO_2$	151.1641	$1.4 \cdot 10^4$	1.3 – 1.7
Sulfametoxazol	 <chem>Cc1ocnc1NS(=O)(=O)c2ccc(N)cc2</chem> $C_{10}H_{11}N_3O_3S$	253.2809	610	1.5 – 2.4
Cefaclor	 <chem>CC1=CC=C(C=C1)CNC(=O)N2C(=O)N(C2)C(=O)C3=C(C=C(C=C3)Cl)C(=O)O</chem> $C_{15}H_{14}ClN_3O_4S$	367.8116	$1 \cdot 10^4$	0.26 - 2

3.2. Ensayos de ecotoxicidad.

Los ensayos de biotoxicidad han adoptado una importancia creciente en la evaluación de la toxicidad potencial de muestras medioambientales, puesto que son rápidos y no necesitan la completa caracterización química de las mismas (Boluda, R. et al., 2002).

Se realizaron análisis in vitro de ecotoxicidad aguda mediante técnicas de bioluminiscencia utilizando ensayos con MICROTOX® de Strategic Diagnostic de AZUR Environmental y mediante pruebas respirométricas con el respirómetro Strathtox SI500 de Strathkelvin Instruments.

El método bioluminiscente ha demostrado mayor sensibilidad que los respirométricos, pero estos últimos podrían aportar una mayor información sobre el funcionamiento de los reactores biológicos.

3.2.1. Análisis in vitro de ecotoxicidad aguda mediante técnicas de bioluminiscencia

En presencia de agentes contaminantes, la bioluminiscencia natural de *Vibrio fischeri* disminuye y la toxicidad se expresa como concentración efectiva 50 (CE₅₀) o concentración del agente contaminante que produce una reducción del 50% en la emisión de luz inicial (Onoratti et al., 2004).

Para la realización de este ensayo se ha utilizado un equipo MICROTOX® siguiendo el procedimiento que la propia empresa fabricante recomienda en el manual de usuario (AZUR, 1998).

En primer lugar se reconstituye la bacteria *Vibrio fischeri*, la cual se encontraba liofilizada. Se mide previamente la luminiscencia que emite la bacteria y a continuación se expone a la muestra, comparándose ambos valores para hallar el porcentaje de inhibición de *Vibrio fischeri*. En todos los compuestos se llevó a cabo el “Test básico” que consiste en realizar diluciones al 45, 22, 11 y 5% de una muestra inicial con diferentes concentraciones del compuesto farmacéutico. Se utilizaron muestras iniciales con concentración de 3, 6, 9 y 12 g/l para el acetaminofén, 70,140, 210 y 280 mg/l para el sulfametoxazol y de 500 mg/l para el cefaclor.



Figura 1: Equipo Microtox. Fuente: www.instru.es

Se realizaron las pruebas por triplicado para asegurar resultados reproducibles.

3.2.1.1. Concentración efectiva media (CE₅₀)

La CE₅₀ es la concentración, calculada estadísticamente, de una sustancia en el medio, que se espera que produzca un determinado efecto en el 50% de los organismos de experimentación de una población dada, bajo un conjunto de condiciones definidas (Duffus *et al*, 1993).

Con el equipo MICROTOX® se realizó un ensayo que examinó la toxicidad aguda de los tres compuestos: Acetaminofen, cefaclor y sulfametoxazol, basándose en la reducción de la bioluminiscencia natural de la bacteria marina *Vibrio fischeri* en presencia de los tres fármacos.

Estas variaciones en la luminiscencia de *Vibrio fischeri* fueron medidas por medio de un fotómetro (MICROTOX®) y comparadas con una muestra control (sin presencia de fármaco).

Para poder obtener el parámetro CE₅₀ deben obtenerse previamente los siguientes datos:

- i. Gamma (Γ): Es el cociente entre la intensidad de luz perdida y la intensidad de luz restante.

$$\Gamma = \left(\frac{I_{tc}}{I_t}\right) - 1 = \frac{BR \cdot I_0 - I_t}{I_t} \quad [1]$$

I_{tc} es el nivel de luz (I) al tiempo de incubación (t) de la muestra control (c). I_{tc} es el producto de la razón del blanco, BR (variación entre la intensidad de luz a tiempo t y a tiempo cero de la muestra control) por el nivel de luz a tiempo 0, I_0 , que corrige el efecto de la pérdida natural de luz (sin presencia de fármaco).

I_t es el nivel de luz (I) al tiempo de incubación (t) para cada concentración de la muestra.

ii. Efecto:

Porcentaje de pérdida de luz de la muestra a tiempo t comparado con la muestra control.

$$Efecto \% = \left(\frac{\Gamma}{1+\Gamma}\right) * 100 \quad [2]$$

Por definición, de acuerdo con la ecuación [2], la EC_{50} tiene lugar cuando $\Gamma=1$. Por tanto, el valor de la CE_{50} se calcula mediante interpolación cuando Γ vale uno, a partir de $\log\Gamma$ vs $\log CE_{50}$.

iii. Incertidumbre:

El valor CE_{50} presenta una incertidumbre en su cálculo, a partir de las siguientes ecuaciones se obtiene el intervalo de confianza para un nivel de confianza del 95%:

$$S^2 = \sqrt{\left[\frac{1}{N-2}\right] \left[\sum_1^N (\overline{\log C} - \log C_i)^2 - \frac{[\sum_1^N (\overline{\log \Gamma} - \log \Gamma_i) - (\overline{\log C} - \log C_i)]^2}{\sum_1^N (\log \Gamma - \log \Gamma_i)^2} \right]} \quad [3]$$

Dónde:

S^2 : Varianza residual, calculada mediante la ecuación [3].

EC_{50} : Concentración efectiva media.

$\overline{\log \Gamma}$: Media de los valores $\log \Gamma_i$.

N: Número de ensayos.

$\overline{\log C}$: Media de los valores C_i .

$$\log EC_{50} \pm t_{0.05, N-2} * \sqrt{\left[S^2 * \frac{1}{N} + \frac{(\log \Gamma_{EC_{50}} - \overline{\log \Gamma})^2}{\sum_1^N (\log \Gamma - \log \Gamma_i)^2}\right]} \quad [4]$$

3.2.2. Análisis in vitro de ecotoxicidad aguda mediante pruebas respirométricas.

En esta técnica los fangos activos ejercen el papel de reactivo. El análisis consiste en la medida de la cantidad de oxígeno que consumen los microorganismos presentes en el fango activo. Como consecuencia de la aplicación de fármacos, la respiración de los microorganismos se inhibe. Mediante este ensayo podemos emular a pequeña escala lo que sucede en las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) al llegar fármacos diluidos en las aguas residuales.

También en esta técnica se halló la CE_{50} para los fangos activos.



Figura 2: Respirómetro Strathtox.
Fuente: www.sensaratech.com

Las soluciones se añaden directamente a los tubos que tiene el respirómetro, añadiendo 10 ml de la solución problema diluída a la concentración que se quiera (en el presente trabajo se hizo análisis para el 100%, 75%, 50% y 25% de la concentración inicial del fármaco), 2 ml de de agua residual sintética y finalmente 8 ml de lodo activado, colocando inmediatamente los electrodos en cada tubo ya que la concentración de oxígeno disminuye rápidamente.

3.3. Análisis de biodegradabilidad.

Se utilizó un reactor de fangos activos de cinco litros de volumen, unido a un sedimentador circular de dieciséis litros. El reactor se aireó utilizando una bomba de diafragma que enviaba aire a los difusores, los cuales estaban situados de tal manera que la aireación fuese uniforme. En la siguiente figura se muestra el diagrama de flujo del reactor:

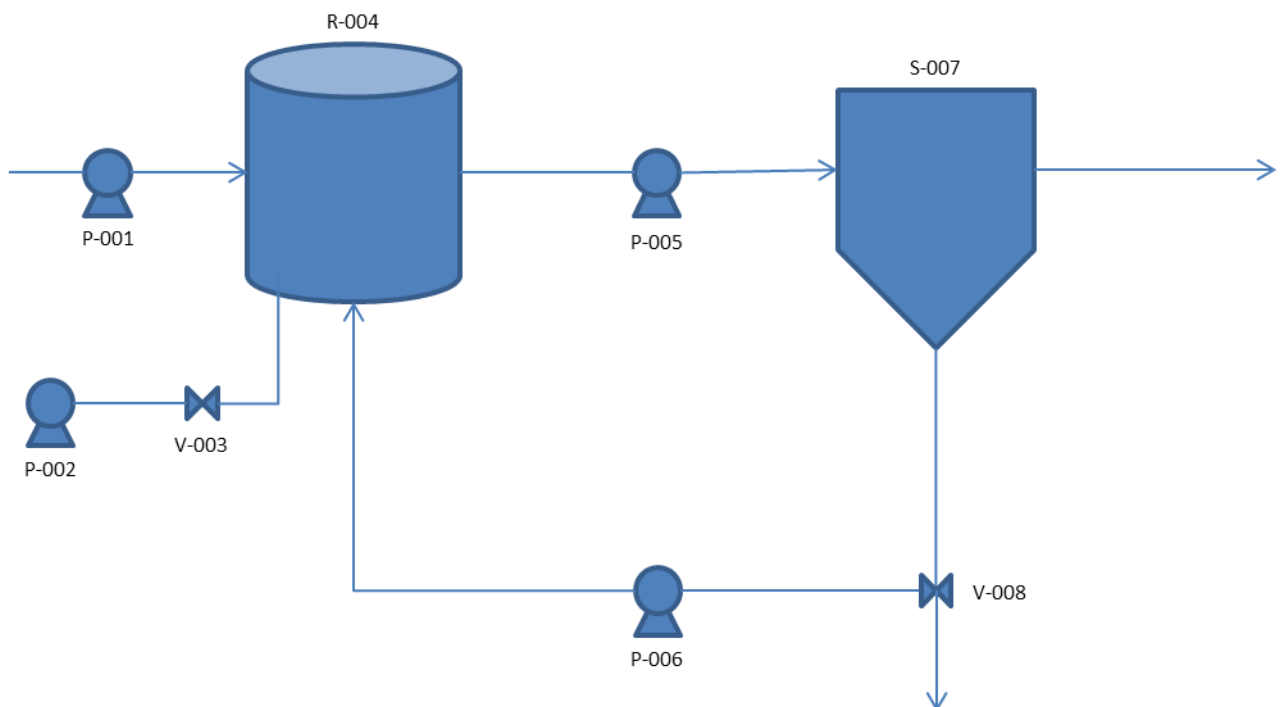


Figura 3: Diagrama de flujo del reactor aerobio de fangos activos.

Tabla 3: Aclaración de los códigos de la Figura 1.

Código	Equipo	Código	Equipo
P-001	Bomba de alimentación	P-005	Bomba del efluente del reactor
P-002	Bomba de diafragma	P-006	Bomba de recirculación
V-003	Válvula reguladora de aire	S-007	Sedimentador
R-004	Reactor aerobio de fangos activos	V-008	Válvula de purga

Se tomaron muestras diarias del efluente a la salida del sedimentador para determinar la evolución temporal de la biodegradabilidad del sustrato. Se determinó la Demanda Química de Oxígeno (DQO) del influente y del efluente por método de reflujos cerrados con dicromato como oxidante fuerte.

Mediante ensayos en MICROTOX® se determinó la bioluminiscencia emitida por las bacterias *Vibrio fischeri* al ponerlas en contacto con una muestra de la alimentación al reactor y con otra muestra de la salida.

El fango que se utilizó en el reactor procedía del reactor secundario aerobio de la Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) de la ciudad de Valladolid. La alimentación al reactor estaba compuesta por 10 g/l de sacarosa y una concentración de 3 g/l del fármaco Acetaminofén, que se escogió dado que es el compuesto más comúnmente consumido de los y el más biodegradable, por lo que se suponía iban a obtenerse resultados de biodegradación muy notables después de pasarlo por el reactor.

4. Resultados y discusión

4.1. Análisis *in vitro* de ecotoxicidad aguda mediante técnicas de bioluminiscencia

Los ensayos de ecotoxicidad se realizaron utilizando el test básico de MICROTOX® (con diluciones de 5, 11, 22 y 45% de la concentración inicial). En las figuras 1, 2 y 3 se presentan los efectos de los tres compuestos estudiados sobre la bioluminiscencia de la bacteria *Vibrio fischeri*.

4.1.1. Acetaminofén

En la figura 4 se muestran los resultados obtenidos (Curvas dosis-respuesta) para el acetaminofén partiendo de las concentraciones iniciales de 3, 6, 9 y 12 g/l, conociendo que la solubilidad es de 14 g/l a 25 °C

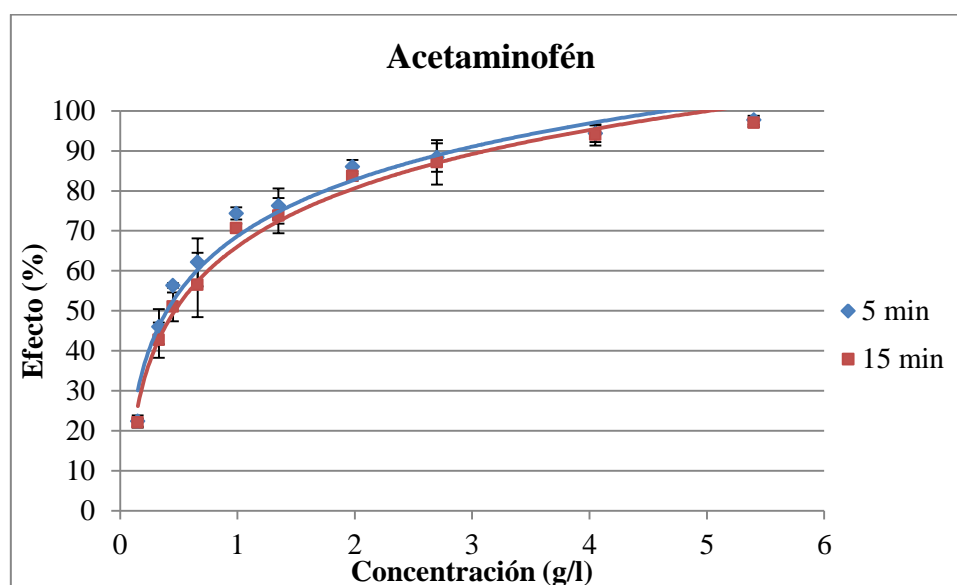


Figura 4: Resultados del análisis ecotoxicológico mediante técnicas de bioluminiscencia del acetaminofén.

La CE_{50} del acetaminofén, en éste ensayo, es de 0,478 g/l.

Se calculó el valor de incertidumbre con las ecuaciones [3] y [4] para $\log CE_{50}$ dando como resultado que la CE_{50} está entre los valores de 0,613 y 0,342 g/l.

4.1.2. Sulfametoxazol

En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos (Curvas dosis-respuesta) para el sulfametoxazol partiendo de las concentraciones iniciales de 70,140, 210 y 280 mg/l, conociendo que la solubilidad es de 610 mg/l a 37°C.

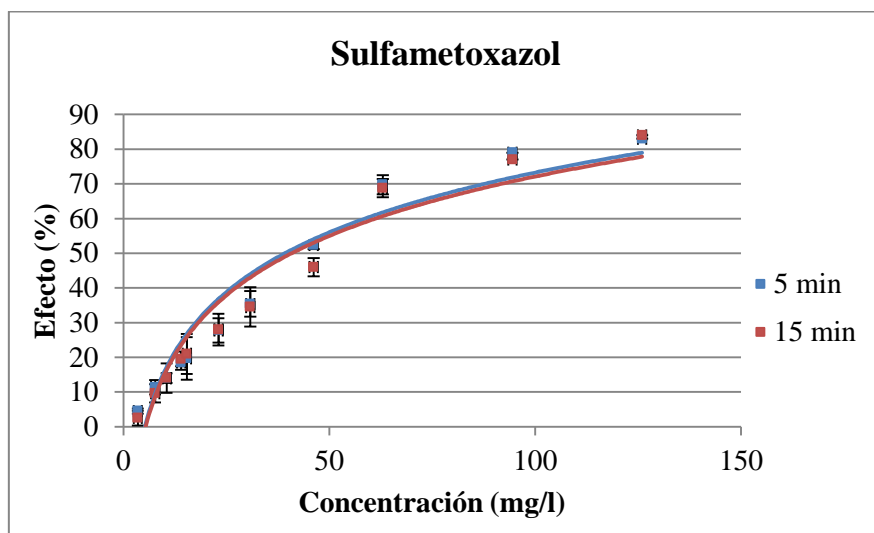


Figura 5: Resultados del análisis ecotoxicológico mediante técnicas de bioluminiscencia del sulfametoxazol.

La CE_{50} del sulfametoxazol, en éste ensayo, es de 47,43 mg/l.

Se calculó el valor de incertidumbre con las ecuaciones [3] y [4] para $\log CE_{50}$ dando como resultado que la CE_{50} está entre los valores de 38,753 y 56,107

4.1.3. Cefaclor

En la figura 6 se muestran los resultados obtenidos (Curvas dosis-respuesta) para el cefaclor partiendo de la concentración inicial de 1000 mg/l, conociendo que la solubilidad es de 610 mg/l a 37°C.

El Gráfico 3 muestra los resultados obtenidos realizando el análisis de ecotoxicidad con cefaclor con concentraciones de 1000 mg/l, conociendo que la solubilidad es de 10000 mg/l a 25 °C.

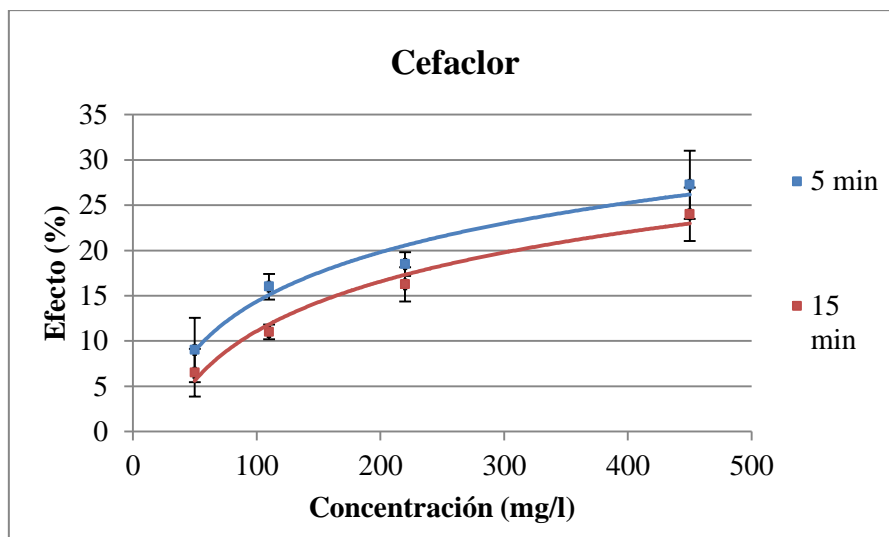


Figura 6: Resultados del análisis ecotoxicológico mediante técnicas de bioluminiscencia del cefaclor.

4.2. Análisis *in vitro* de ecotoxicidad aguda mediante pruebas respirométricas.

Los ensayos de respirometría se realizaron con una unidad Strathtox sI500 de Strathkelvin Instruments.

4.2.1. Acetaminofen

En la figura 7 se muestran los resultados obtenidos realizando el análisis respirométrico con acetaminofén partiendo de una concentración inicial de 3 g/l.

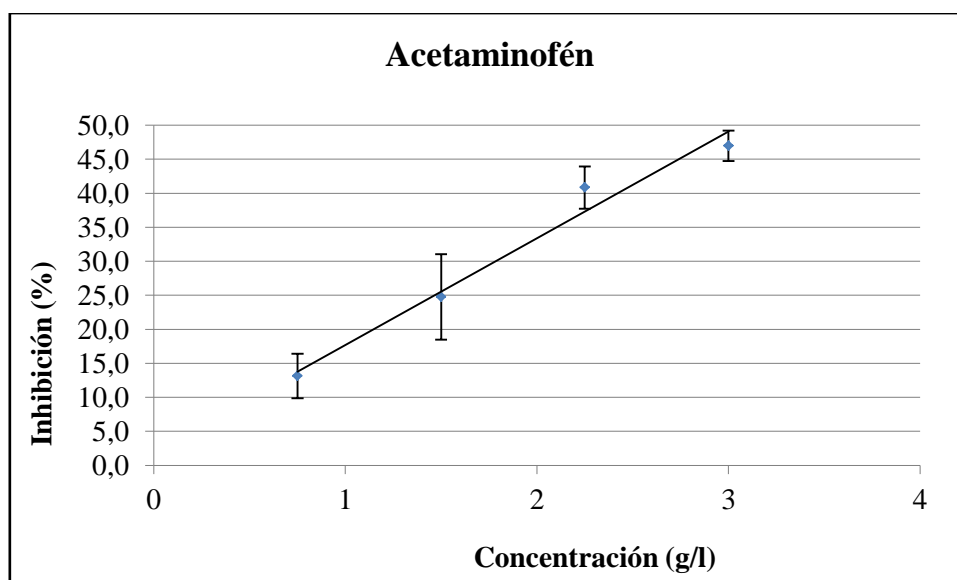


Figura 7: Resultados del análisis ecotoxicológico mediante técnicas respirométricas del acetaminofén.

4.2.2. Sulfametoxazol

En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos realizando el análisis respirométrico con sulfametoxazol partiendo de una concentración inicial de 280 mg/l.

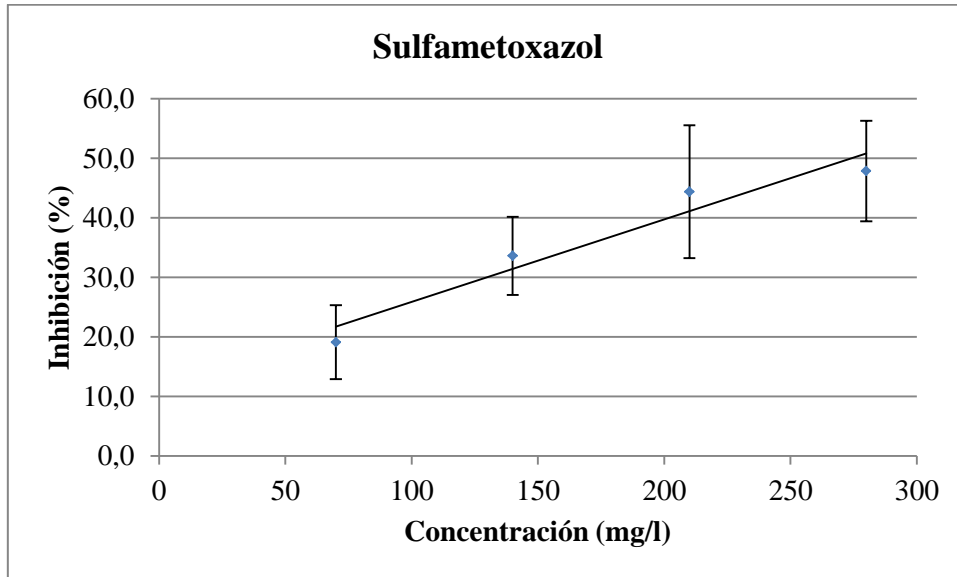


Figura 8: Resultados del análisis ecotoxicológico mediante técnicas respirométricas del sulfametoxazol.

4.2.3. Cefaclor

En la figura 9 se muestran los resultados obtenidos realizando el análisis respirométrico con cefaclor partiendo de una concentración inicial de 500 mg/l.

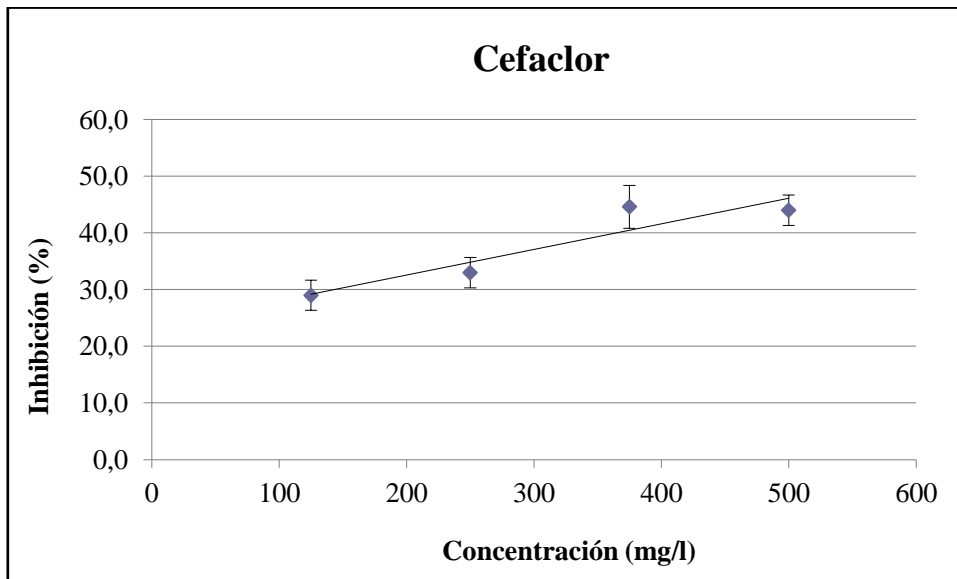


Figura 9: Resultados del análisis ecotoxicológico mediante técnicas respirométricas del cefaclor.

4.3. Comparación entre ambos análisis de ecotoxicidad.

Una vez realizados ambos análisis, en la tabla 4 se puede observar un resumen de los resultados obtenidos mediante el método de bioluminiscencia y la respirometría:

Tabla 4: Resultados para ambos análisis de ecotoxicidad aguda (CE₅₀).

Fármacos	CE ₅₀ Bioluminiscencia	CE ₅₀ Respirometría
Acetaminofen	0,478 g/l	±3 g/l
Cefaclor	-	-
Sulfametoxazol	47.43 mg/l	±300 mg/l

Aunque el comportamiento de los fangos activos nada tiene que ver con los de la bacteria *Vibrio fischeri*, en la tabla 2 se muestran las cantidades de los tres fármacos que provocan una inhibición del 50% para ambos. En el caso del cefaclor no se alcanza con ninguno de los dos métodos la CE₅₀ por lo que se descarta su utilización para los análisis de biodegradabilidad en continuo. De entre los otros dos fármacos se elige el acetaminofén dado que es más ampliamente utilizado que el sulfametoxazol.

4.4. Análisis de biodegradabilidad en continuo, en reactor biológico aerobio

El reactor estuvo en marcha durante 15 días, periodo muy breve que se correspondería más con un periodo de puesta en marcha por lo que no se pueden considerar como representativos. A partir del método de reflujó cerrado con dicromato como oxidante fuerte se obtuvieron los siguientes promedios (ya que las muestras se hacían por duplicado) para la salida del reactor en distintos días:

Tabla 5: Resultados de DQO de todas las muestras analizadas.

Muestras	DQO (g/l)	DQOmin (g/l)	DQOmax (g/l)
Alimentación	13	12,93	13,07
Efluente día 1	7,69	7,55	7,82
Efluente día 3	9,53	9,49	9,57
Efluente día 6	9,31	9,202	9,41
Efluente día 9	9,51	9,39	9,63
Efluente día 12	9,89	9,78	12
Efluente día 15	10,32	10.11	10.53

En la figura 10 se ilustra la evolución temporal de las eficacias de eliminación de la DQO durante el corto periodo de experimentación:

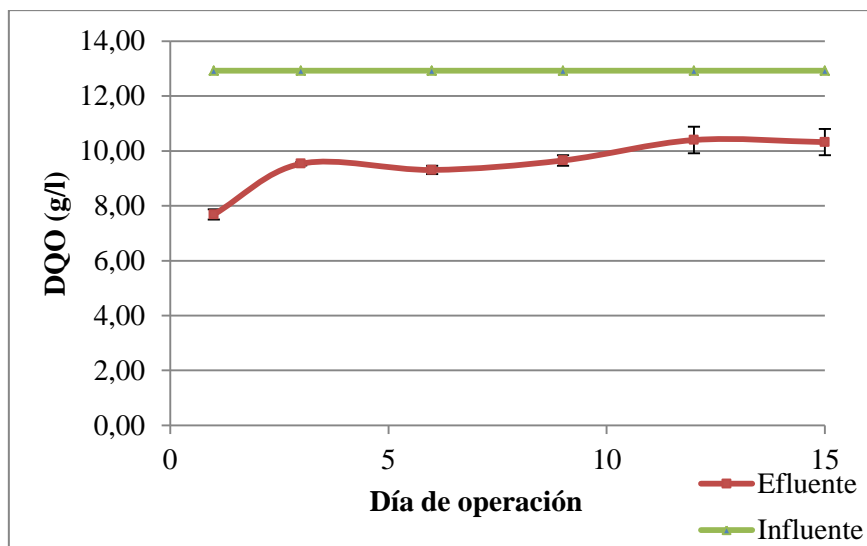


Figura 10: Evolución temporal de la DQO.

En la figura 11 se muestran los resultados obtenidos al realizar el análisis de ecotoxicidad aguda midiendo la bioluminiscencia de *Vibrio fischeri* a una muestra madre de acetaminofén de 3 g/l (ACET). También se muestran los resultados obtenidos al hacer el mismo análisis a una muestra de la alimentación del reactor, con azúcar y acetaminofén con concentración de 3 g/l (ARS+ACET). Con ello se pretende ver si la muestra con agua residual sintética tiene el mismo efecto inhibitorio que la que tiene sólo acetaminofén.

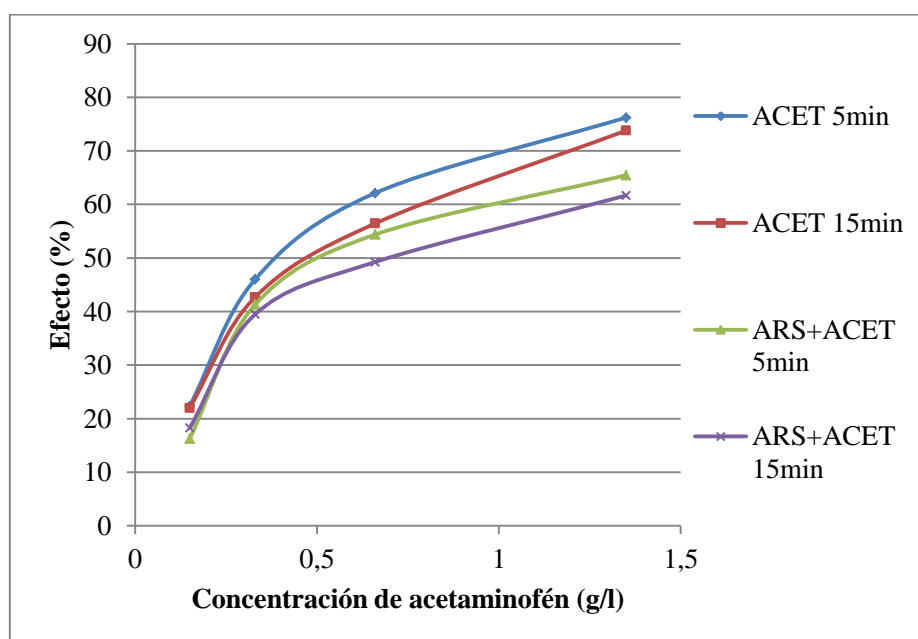


Figura 11: Análisis de bioluminiscencia para el acetaminofén y para la alimentación.

Se puede observar que la muestra con agua residual sintética y acetaminofén tiene un menor efecto inhibitorio sobre *Vibrio fischeri*, por lo que probablemente el azúcar tengo un efecto estimulador sobre la bacteria.

Adicionalmente a los análisis de bioluminiscencia que se realizaron con diferentes concentraciones de los fármacos, se efectuaron análisis a dos muestras del efluente para los días 6 y 15 y se compararon con los resultados obtenidos para la alimentación, con lo que se pretende ver si se biodegrada en el reactor un alto porcentaje del fármaco, disminuyendo así el efecto inhibitorio. En la figura 12 se pueden observar los resultados obtenidos:

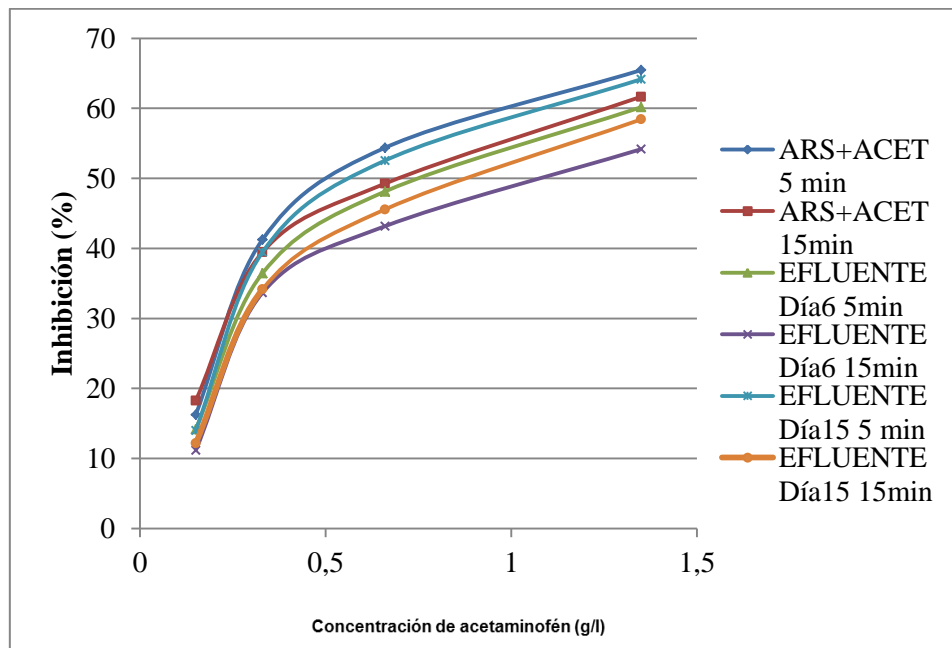


Figura 12: Análisis de bioluminiscencia para la alimentación y el efluente en los días 6 y 15.

Podemos observar al comparar los resultados de los efluentes con la alimentación que no ha habido mucha eliminación de acetaminofén ya que la inhibición del influente con el acetaminofén es muy similar a la del efluente. Entre las dos muestras de efluente se ven diferencias dado que el día 15 tiene mayor porcentaje de inhibición que el día 6, esto es indicativo de que la población microbiana de los fangos se ha visto notablemente reducida, lo cual se ha corroborado al hacer la caracterización del fango el día 15 de operación. Si comparamos la población microbiana que había en el fango nada más llegar de la EDAR de Valladolid con la población existente a los 15 días de operación vemos como ésta se ha reducido notablemente.

5. Conclusiones

- En los experimentos de ecotoxicidad aguda realizados se puede observar que el acetaminofén y el sulfametoxazol tienen una ecotoxicidad aguda alta, ya que con bajas concentraciones alcanzan la CE50, tanto en el método respirométrico como en el de análisis de bioluminiscencia.
- El cefaclor tiene una ecotoxicidad aguda baja, no alcanzando el 50% de inhibición.
- Con altas concentraciones el acetaminofén tiene un efecto altamente tóxico en los fangos activos, lo cual se puede observar a parte de por las gráficas Concentración/Inhibición por la caracterización que se realizó de los fangos, en el momento en el que se trajeron de la depuradora de Valladolid y tras quince días de operación del reactor.

6. Futuros trabajos

Muchos de los productos farmacéuticos tienen una estructura química muy compleja lo que hace que no todos ellos puedan ser eliminados con los sistemas actuales y por tanto que sean vertidos a cauce.

Actualmente se trabaja en la búsqueda de nuevos sistemas de purificación de estas aguas.

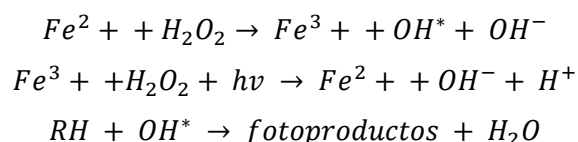
Entre estos sistemas están los procesos de oxidación, que son los más prometedores en la actualidad, siendo complementos útiles para técnicas ya existentes como la floculación, precipitación, adsorción, ósmosis inversa, combustión y los procesos biológicos (Sarría, 2003)

Los Procesos Avanzados de Oxidación son aquellos que involucran la formación “in situ” de radicales altamente reactivos (especialmente radicales hidroxilo) en cantidades suficientes para producir la purificación del agua (Glaze et al., 1987).

La degradación de los contaminantes conlleva que se forme dióxido de carbono, agua y otros compuestos inorgánicos, o al menos que se transformen en productos menos perjudiciales. Aplicadas de la manera correcta estas tecnologías dan la oportunidad de eliminar gran cantidad de compuestos orgánicos, por lo que se han ganado el título de “tratamientos del siglo XXI” (Goy, 2005).

Una clasificación de estos procesos podría ser la siguiente (Peñate, 2009):

- Ozonización en medio alcalino (O₃/OH⁻): La reacción de un compuesto con ozono da lugar a radicales hidroxilo. Se realiza en este medio para aumentar la velocidad de descomposición del ozono.
- Ozonización con peróxido de hidrógeno (O₃/H₂O₂): Al igual que el anterior el peróxido de hidrógeno aumenta la descomposición. El uso de dos o más oxidantes combinados permite aprovechar los posibles efectos sinérgicos entre ellos lo que produce una destrucción adicional a la carga orgánica (Domenech, Jardim & Litter, 2012).
- Oxidación tipo Fenton (H₂O₂/Fe²⁺): En éste proceso se añade como catalizador ión ferroso (FeSO₄*2H₂O), pero la reacción comienza cuando se añade peróxido de hidrógeno.



El reactivo de Fe(II) se oxida a Fe(III) descomponiendo el peróxido de hidrógeno para formar radicales hidroxilo (Villota, Camarero, Lomas & García, 2011).

- Energía procedente de radiación ultravioleta (UV): Esta tecnología de degradación de contaminantes orgánicos es efectiva siempre que estos absorban dicha radiación y lo hagan con una especificidad razonable en comparación con otros compuestos presentes en el medio. Desafortunadamente, la absorbancia de la mayoría de los contaminantes orgánicos es baja y las reacciones fotoquímicas que se originan tienden a generar mezclas complejas de productos intermedios en lugar de la mineralización del contaminante. Este método es mucho más efectivo cuando se utiliza combinado con otras técnicas, como las que siguen a continuación.
- Ozonización y radiación ultravioleta (O₃/UV)
- Peróxido de hidrógeno y radiación ultravioleta (H₂O₂/UV)
- Ozono, peróxido de hidrógeno y radiación ultravioleta (O₃/H₂O₂/UV)
- Foto-Fenton (Fe²⁺/H₂O₂/UV): El procedimiento es igual que la oxidación tipo Fenton, pero además se añade una lámpara de ultravioleta que acelera el proceso.

- Ultrasonidos: Este sistema consiste en la utilización de un reactor ultrasónico que en contacto con la muestra provoca su degradación en otros compuestos (Cruz, Hernández, Jáuregui & Milián, 2012).
- Ozonización y ultrasonidos (O3/US)
- Oxidación electroquímica: La aplicación de corriente eléctrica entre dos electrodos adecuados en agua produce reacciones químicas primarias, con la generación de HO•, que oxida luego la materia orgánica
- Oxidación anódica
- Electro-Fenton: Mejora de la oxidación electroquímica aplicándole reactivo Fenton.

7. Bibliografía

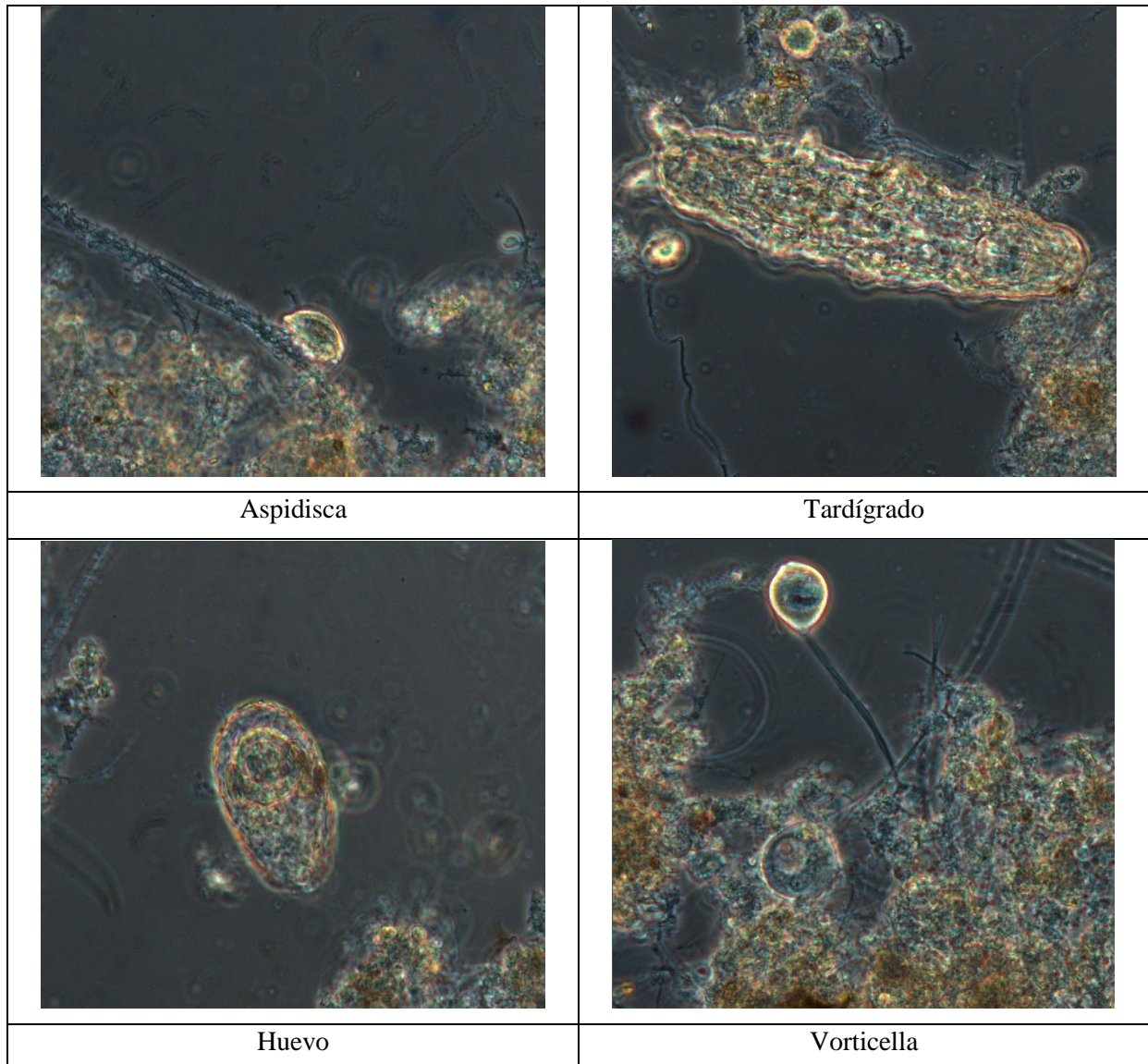
- Cartagena, C. (2011). Contaminantes orgánicos emergentes en el ambiente: productos farmacéuticos. *Revista Lasallista de Investigación*, **8(2)**,143-153.
- Cruz G., Hernández, A., Jáuregui, U. & Milián, Y. (2012). Optimización de la sonólisis para la degradación del paracetamol en aguas contaminadas. Instituto Superior de Tecnologías y Ciencias Aplicadas (InSTEC). La Habana, Cuba.
- Damiá, L. & López, M.J. (2011). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. *Informes CSIC*.
- Domenech, X., Jardim, W.F. & Litter, M. (2012). Procesos avanzados de oxidación: Parte 1: Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes. <http://www.estrucplan.com.ar/Producciones/entrega.asp?IdEntrega=2948>. [Consultada el: 03/07/2015].
- García-Gómez, C., Gortáres-Moroyoqui, P. & Droguí, P. (2011). Contaminantes emergentes: efectos y tratamientos de remoción. Emerging contaminants: effects and removal treatments. *Revista Química viva*,**10(2)**, 96-105.
- Ortiz, S., Pinto, G., García, P. & Irusta, R. (2014). Ecotoxicity and environmental risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in aquatic environments and wastewater treatment plants. *Ecotoxicology*. 23(6).
- Irusta, R., Ortiz, S., García, P. & Pinto, G. (2011). Evaluación ecotoxicológica de productos farmacéuticos y de higiene personal (PPCPs) como medida para la prevención de la contaminación en ambientes acuáticos. Fundación MAPFRE.
- Ortiz, S.A., Pinto, G., Garcia, P. & Irusta, R. (2013). Consumption and occurrence of pharmaceutical and personal care products in the aquatic environment in Spain. *Science of the Total Environment*. **444**, 451-465.
- Peñate, I., Haza, U., Wilhelm, A., & Delmás, H. (2009). Contaminación de las aguas con productos farmacéuticos. Estrategias para enfrentar la problemática. *CENIC Ciencias Biológicas*, **40(3)**, 173-179.
- Peñate, I. (2009). Métodos no convencionales para el tratamiento de aguas contaminadas con productos farmacéuticos. Tesis doctoral. Universidad de Toulouse. [Publicada].
- Petrovick, M., González S. & Barceló, D. (2003). Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water
- Pica, Y. & Trujillo. G. (2008). Ensayo de toxicidad aguda con la bacteria *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo*, 307-317.
- Suárez, S., & Omil, F. (2008). Presencia de compuestos farmacéuticos en aguas residuales y posibilidades de eliminación en estaciones depuradoras. Aguas continentales. *Informes CSIC*, 225–240.
- Villaseca i Vallvé, M. (2007). Respirimetría electrolítica en el diseño y explotación de depuradoras. *Boletín Intexter del Instituto de Investigación Textil y de Cooperación Industrial*. 132.
- Villota N., Camarero L.M., Lomas J.M. & García G. (2011). Análisis del mecanismo de oxidación de paracetamol con reactivo foto-fenton. Universidad del País Vasco, España.

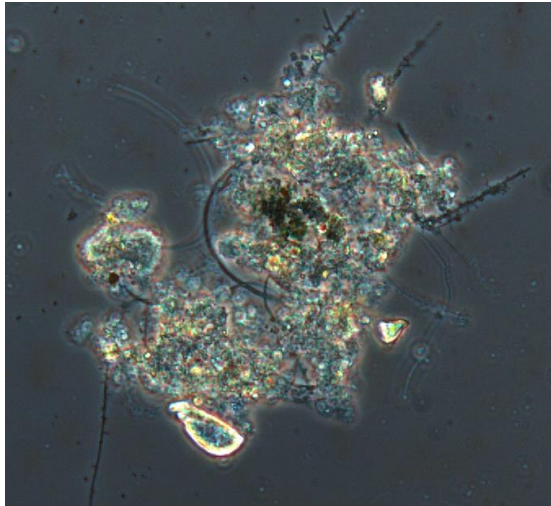
Anexos

Caracterización del fango

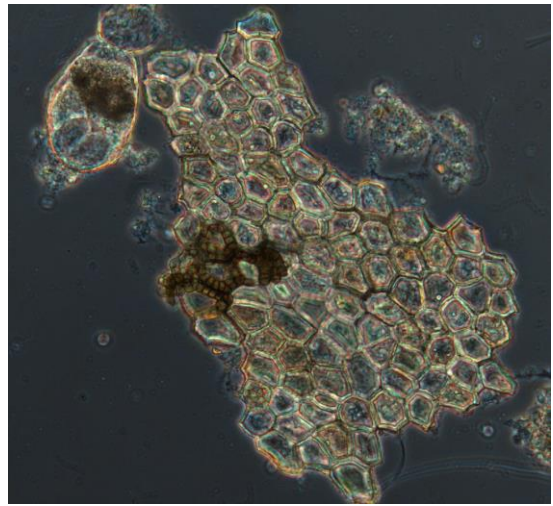
El fango procedente de la EDAR de Valladolid se analizó mediante microscopía (x20), observándose los microorganismos que se aprecian en la figura A.1. En la figura A.2 se muestra la biota presente en los mismos fangos tras 15 días de operación con agua dopada de acetaminofén.

Figura A.1: Microorganismos presentes en el fango procedente de la EDAR de Valladolid.

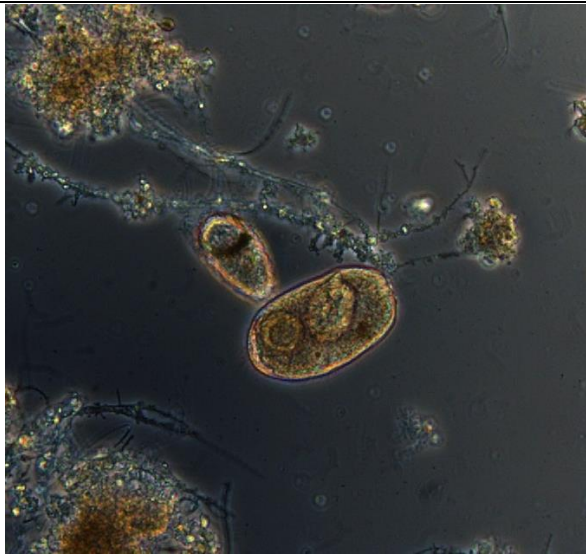




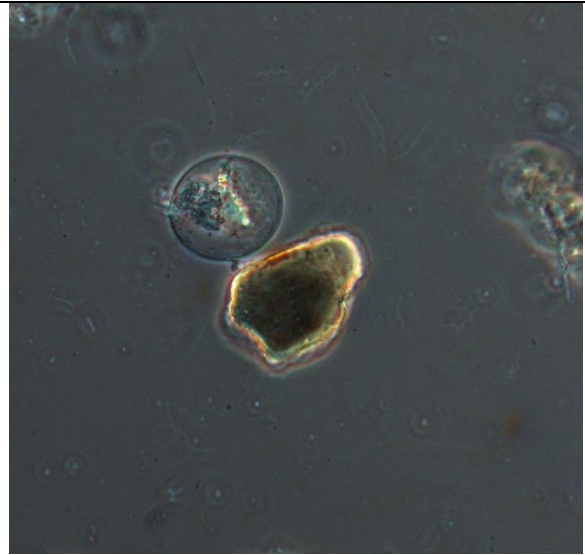
Acinerea



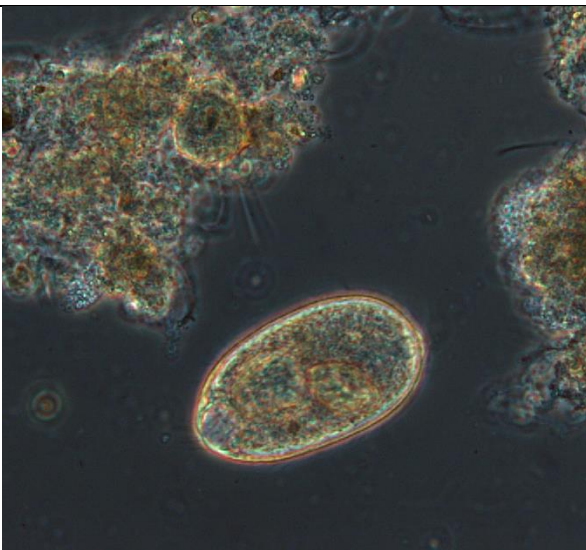
Tejido vegetal



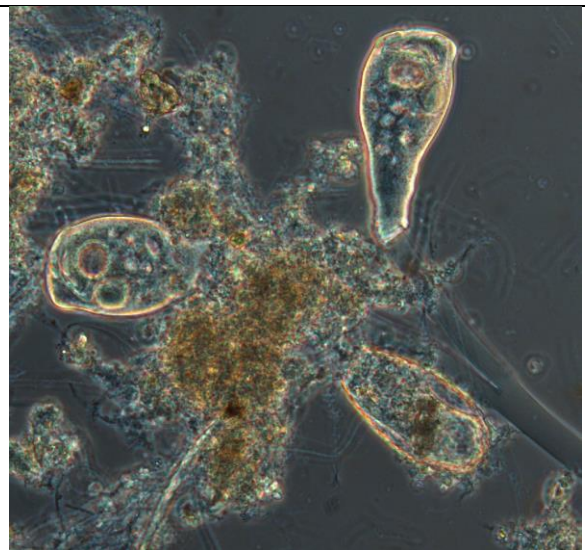
Euglypha



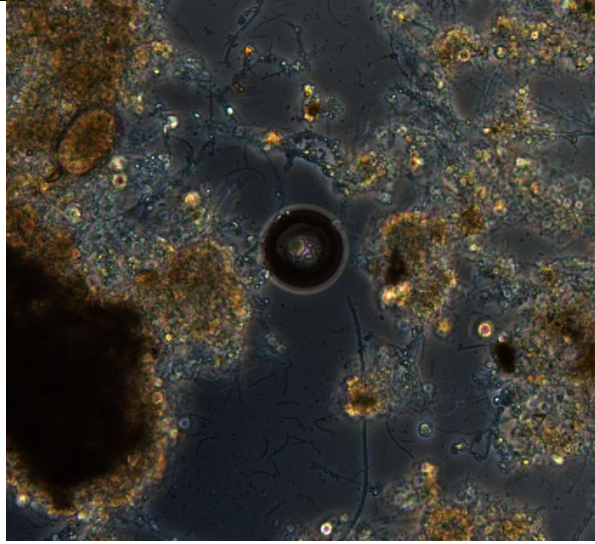
Ameba



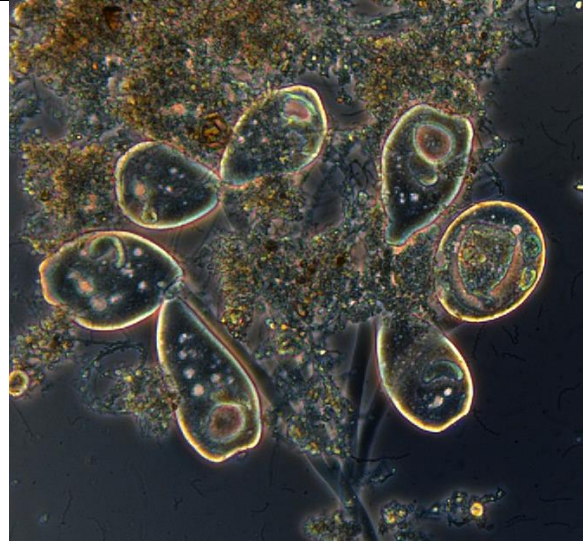
Paramecium



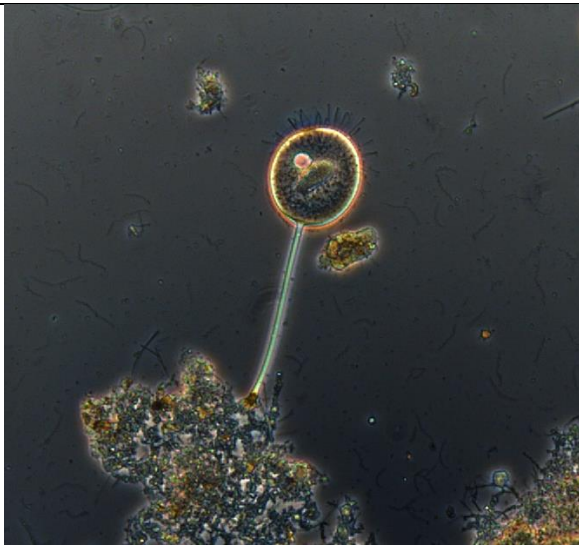
Epystilis



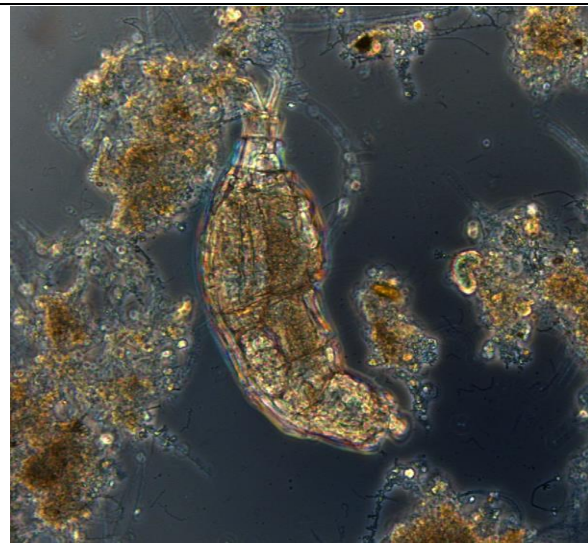
Arcella



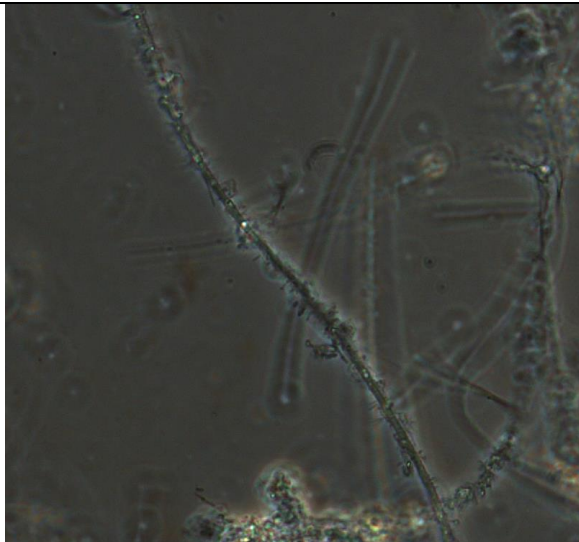
Opercularias



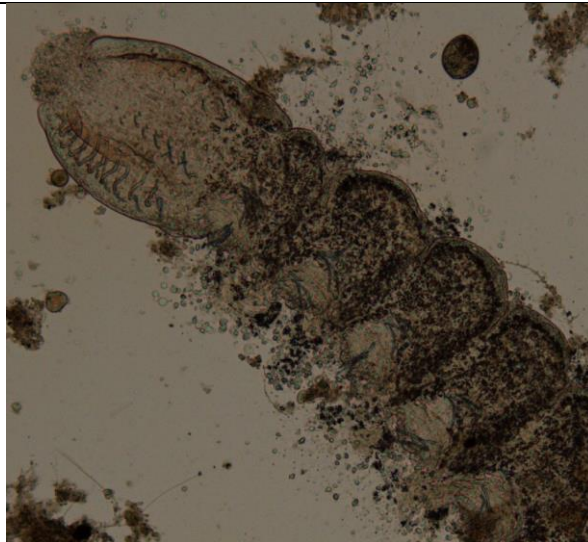
Suctor (*Tokoprya sp.*)



Rotífero



Filamentosas (x40)



Nematodo (x5)

Figura A.2: Microorganismos presentes en el fango tras 15 días de operación.

