



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

“Evaluación biológica de un proceso avanzado de oxidación para la remoción de contaminantes de un efluente hospitalario”

Que para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS

Presenta:

M.C.Q Karen Adriana Novoa Luna

Dirigido por:

Dr. Leobardo Manuel Gómez Olivan

Dra. Sandra García Medina

Dra. Dora Alicia Solís Casados



Toluca Estado de México, Enero 2019

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	4
2. MARCO TEÓRICO	6
2.1 Generalidades	6
2.1.1 El agua	6
2.1.2 Contaminación del agua	6
2.1.3 Tipos de contaminantes del agua	6
2.1.4 Contaminantes emergentes	6
2.1.4.1 Productos farmacéuticos como contaminantes del agua	7
2.1.4.2 Ingreso de los productos farmacéuticos al medio acuático	7
2.1.4.3 Presencia de fármacos en efluentes hospitalarios	8
2.1.4.4 Efecto de los efluentes hospitalarios en el medio ambiente	11
2.2 Evaluación de la calidad del agua	13
2.2.1 Remoción de contaminantes emergentes	14
2.2.1.1 Tecnologías para la remoción de contaminantes	15
2.2.1.2 Nuevas tecnologías para la remoción de contaminantes	15
2.2.1.3 Efectos biológicos de los procesos de oxidación avanzada	15
2.2.1.4 Características de los procesos de oxidación avanzada	18
2.3 Pruebas biológicas	19
2.3.1 <i>Hyalella azteca</i>	19
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVOS	22
5.1 Objetivo general	22
Objetivos específicos	22
6. METODOLOGÍA	23
6.1 Muestreo del efluente hospitalario	23
6.2 Obtención de los organismos de estudio	23
6.3 Determinación de la toxicidad aguda (CL₅₀)	24

6.4	Ensayo de toxicidad subletal	24
6.4.2	Determinación de contenido de proteínas carboniladas.	25
6.4.3	Determinación de proteínas totales.....	25
6.4.4	Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa	25
6.4.5	Determinación de la actividad de la catalasa.	26
6.5	Diseño estadístico	26
7.	RESULTADOS	26
7.1	Caracterización de las aguas del efluente hospitalario	26
7.2	Remoción de fármacos del efluente hospitalario	29
7.3	Toxicidad aguda del efluente hospitalario	32
7.4	Toxicidad subletal del efluente hospitalario sobre <i>Hyalella azteca</i>	32
7.4.1	Determinación del grado de lipoperoxidación	32
7.4.2	Determinación de proteínas hidropéroxidos.....	33
7.4.3	Determinación de proteínas carboniladas.....	33
7.4.4	Determinación de la superóxido dismutasa	34
7.4.5	Determinación de la catalasa.....	34
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
9.	ANEXOS.....	41
9.1	Artículos.....	41
9.2	Congresos.....	45

1. INTRODUCCIÓN

El incremento de sustancias químicas usadas por el hombre, ha traído consigo severos daños a los ecosistemas. Existe una variedad de compuestos presentes en el medio ambiente, sin embargo, destacan los contaminantes emergentes. Estos, 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 aún no han sido regulados, además, la disponibilidad de métodos para su análisis es nula o limitada. Otra característica de estas sustancias, es que debido a su elevada producción y consumo, son introducidos constantemente en el medio ambiente, asimismo, no necesitan ser persistentes para ocasionar efectos negativos en los organismos que estén en contacto con ellos, por lo anterior, su estudio es una línea prioritaria de investigación.

Los fármacos pueden ingresar al medio ambiente por las descargas industriales (industria farmacéutica) y municipales (efluentes de hospitales y casas), sin embargo, generalmente estos efluentes no reciben tratamientos correctos para la remoción de estos compuestos, ya que las plantas tratadoras de aguas residuales, no poseen las características necesarias para su remoción, incluso, en algunos casos, se pueden generar metabolitos más tóxicos que los compuestos originales. Los efluentes hospitalarios han despertado especial interés debido a su composición, la cual incluye productos farmacéuticos, desinfectantes, detergentes y metales

Debido a que los métodos tradicionales de tratamiento de aguas residuales, no son suficientemente eficientes para la remoción de contaminantes emergentes, han surgido nuevas tecnologías conocidas como “procesos avanzados de oxidación” (AOP’s por sus siglas en inglés), éstos logran la mineralización de la materia orgánica y han demostrado su eficacia mediante parámetros físico-químicos, sin embargo, debido a que generan gran cantidad de radicales libres, pueden resultar dañinos para los seres vivos, por lo que es necesario comprobar la eficiencia biológica de estos tratamientos. Los procesos fotocatalíticos de TiO_2 con la adición de Sn, pueden ser una alternativa para el tratamiento de efluentes hospitalarios, pues han demostrado ser útiles para la degradación de contaminantes pero existe muy poca información sobre sus efectos en organismos vivos.

El propósito del presente proyecto fue evaluar la eficiencia biológica de un proceso avanzado de oxidación, siendo este, un tratamiento vía procesos fotocatalítico empleando TiO_2 adicionado con Sn para la remoción de contaminantes del efluente hospitalario de la unidad de medicina familiar del IMSS No. 222. Lo anterior se logró mediante la comparación de los resultados de toxicidad aguda y sub-letal antes y después del tratamiento antes mencionado empleado como bioindicador al anfípodo *Hyalella azteca*. La toxicidad aguda se determinó mediante el valor de concentración letal

50 (CL₅₀) y la toxicidad sub-crónica será mediante la evaluación de la batería de estrés oxidativo (Lipoperoxidación, contenido de proteínas carboniladas, hidroperóxidos y las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y catalasa).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades

2.1.1 El agua

El agua, es un líquido indispensable para los seres vivos. La disponibilidad de agua promedio anual en el mundo es de aproximadamente 1,386 millones de km³, de los cuales el 97.5% es agua salada y sólo el 2.5%, es decir 35 millones de km³, es agua dulce. De esta cantidad casi el 70% no está disponible para consumo humano debido a que se encuentra en forma de glaciares, nieve o hielo (CONAGUA, 2011). Sin embargo, es un recurso no renovable que se ve fuertemente afectado, debido principalmente, a las actividades antropogénicas, por las cuales, ingresan diversos contaminantes.

2.1.2 Contaminación del agua

El término “contaminante” se refiere a la presencia de una sustancia en el ambiente que, debido a su cantidad o composición química, prohíbe el funcionamiento de procesos naturales y produce efectos indeseables para la salud y el medio ambiente. Las alteraciones hechas o provocadas por los seres humanos a la integridad física, biológica, química y radiológica del agua y otros medios son consideradas contaminantes (EPA, 2014). El agua, es uno de los medios más impactados o afectados por la contaminación.

La información sobre el destino y transporte de tales productos químicos y sus posibles efectos tóxicos para los receptores resulta insuficiente, haciendo que sea difícil para las agencias reguladoras, desarrollar políticas que podrían ayudar a su gestión en el medio ambiente y evitar posibles daños a los ecosistemas expuestos, siendo los cuerpos de agua, blancos fuertemente impactados (Ravi, 2016). Recientemente, ha surgido una nueva línea de investigación de contaminantes, denominados “contaminantes emergentes”.

2.1.3 Tipos de contaminantes del agua

2.1.4 Contaminantes emergentes

En la actualidad, más de 80.000 productos químicos sintéticos se liberan anualmente en el medio ambiente, ya sea como parte de un proceso de fabricación o como un residuo industrial. Por ejemplo, la OCDE (Boxal, 2012) ha enumerado nuevos contaminantes emergentes tales como medicamentos veterinarios, hormonas y nano-materiales de ingeniería, etc. Los contaminantes emergentes, son definidos como contaminantes previamente desconocidos o no reconocidos como

tales, su presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva pero sí la preocupación por las posibles consecuencias de la misma. Se sabe relativamente poco o nada de estos compuestos, acerca de su presencia e impacto en los distintos compartimentos ambientales, por lo tanto, no han sido regulados, además, la disponibilidad de métodos para su análisis es nula o limitada. Otra particularidad de estos compuestos, es que debido a su elevada producción y consumo, y por ende, su constante introducción al ambiente, no necesitan ser persistentes para ocasionar efectos negativos (Petrovic M et al., 2003).

El estudio de los contaminantes emergentes, se encuentra entre las líneas de investigación prioritarias de los 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 de Estados Unidos (EPA), o la Agencia Europea de Medicina (Petrovic M et al., 2003). En este grupo, se encuentran una gran variedad de productos como son: los retardantes de llama bromados, los cloroalcanos, los pesticidas polares, los compuestos perfluorados, los fármacos y las drogas de abuso, así como los metabolitos y/o productos de degradación de las clases de sustancias anteriores (Barceló, 2007).

2.1.4.1 Productos farmacéuticos como contaminantes del agua

De todos los contaminantes emergentes, los que probablemente suscitan mayor preocupación y estudio en los últimos años son los fármacos, ya que el consumo de estos en los países de la UE se cifra en toneladas por año, y muchos de los más usados, se emplean en cantidades similares a las de los pesticidas (Jones OA et al., 2002). Estos químicos, en su mayoría, poseen una compleja estructura química, en su mayoría son moléculas hidrofílicas y pueden estar cargadas, incluso pueden poseer más de un grupo funcional ionizable, esto debido a que han sido diseñados para presentar un efecto biológico en los seres vivos (en específico en humanos y algunos, son diseñados para uso veterinario) (Ternes y Joss, 2006; Kummerer, 2001).

2.1.4.2 Ingreso de los productos farmacéuticos al medio acuático

Los productos farmacéuticos, pueden ingresar al ciclo del agua de diversas formas (Fig.1). En aguas subterráneas, generalmente no se encuentra la presencia de fármacos, sin embargo, en aguas tratadas, aguas superficiales o expuestas a la actividad humana y en fuentes de aguas subterráneas vulnerables, pueden encontrarse trazas de productos farmacéuticos (Mons et al., 2003; Versteegh et al., 2003;. Versteegh et al., 2007; De Jongh et al, 2012).

Los cuerpos de agua, pueden ser afectados por descargas de efluentes domésticos, industriales u hospitalarios. Estos últimos efluentes, son de gran interés debido a la complejidad de su composición. El contacto de los residuos generados en hospitales con ecosistemas acuáticos representa un riesgo que está directamente relacionado con la presencia de sustancias peligrosas que pueden tener potencialmente efectos negativos en el equilibrio biológico de los entornos naturales.

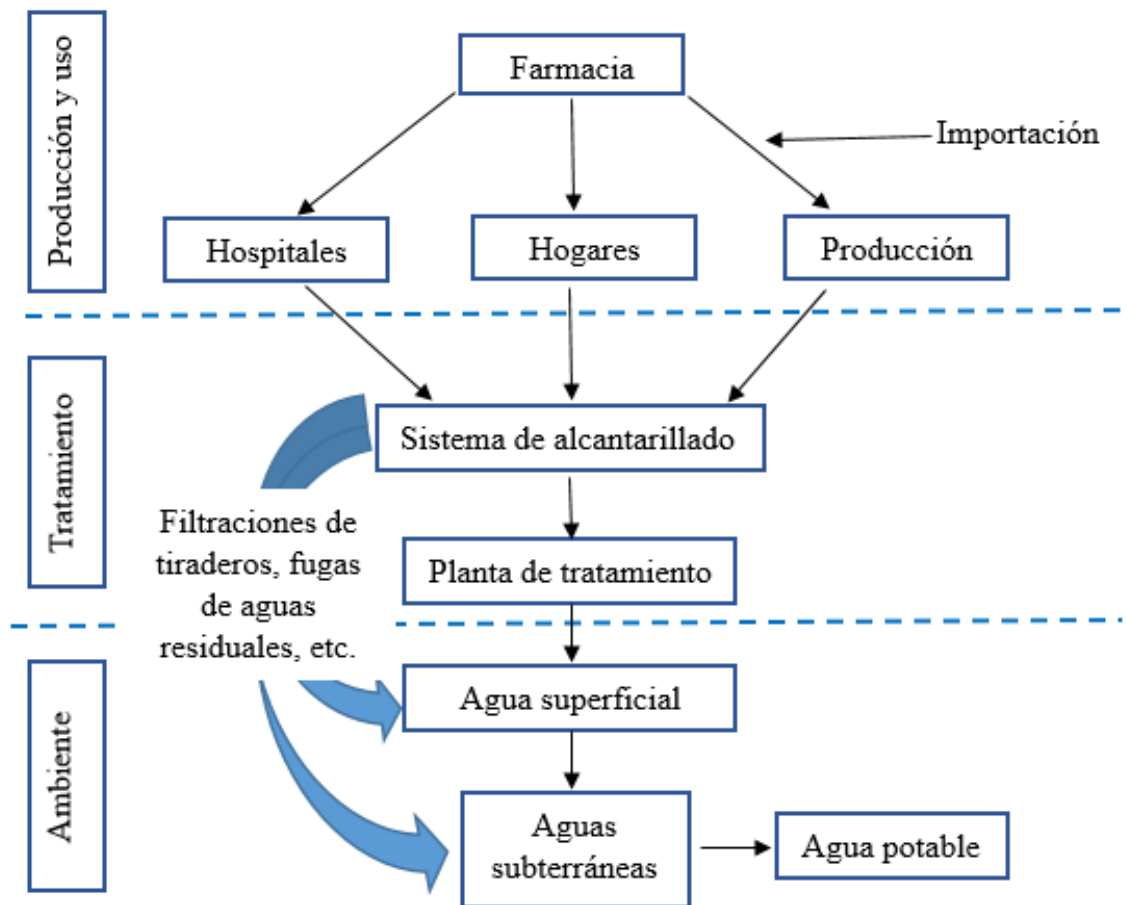


Fig. 1. Esquema del ingreso de fármacos al medio ambiente

2.1.4.3 Presencia de fármacos en efluentes hospitalarios

Los residuos hospitalarios, son de gran interés debido a la complejidad de su composición. El contacto de los contaminantes generados en hospitales con ecosistemas acuáticos representa un riesgo que está directamente relacionado con la presencia de sustancias peligrosas que pueden tener potencialmente efectos negativos en el equilibrio biológico de los entornos naturales. Los

principales contaminantes presentes en las plantas de tratamiento de aguas hospitalarias son los productos farmacéuticos, desinfectantes, detergentes y metales (Neri-Cruz, 2014). Diversos estudios, han demostrado, la presencia de productos farmacéuticos en Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) (Tabla 1).

Autor/ año	Observaciones
Asthon et al., (2004)	Analizaron la incidencia de 112 fármacos y sus metabolitos en efluentes de PTAR y aguas superficiales en Reino Unido. Diez de los 12 compuestos de interés fueron encontrados en muestras de PTAR: propanolol en concentraciones de 76 ng/L, diclofenaco (DCF) 424 ng/L, ibuprofeno (IBP) 3086 ng/L, ácido mefenámico 133 ng/L, dextropropoxifeno 195 ng/L, trimetoprim 70 ng/L, eritromicina <10 ng/L, acetilsulfametoxazol <50 ng/L, sulfametoxazol <50 ng/L y tamoxifen <10 ng/L.
Ternes y Joss, (2004)	Encontraron ácido acetil salicílico (AAS) y algunos de sus metabolitos en agua residual de Estados Unidos en magnitudes de µg/L en PTAR
Lindqvist et al., (2005)	Analizaron muestras de agua en 7 PTAR de Finlandia para IBP, naproxeno (NPX), ketoprofeno, DCF y bezafibrato. Encontrando que existe una mayor remoción de IBP (92% +/-8%) y menor para el DCF (26%+/-17%), además, se percataron que en los puntos de descarga de las PTAR, las concentraciones bajan debido a la dilución y las concentraciones encontradas no son consideradas como causantes de toxicidad aguda.
Fent et al, (2006)	Encontraron concentraciones de AINES de ≥0.1 µg/L, en efluentes de PTAR convencional (por el procedimiento de clarificación y tratamiento biológico), encontraron que el diacilato (forma activa del AAS) y el ácido salicílico, han sido identificados en aguas residuales de tipo municipal a concentraciones mayores a 4.1 µg/L y hasta 59.6 µg/L
Burn et al, (2006)	Analizaron afluentes y efluentes de ocho PTAR en Canadá, detectaron fármacos de tipo ácido, base débil en. Las concentraciones encontradas variaron desde no detectables hasta 35µg/L. Se identificó a la carbamazepína (compuesto neutro) y a los AINES (ibuprofeno y naproxeno).

Zuccato et al, (2006)	Reportan la ineficiencia de los sistemas de tratamiento de aguas residuales para la eliminación de los fármacos, por lo que el conocimiento acerca de la causa, incidencia y efectos de los fármacos como contaminantes del ambiente son necesarios para un mejor entendimiento de la evaluación ecológica.
Stülten et al., (2008)	Analizaron 6 efluentes de PTAR en Alemania y encontraron cantidades de DCF a concentraciones de 0-0.6 µg/L y de sus metabolitos de 1.3 – 3.3 µg/L.
Bedner y Maccrehan (2006); Zhang <i>et al</i> , (2008)	Mediante diversas pruebas, demostraron que el paracetamol cuando pasa por un tratamiento terciario como la cloración, para ser eliminado del agua produce subproductos tóxicos (1,4 benzoquinona y N-acetil-p-benzoquinonaimina)
Langford et al. (2009)	Desarrollaron un método para identificar casi 40 productos farmacéuticos. Esto ayudó para evaluar la contribución de los productos farmacéuticos procedentes de los efluentes de hospital a una PTAR de la ciudad de Oslo. Observaron que los hospitales son fuentes puntuales de descarga de algunos productos farmacéuticos, sin embargo, en otros casos, provienen de descargas domésticas y varía de una sustancia a otra.
Verlicchi et al. (2010)	Caracterizaron efluentes hospitalarios y domésticos, comparando sus componentes. Además, evaluaron diferentes métodos para el tratamiento de estos efluentes, recomendando tratar de forma diferente y previa las descargas urbanas antes de entrar en contacto con las urbanas con el fin de obtener mejores resultados.
Won-Jin Sim et al. (2011)	Midieron 24 productos farmacéuticos en las aguas residuales de 12 PTAR de diferentes características. La concentración de los productos farmacéuticos en efluentes y afluentes fue variable dependiendo de las características de la PTAR, sin embargo, observaron que los fármacos no son removidos en su totalidad.
	Realizó un estudio en un área al norte de Italia, en el efluente de dos hospitales de diferente tamaño y el afluente y efluente de la planta de recepción de tratamiento municipal de uno de los hospitales examinados. Confirmaron que los efluentes del hospital no deben considerarse como poseedores de la misma naturaleza contaminante de aguas residuales urbanas. Además, el análisis de las contribuciones porcentuales del hospital a las evidencias del afluente de la

Verlicchi et al. (2012)	PTAR, indican que los hospitales representan una de las principales fuentes de contaminantes, en particular, los antibióticos, los antagonistas de los receptores y reguladores de lípidos.
Santos et al. (2013)	Analizaron aguas residuales de cuatro hospitales diferentes las cuales son transportadas a una PTAR que también recibe descargas domésticas. Los resultados indican que mientras más grande sea el hospital, generará mayor cantidad de residuos. Mostró que los antiinflamatorios no esteroideos (AINE's), analgésicos y antibióticos se encuentran con mayor frecuencia y no todos son eliminados por el proceso de tratamiento de aguas.

Tabla 1. Presencia de fármacos en plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR).

2.1.4.4 Efecto de los efluentes hospitalarios en el medio ambiente

Las aguas residuales sin tratar contiene regularmente más de 100 µg/L de productos farmacéuticos y productos de degradación de estos éstos (Oosterhuis et al, 2011, Verlicchi et al, 2012). Las concentraciones de las sustancias individuales varían significativamente, dependiendo de consumo humano y el metabolismo, eliminación durante el tratamiento y dilución, la degradación y la absorción en el medio ambiente. Por ejemplo, las concentraciones totales de diversos fármacos que se encuentran en el río Rin y Mosa generalmente ascienden a varios g/L (RIWA, 2011a, b, Ter Laak y Hofman, 2010). Este tipo de productos, tiene diversos efectos en los organismos acuáticos (tabla 2), pudiendo representar riesgo para los ecosistemas

Autor/ año	Observaciones
Carlsson, (2006)	Determinó que existe una correlación directa entre la persistencia de residuos de diclofenaco (ingerido en la alimentación) y la falla renal de buitres en la India y Pakistán, tras la inusual y levada incidencia de muertes en tres especies de buitres (<i>Gyps bengalensis</i> , <i>Gyps indicus</i> y <i>Gyps tenuirostris</i>) a causa del diclofenaco, empleado con fines veterinarios en el ganado.
Isidori et al.	Demostó que los fotoproductos del NPX son más tóxicos que el compuesto original en tanto en pruebas agudas como en crónicas. Sin embargo, no se observaron efectos genotóxicos o mutagénicos en algas, rotíferos y

(2005)	microcrustáceos.
Burn et al. (2006)	Evaluaron los efectos crónicos y agudos del paracetamol (PAR), IBP, NPX y ácido salicílico (metabolito del AAS) mediante bioensayos empleando cuatro organismos: <i>Daphnia magna</i> y <i>Vibrio fischeri</i> (para toxicidad aguda) y <i>Ceriodaphnia dubia</i> y <i>Selanastrum capricornutum</i> (para toxicidad crónica). Los resultados mostraron que a concentraciones en intervalos de 32-500 mg/L no se encontraron efectos agudos sobre <i>Daphnia magna</i> y <i>Vibrio fischeri</i> . En referencia a la toxicidad crónica, se observaron únicamente efectos sobre el alga <i>Selanastrum capricornutum</i> cuando se utilizó ibuprofeno.
Richards y Cole, (2006)	Evaluaron la toxicidad de 14 medicamentos entre ellos los AINE's ampliamente utilizados, mediante el ensayo de teratogénesis en el que se emplearon embriones de ranas (<i>Xenopus</i>). Se determinó la toxicidad, teratogenicidad, concentración mínima para inhibir el crecimiento, tipos y severidades de malformaciones y se encontró que la toxicidad varía entre las clases de fármacos analizados,
Cleuvers (2003) y Pepin (2006)	En diversos estudios acerca de AINE's (IBP, DCF, NPX y AAS) encontraron que estos productos ejercen un efecto inhibitorio (crecimiento, movilidad) sobre determinadas funciones en vertebrados (no mamíferos) e invertebrados.
Felis et al. (2007)	Encontraron la CE ₅₀ del IBP en <i>D. magna</i> siendo 10-100 mg/L, en 14 días disminuye el crecimiento y la supervivencia se afecta a 80 mg/L. La reproducción se ve afectada a 13.4 mg/L y se inhibe completamente a 80 mg/L.
Khetan y Collins, (2007)	Determinaron la toxicidad aguda del AAS sobre <i>Daphnia magna</i> resultando una CL ₅₀ a las 48h de 88.1 mg/L. Además, realizaron la prueba de inhibición del crecimiento empleando el alga verde <i>D. subspicatus</i> encontrando tal efecto a los 3 días de exposición, y se determinó la CL50 de 106.7 mg/L.
Hayashi et al. (2008)	Realizaron una exposición a diversas concentraciones de IBP por 10 días usando como bioindicador a <i>D. magna</i> , encontraron que en la mayor concentración la descendencia es menor, dando 10 días de recuperación la

	descendencia es igual al control, ya que se recuperan teniendo descendencia más rápido.
Sushil y Collins (2007)	Evaluaron las consecuencias tóxicas producidas por la mezcla de principios activos (atenolol, bezafibrato, carbamazepina, ciclofosfamida, furosemida, ibuprofeno, ciprofloxacino, ranitidina, salbutamol y sulfametoxazol) a concentraciones de ng/L en ambientes acuáticos, demostrando la inhibición del crecimiento <i>in vitro</i> afectando fisiológica y morfológicamente las células renales de embriones de peces (HEK293), encontrando además que algunas mezclas pueden presentar efecto sinérgico tras la interacción.
Oviedo-Gómez et al. (2010)	Determinaron la toxicidad aguda y subletal del DCF sobre <i>Hyaella azteca</i> utilizando biomarcadores de estrés oxidativo (LPX, CPC, actividad de SOD, CAT y GPx). La CL50-72 h fue de 0.467 mg/kg, y los resultados del estudio subletal mostraron un incremento significativo a todos los tiempos de exposición del grado de LPX y CPC, además de un cambio en la actividad de las enzimas SOD, CAT y GPx.
Gómez-Oliván et al. (2012)	Evaluaron la exposición subletal a <i>Hyaella azteca</i> a PAR utilizando biomarcadores de estrés oxidativo (LPX, CPC, actividad de SOD, CAT y GPx), reportaron un incremento estadísticamente significativo con respecto al testigo en el grado de LPX y CPC, la actividad de las enzimas SOD, CAT y GPx disminuyó.
SanJuan Reyes et al. (2013)	Caracterizaron el efluente de una industria farmacéutica productora de AINE's, evaluando la toxicidad aguda y el estrés oxidativo generado sobre <i>Cyprinus carpio</i> .
González- González et al. (2014)	Analizaron un cuerpo de agua llamado "Presa Madin", encontrando la presencia de diversos contaminantes destacando los AINE's y metales. Evaluaron el estrés oxidativo inducido sobre <i>Cyprinus carpio</i> .

Tabla 2. Efectos tóxicos sobre diversas especies, asociados a productos farmacéuticos.

2.2 Evaluación de la calidad del agua

En nuestro país, la evaluación de la calidad del agua, no considera la presencia de los contaminantes emergentes, los criterios se valoran utilizando únicamente tres indicadores: la Demanda Bioquímica

de Oxígeno a cinco días (DBO₅), la Demanda Química de Oxígeno (DQO) y los Sólidos Suspendidos Totales (SST). La DBO₅ y la DQO son indicativos de la cantidad de materia orgánica presente en los cuerpos de agua, proveniente principalmente de las descargas de aguas residuales tanto de origen municipal como no municipal (CONAGUA, 2014), la importancia de estos valores se resume a continuación (Tabla 3):

Parámetro	Relevancia
DBO ₅ y DQO	La DBO ₅ indica la cantidad de materia orgánica biodegradable en tanto que la DQO mide la cantidad total de materia orgánica. Si se observa un incremento en la concentración de estos parámetros, ocurre una disminución del contenido de oxígeno disuelto en los cuerpos de agua teniendo como consecuencia afectación a los ecosistemas acuáticos.
SST	Los SST tienen su origen en las aguas residuales y la erosión del suelo. Un incremento de los niveles de SST ocasiona que un cuerpo de agua pierda la capacidad de soportar la diversidad de la vida acuática. Así mismo, estos parámetros permiten reconocer gradientes que van desde una condición relativamente natural o sin influencia de la actividad humana, hasta el agua que muestra indicios o aportaciones importantes de descargas de aguas residuales municipales y no municipales, así como áreas con deforestación severa.

Tabla 3. Parámetros de la calidad del agua evaluados comúnmente en México (CONAGUA, 2014)

2.2.1 Remoción de contaminantes emergentes

Las dificultades en la eliminación de microcontaminantes, especialmente farmacéuticos, a partir de las aguas residuales son debido al hecho de que sus concentraciones están en el rango de 10⁻³-10⁻⁶ mg/L-1, encontrándose en una concentración menor que los de contaminantes convencionales. Además, incluyen un amplio espectro de compuestos con diferencias notables en sus propiedades que afectan a su comportamiento y destino en las plantas de tratamiento: solubilidad, volatilidad, capacidad de adsorción, biodegradabilidad, polaridad, estabilidad, etc. Los tratamientos convencionales no están diseñados para ser capaces de eliminar también a los microcontaminantes (Verlicchi et al, 2012).

2.2.1.1 Tecnologías para la remoción de contaminantes

Los procesos y tecnologías existentes en la actualidad para el tratamiento de aguas residuales son diversos y se clasifican frecuentemente en tratamientos primarios, secundarios y terciarios. Los tratamientos primarios son aquellos destinados a la eliminación de sólidos suspendidos y grasas del agua residual. Los secundarios por su parte son procesos biológicos cuyo objetivo es la remoción de la materia orgánica disuelta y los terciarios tienen como fin la eliminación de los microorganismos peligrosos presentes en el agua residual (cloración, ultravioleta).

En los países industrializados se está recurriendo al uso de las llamadas “Nuevas Tecnologías” para el tratamiento de aguas contaminadas con productos como los farmacéuticos, un ejemplo de éstas son los “Procesos de Oxidación Avanzada” (AOP’s por sus siglas en inglés). Bajo el término se engloba un conjunto de tecnologías de tratamiento de efluentes líquidos, gaseosos y sólidos capaces de transformar contaminantes en sustancias menos nocivas o mineralizarlos a compuestos inorgánicos simples y no tóxicos.

2.2.1.2 Nuevas tecnologías para la remoción de contaminantes

El concepto de AOPs fue definido como “procesos que involucran la generación y uso de especies transitorias poderosas, principalmente el radical hidroxilo”. Este radical, posee un poder oxidante muy elevado y es capaz de atacar a casi todas las sustancias orgánicas (Wei Zhang et al, 2009). Se trata de una familia de métodos en los que se incluyen todos los procesos catalíticos y no catalíticos que utilizan la elevada capacidad oxidante del radical hidroxilo, los más comunes utilizan combinaciones de ozono (O_3), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radiación ultravioleta y fotocátalisis. Hasta el momento, son muy poco aplicados y peor aún, menos difundidos en los países de economías emergentes como los de América Latina. La mayoría de las AOP’s pueden emplearse para la remediación y detoxificación de aguas especiales como son las provenientes de la industria farmacéutica, generalmente en pequeña o mediana escala (Baur et al., 2005).

Una consecuencia de la elevada reactividad del agente oxidante es que los procesos AOP’s se caracterizan también por su baja selectividad; pero lo que en un proceso de producción puede ser una desventaja, es sin embargo es una característica deseable en el caso de la eliminación de contaminantes de aguas residuales (Baur et al., 2005).

2.2.1.3 Efectos biológicos de los procesos de oxidación avanzada

Al existir una estrecha relación entre la calidad del agua y los organismos que habitan en ella, la evaluación de la calidad de las aguas requiere de la aplicación de metodologías tanto químicas como biológicas con las que poder detectar no sólo los contaminantes presentes en ellas sino también los posibles efectos indeseables que pueden ocasionar en el medio ambiente y la salud pública. Los ensayos biológicos se presentan como test innovadores e indicadores reales y rápidos de los efectos tóxicos de las aguas (Farré M, Barceló D, 2003). La importancia de utilizar determinaciones mediante análisis químicos y ensayos de toxicidad para monitorear la calidad del agua es ampliamente aceptado hoy en día (Vásquez y Fatta-Kassinis, 2013). En la siguiente tabla (tabla 4), se presentan algunas de las pruebas que utilizan organismos vivos para corroborar la calidad del agua.

Productos farmacéuticos	Especie	Tratamiento	Resultados obtenidos
	<i>D. magna</i> <i>P. subcapitata</i>	Fotocatálisis TiO ₂ /UV	La toxicidad se aumentó en función de las concentraciones de fármaco y la irradiación. Mediante el control de estos factores, la eliminación del fármaco se consigue y la toxicidad se reduce en ambas especies (Rizzo et al., 2009). Es necesario estandarizar los tiempos de irradiación y la cantidad del catalizador para evitar efectos sobre las especies.
	<i>A.salina</i>		El DFC se probó a concentraciones relativamente bajas, se encontró que <i>A.salina</i> es insensible a los intermedios formados tras el tratamiento en las condiciones investigadas (Rizzo et al., 2009).
Diclofenaco	<i>D.magna</i>	UV-A/TiO ₂ fotocatálisis	DCF a una concentración inicial de 10 mg / L no presenta efecto tóxico para la especie de agua dulce <i>D. magna</i> , a diferencia de su degradación fotocatalítica de los subproductos que exhibe toxicidad considerable (Archileos et al., 2010).

	<i>V. fischeri</i>	*OH y electron hidratado (e^-_{aq})	La actividad biológica de las muestras tratadas fue constante, lo que implica que los productos de descomposición tóxicos se forman en un grado significativo. Con la oxidación adicional, los productos tóxicos podrían ser eliminados y las toxicidades de la solución tratada disminuyen lentamente. Mientras que el 100% de diclofenaco se eliminó a 12,0 kGy, toxicidad residual se mantuvo en el 40% de inhibición (Hui Yu et al. 2013)
	<i>D. magna</i>	(O ₃ /UVA/ TiO ₂) (O ₂ /UVA/ TiO ₂)	Ambos procesos de oxidación fotocatalíticos estudiados tienen los valores de ecotoxicidad más bajos en comparación con los otros sistemas aplicados (Aguinaco et al., 2012)
Ibuprofeno	<i>V. fischeri</i>	Fe ₂ ⁺ /H ₂ O ₂	El valor de CL ₅₀ de ibuprofeno de <i>V. fischeri</i> fue de 19,1 mg / L (Ferré et al., 2001). En el tratamiento de Fenton del TII ₅₀ era alta y por lo tanto considerado tóxico (Marijana et al., 2015)
	<i>D. magna</i>	Sonofotocatálisis	Se encontró que la solución no tratada IBP (10 mg L ⁻¹) es moderadamente tóxica para <i>D. magna</i> pues induce la inmovilización de los organismos. Durante la aplicación del proceso fotocatalítico en presencia de UV-A, la irradiación solar y ultrasonido, se observó un cambio en la inmovilización que indica que los productos de oxidación presentan diferente toxicidad. (Michael et al., 2014)

Ketoprofeno	<i>P. subcapitata</i> <i>D. magna</i> <i>V. fischeri</i>	O ₃ y O ₃ /UV	<i>V. fischeri</i> tolera el KET mejor, pero <i>D. magna</i> presenta mayor sensibilidad a los productos de transformación, mientras que <i>P. subcapitata</i> fue la más sensible en todos los casos estudiados. Debido a la formación de productos tóxicos ambos tratamientos se deben hacer más tiempo del necesario para la degradación completa de KET: los productos de transformación tóxicos también deben ser degradados (Erzsébet Illés et al., 2014)
-------------	--	-------------------------------------	---

Tabla 4. Reportes de toxicidad de productos farmacéuticos removidos mediante a AOP's

2.2.1.4 Características de los procesos de oxidación avanzada

La clasificación de estos métodos se basa principalmente en el procedimiento empleado para la generación de éstos radicales, ya sea por métodos fotoquímicos, inducidos por la luz, o a través de reacciones químicas de óxido/reducción, asistidas externamente mediante otra fuente de energía. Dentro de las tecnologías existentes, llama la atención los procesos fotocatalíticos empleando TiO₂.

En aplicaciones de fotocatalisis en fase líquida, el compuesto a degradar puede transformarse en toda una serie de compuestos intermedios de la reacción antes de llegar a su completa mineralización. Por lo tanto, para poder verificar la viabilidad del proceso fotocatalítico como técnica para la degradación de contaminantes, resulta importante demostrar que es posible alcanzar la eliminación no solo de los compuestos iniciales, sino también de todos los compuestos intermedios que se generen durante la reacción (Maldonado, 2000).

Sin embargo, la descontaminación fotocatalítica presenta básicamente ciertas limitaciones. Entre otras, la más importante es que no es capaz de tratar volúmenes de efluentes industriales muy grandes ni con concentraciones relativamente elevadas; sumado a que el proceso debe brindar la posibilidad de ser barato, simple y con bajos requerimientos operativos. A pesar de estas limitaciones la fotocatalisis heterogénea en fase líquida presenta un amplio campo de aplicaciones en las que el proceso puede llegar a ser altamente competitivo (Maldonado, 2000).

Por esta técnica, se han estudiado el tratamiento de compuestos fenólicos (Parra et al., 2003) que pueden provenir de una gran variedad de industrias, como por ejemplo, de la industria de la fabricación de resinas fenólicas o de la industria de la celulosa, compuestos orgánicos clorados, como el diclorometano, cloroformo o el pentaclorofenol (Malato, 1999), procedentes de plantas de PVC o industrias madereras, productos farmacéuticos, como los generados durante la producción de antibióticos u otros fármacos que no pueden ser tratados mediante sistemas biológicos (Pérez Estrada et al., 2005). Igualmente se ha analizado la aplicación en la degradación fotocatalítica de cianuros o compuestos relacionados (Augugliaro et al., 1999). Solís-Casados en 2016 reporta la efectividad de utilizar una degradación vía procesos fotocatalítico, menciona que la incorporación de Sn al TiO₂ ayuda para la remoción de contaminantes farmacéuticos, sin embargo, no se sabe concretamente el efecto biológico que puede traer consigo.

2.3 Pruebas biológicas

La información anteriormente presentada, nos lleva a la necesidad de realizar evaluaciones biológicas. Para estos ensayos, se debe elegir un organismo (bioindicador) y una o varias pruebas que permitan evidenciar el daño tras la exposición a cierta sustancia (biomarcadores). Un bioindicador es un organismo vivo que va a permitir determinar y evaluar el daño causado tras la exposición a cierta sustancia de prueba. Estos organismos deben cumplir las siguientes características:

- Alta y constante sensibilidad a tóxicos.
- Alta disponibilidad y abundancia.
- Estabilidad genética y uniformidad en las poblaciones.
- Representatividad de su nivel trófico.
- Significado ambiental en relación con el área de estudio.
- Amplia distribución e importancia comercial.
- Facilidad de cultivo y adaptabilidad a las condiciones de laboratorio

2.3.1 *Hyalella azteca*

Si bien, no todos los bioindicadores cumplen con la totalidad de los requerimientos anteriormente mencionados, es necesario tener en cuenta que en algunos procesos de selección, los investigadores, de acuerdo con cada situación, darán mayor o menor peso a ciertos criterios de selección (Dutka, 1996). Para el presente estudio, se ha seleccionado *Hyalella azteca* como bioindicador, esto debido a que cumple los parámetros anteriormente mencionados.

Por su parte, un biomarcador es definido como un cambio bioquímico, celular, fisiológico o variación de comportamiento que pueden medirse en muestras de tejidos, fluidos corporales o en organismos completos, para proporcionar evidencia de la exposición y / o efectos de uno o más contaminantes (Depledge 1994).

3. JUSTIFICACIÓN

Cada día, debido a las actividades propias de los hospitales, se descargan miles de litros de aguas residuales que presentan compuestos difíciles de remover mediante las técnicas convencionales de tratamiento. Se sabe que por su composición (residuos farmacéuticos metabolizados o no, detergentes, desinfectantes, etc.), son potencialmente tóxicas para organismos acuáticos. Diversos estudios hablan sobre la relevancia ecotoxicológica y los posibles efectos que pueden tener en organismos vivos.

Por otro lado, existen reportes sobre la eficacia de los procesos de oxidación avanzada para la remoción de contaminantes, resaltando entre estos, la degradación vía procesos fotocatalíticos, mediante la incorporación de Sn al TiO_2 . Sin embargo, este tipo de procesos pueden generar gran cantidad de radicales libres pudiendo representar un riesgo a organismos vivos. La medición de la calidad del agua, generalmente se basa en parámetros fisicoquímicos, desatendiendo el posible riesgo que representa a los organismos que entren en contacto con estas, por tanto es indispensable evaluar biológicamente su eficiencia.

Los efluentes hospitalarios representan un reto debido a la complejidad de su composición, existen pocos datos del efecto tóxico de estos efluentes sobre organismos vivos, en particular enfocados a la posible inducción de estrés oxidativo. En el presente trabajo se busca analizar la toxicidad de las aguas residuales provenientes de la Unidad Médico Familiar No. 222 del IMSS antes y después del tratamiento anteriormente mencionado utilizando como bioindicador al organismo centinela *Hyalella azteca*. De comprobarse la eficiencia fisicoquímica y biológica de este método, permitirá ofrecer una alternativa para el tratamiento de aguas residuales con características similares.

4. HIPÓTESIS

El método de oxidación avanzada vía procesos fotocatalíticos, mediante la incorporación de Sn al TiO₂, será útil para la remoción de contaminantes presentes en un efluente industrial, logrando la disminución de la toxicidad del efluente. Esto se evidenciará mediante los resultados obtenidos de las determinaciones de estrés oxidativo al exponer al anfípodo *Hyaella azteca* (antes y después del tratamiento por un proceso avanzado de oxidación estas aguas).

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar biológicamente la eficiencia de un proceso avanzado de oxidación para la remoción de contaminantes de un efluente hospitalario usando *Hyaella azteca* como bioindicador.

Objetivos específicos

- Determinar la CL₅₀ sobre *Hyaella azteca* al ser expuesta a un efluente hospitalario. Antes y después del tratamiento
- Determinar el grado de lipoperoxidación, contenido de hidroperóxidos y contenido de proteínas carboniladas por exposición a un efluente hospitalario sobre *Hyaella azteca* para establecer el daño subletal antes y después del tratamiento
- Determinar la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y catalasa por exposición a un efluente hospitalario sobre *Hyaella azteca* antes y después del tratamiento

6. METODOLOGÍA

6.1 Muestreo del efluente hospitalario.

Las muestras fueron obtenidas del Hospital 220 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en Toluca (Estado de México). Esta es una instalación de 110 camas de importancia regional que proporciona servicios ambulatorios. Ofrece una gama completa de servicios médicos, por ejemplo, medicina interna, clínica de maternidad y radiología. Más de 1 millón de personas se benefician de sus servicios. El hospital no tiene un sistema de tratamiento de aguas residuales.

Se realizó el procedimiento establecido en la norma oficial mexicana para el muestreo de aguas residuales (NMX-AA-003 a 1980). Las muestras se tomaron de la zona de drenaje externo, el cual está conectado directamente a la tubería de desagüe principal del hospital, se recogerán en recipientes de polietileno 20-L con tapón, previamente lavada con ácido nítrico 30% y después con agua desionizada. Las muestras se etiquetaron, estuvieron protegidos de la luz, e inmediatamente transportada al laboratorio para ser almacenadas a 4 ° C. Vale la pena señalar que los efluentes del hospital no reciben ningún tratamiento previo y desembocan directamente en el sistema de alcantarillado municipal de Toluca.

6.2 Obtención de los organismos de estudio.

La *Hyalella azteca* fue colectada de su habitat natural en el lago de San Miguel Almaya, municipio de Chapultepec (Estado de México), y transportada al laboratorio en bolsas de plástico con aireación constante.

Se prepararon sedimentos artificiales para el mantenimiento de los organismos de estudio. El sedimento estuvo conformado por arena 70% (0,2 mm), 20% caolinita (<0,002 mm), y 10% de materia orgánica (0,2 mm). La fuente de materia orgánica fue de composta de cordero inactivado por calor seco a 55-60 ° C durante 3 días. El sedimento se esterilizó con tres ciclos de 15-min en la autoclave a 121 ° C y presión de 15 libras, separados por intervalos de 1 h (Martínez-Tabche et al., 2000).

Se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio en tinas plásticas, con aireación constante y alimentación a base de materia orgánica. Se vigiló su proceso de reproducción y se trabajó con la tercera generación obtenida en el laboratorio.

Posteriormente se realizaron las siguientes determinaciones en los organismos expuestos tanto en el efluente hospitalario sin tratamiento como en las previamente tratadas (proporcionada por el laboratorio de ingeniería química de esta universidad del Centro de Investigaciones de Química Sustentable).

6.3 Determinación de la toxicidad aguda (CL₅₀)

Los sistemas de pruebas se realizaron en recipientes de polietileno de 20 mL, conteniendo una relación de 3:1 de agua reconstituida y sedimento artificial bajo un fotoperiodo horas luz/oscuridad de 16 h: 08 h a temperatura ambiente. Los sistemas de intoxicación fueron estáticos sin renovación de medio, no se proporcionó alimento a los especímenes durante los períodos de exposición.

La concentración letal media (CL₅₀) de las aguas residuales en *H. azteca* se determinó a través de cinco pruebas en sistemas con diferentes concentraciones de aguas residuales y un sistema de control libre de aguas residuales. Cada uno contenía diez especímenes. Los especímenes muertos se contaron después de 96 horas. Se realizaron cinco repeticiones del ensayo. Posteriormente, los resultados obtenidos se sometieron a un análisis Probit y la significancia se evaluó por el grado de 95% de superposición LC₅₀ (v1.5 Programa de Análisis de la EPA).

6.4 Ensayo de toxicidad subletal

En el ensayo de toxicidad subletal se usaron sistemas de prueba enriquecidos con agua residual/ kg de sedimento (equivalente a una décima parte de la CL₅₀). Se añadió peso húmedo de *H. azteca* (se usaron organismos enteros, vivos y sanos). Los tiempos de exposición empleados fueron de 0, 12, 24, 48, 72 y 96 h después de lo cual se eliminaron las muestras de ensayo suspendidas en 1 ml de solución de tampón Tris (pH 7). La mezcla se mantuvo en un baño de hielo durante todo el procedimiento y homogeneizado. El sobrenadante se centrifugó a 12.500 rpm y -4 ° C durante 15 min.

Se evaluaron los siguientes marcadores: LPO, actividad de enzimas antioxidantes SOD y CAT, y PCC para determinar el contenido de proteína oxidada. El contenido total de proteína se utilizará para expresar los resultados de todos los biomarcadores empleados. Todas las pruebas se realizaron

en el sobrenadante excepto para la determinación de LPO en que se utilizó el precipitado celular. Se realizaron cinco repeticiones del ensayo.

6.4.1 Determinación del grado de lipoperoxidación.

LPO se determinó por el método de Buege y Aust (1978). La pared celular se reconstituye con tampón Tris HCl (pH 7.4) para alcanzar un volumen de 5 ml. Un mililitro de esta solución se tomó y fue incubará a 37 ° C durante 30 min; 2 ml de reactivo TCA-TBA (0,375% tiobarbitúrico, se añade ácido en ácido tricloroacético al 15%), y la muestra se agita en un vórtice, después se colocan en un baño de agua hirviendo durante 45 min, y se deja enfriar, y el precipitado se elimina por centrifugación a 3000 rpm durante 10 min. Se lee la absorbancia a 535 nm usando una reacción de blanco. Los resultados se expresan como millimoles de malondialdehído por miligramo de proteína usando la extinción molar coeficiente de $1,56 \times 10^5$ M/cm.

6.4.2 Determinación de contenido de proteínas carboniladas.

PCC se determina por el método de Levine et al. (1994). Las proteínas solubles se obtendrán por centrifugación de las muestras a 10.500 rpm durante 30 min. Para 100 µl de este sobrenadante se añaden 150 µl de 10 mM dinitrofenilhidrazina en HCl 2 M (Sigma) antes de la de incubación a temperatura ambiente durante 1 h en la oscuridad. A continuación se añaden 500 µl de ácido tricloroacético al 20%, y la muestra se deja reposar durante 15 min a 4 ° C, a continuación, se centrifuga a 16.000 rpm durante 5 min. El brote se enjuaga tres veces en 01:01 etanol / acetato de etilo (Baker), disuelto en 150 µl de guanidina 6 M (Sigma), pH 2.3, y se incuba a 37 ° C durante 30 min. Se lee la absorbancia a 366 nm, y los resultados son expresada como nanomoles de carbonilos reactivos formados (C=O) por miligramo de proteína en base a su coeficiente de extinción molar de 21.000 M / cm.

6.4.3 Determinación de proteínas totales.

Para 25 µl de sobrenadante se añadirán 75 µl de agua desionizada y 2,5 ml de reactivo de Bradford (0.05 g de colorante azul de Coomassie, 25 ml de etanol al 96%, y 50 ml de H₃PO₄, en 500 ml de agua desionizada). Los tubos se agitan y se dejaran reposar durante 5 minutos antes a la lectura de la absorbancia a 595 nm y se realizará la interpolación en una curva de albúmina bovina (Bradford 1976).

6.4.4 Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa.

La actividad de SOD se determinará de acuerdo a Misra y Fridorich (1972). Para 20 μL de sobrenadante a una cubeta de 1 cm se añaden 150 μL de una solución tampón de carbonato (carbonato de sodio 50 mM y 0.1 mM EDTA), pH 10.2, y adrenalina 100 μL (30 mM). Se lee la absorbancia a 480 nm, a 30 s y 5 min. La actividad de SOD se determina mediante la interpolación de los datos en una curva. Los resultados se expresaran como SOD UI por miligramo de proteína.

6.4.5 Determinación de la actividad de la catalasa.

La actividad CAT se determinará de acuerdo con Radi et al. (1991). Para 20 μL sobrenadante se añade 1 ml de una solución tampón de aislamiento (0.3 M de sacarosa, 1mM EDTA, 5 mM de HEPES, y 5 mM de KH_2PO_4) y 0.2 ml de peróxido de hidrógeno (20 mM). Se lee la absorbancia a 240 nm, a los 0 y 60 s. Los resultados se obtienen mediante la sustitución del valor de absorbancia de cada lectura en la fórmula: concentración de catalasa= $(A_{60}-A_0) / \text{MEC}$, donde el MEC de H_2O_2 es igual a 0.043 mm / cm. Los resultados se expresan como milimoles de H_2O_2 por miligramo de proteína.

6.5 Diseño estadístico

La evaluación estadística de los resultados obtenidos en el ensayo de estrés oxidativo se realizará mediante la aplicación de un análisis de la varianza de una vía (ANOVA), y las diferencias entre las medias se comparan con las pruebas de comparaciones múltiples Tukey-Kramer, con $p < 0,05$. Para este propósito, se utilizará el paquete SPSS (versión 10, SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.).

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización de las aguas del efluente hospitalario

As (mg L ⁻¹)	0.2	0.75	0.016 ± 0.001
Cd (mg L ⁻¹)	0.2	0.75	0.042 ± 0.001
Cu (mg L ⁻¹)	6.0	15	0.204 ± 0.003
Cr (mg L ⁻¹)	1.0	0.75	0.050 ± 0.001
Hg (mg L ⁻¹)	0.01	0.015	0.021 ± 0.001
Ni (mg L ⁻¹)	4	6	0.180 ± 0.002
Pb (mg L ⁻¹)	0.4	1.5	0.127 ± 0.001
Zn (mg L ⁻¹)	20	9	0.211 ± 0.001
DCF (ng L ⁻¹)	NI	NI	6.5 ± 0.3
IBP (ng L ⁻¹)	NI	NI	71.7 ± 0.4
NPX (ng L ⁻¹)	NI	NI	123.5 ± 0.2
PCM (ng L ⁻¹)	NI	NI	0.4 ± 0.001

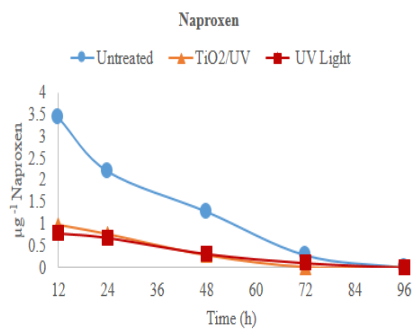
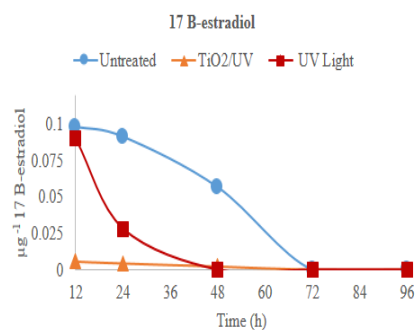
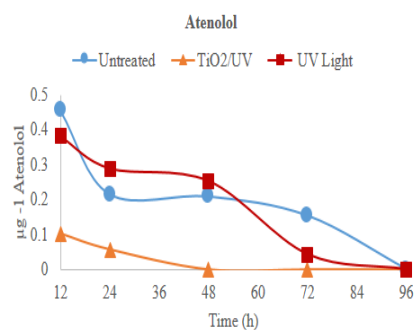
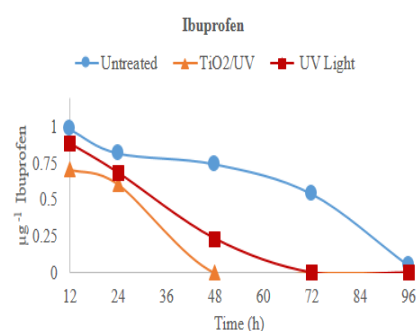
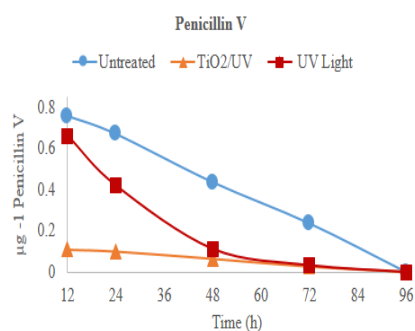
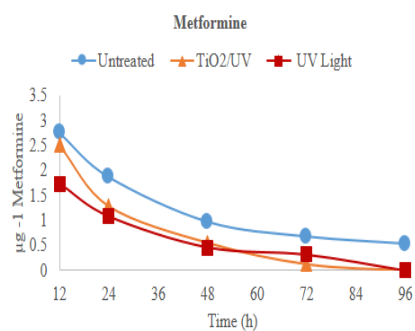
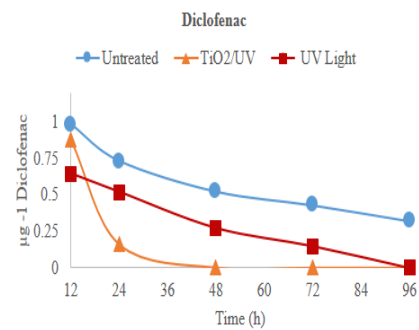
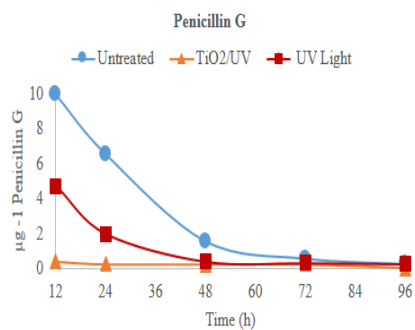
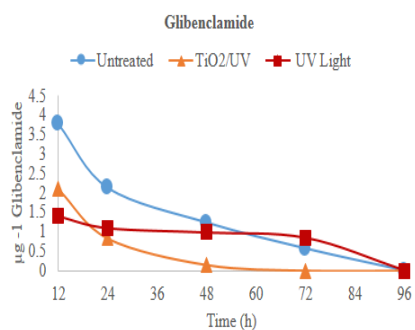
Physicochemical characteristics	NOM-001-SEMARNAT-1996	NOM-073-ECOL-1994	Untreated hospital effluent	Hospital effluent after UV treatment	Hospital effluent after TiO ₂ /UV treatment
Temperature (°C)	40	40	15.8	16.3	16.8
Dissolved oxygen (mg L⁻¹)	NI	NI	14.3	13.8	13.5
Conductivity (μS cm⁻¹)	NI	NI	152.3	131.8	129.3
pH	6.5-8.5	6-9	7.1	6.8	6.6
Chlorides (mg L⁻¹)	Maximum 250	NI	174	25	12.6
Fluorides (mg L⁻¹)	0-15	NI	7.1	0.9	0.4
Hardness (mg L⁻¹)	Maximum 500	NI	323.6	111.8	98.3
Ammonia (mg L⁻¹)	NI	NI	0.93	0.25	0.12
Total suspended solids (mg L⁻¹)	60	150	43	25	0
Total phosphorous (mg L⁻¹)	10	10	8.3	2.9	2.1
Total nitrogen (mg L⁻¹)	25	NI	22	11	7
Chemical oxygen demand COD (mg L⁻¹)	NI	300	213	76	48
Biochemical oxygen demand BOD (mg L⁻¹)	60	100	42	19	12
NaClO (mg L⁻¹)	NI	NI	1.3	0.8	0
Total organic carbon TOC (mg L⁻¹)	NI	NI	412	121	18

7.2 Remoción de fármacos del efluente hospitalario

Pharmaceutical	Time (h)	Untreated effluent	UV Treatment	Reduction of UV with respect to control (%)	TiO ₂ /UV Treatment	Reduction of TiO ₂ /UV with respect to control (%)
Glibenclamide (µg/L)	12	3.77	1.408	62.6	2.098	44.4
	24	2.128	1.100	48.3	0.826	61.1
	48	1.234	0.987	20.0	0.145	88.2
	72	0.567	0.850	49.9	0	100
	96	0.468	0	100	0	100
Metformine (µg/L)	12	2.761	1.738	37.1	2.51	9.1
	24	1.873	1.082	42.2	1.289	31.6
	48	0.974	0.462	52.6	0.556	42.7
	72	0.679	0.318	53.2	0.128	81.1
	96	0.536	0	100	0	100
Atenolol (µg/L)	12	0.456	0.381	16.4	0.102	77.6
	24	0.215	0.289	34.4	0.057	73.5
	48	0.209	0.209	0	0	100
	72	0.154	0.043	72.1	0	100
	96	0	0	100	0	100
Penicillin G (µg/L)	12	9.951	4.709	52.7	0.4	95.9
	24	6.548	1.973	69.8	0.229	96.6
	48	1.563	0.392	74.9	0.226	85.9
	72	0.564	0.306	45.7	0.229	61
	96	0.248	0.257	3.6	0	100

Pharmaceutical	Time (h)	Untreated effluent	UV Treatment	Reduction of UV with respect to control (%)	TiO ₂ /UV Treatment	Reduction of TiO ₂ /UV with respect to control (%)
Penicillin V (µg/L)	12	0.758	0.662	12.7	0.110	85.5
	24	0.67	0.42	37.3	0.101	85.1
	48	0.436	0.112	74.3	0.065	85.1
	72	0.236	0.033	86.0	0.026	89.0
	96	0	0	100	0	100
17 β-estradiol (µg/L)	12	0.0983	0.0902	8.2	0.0058	94.1
	24	0.0914	0.0283	69.0	0.0045	95.1
	48	0.0567	0	100	0.0023	95.9
	72	0	0	100	0	100
	96	0	0	100	0	100
Diclofenac (µg/L)	12	0.982	0.645	34.3	0.876	10.8
	24	0.732	0.52	29.0	0.159	78.3
	48	0.523	0.273	47.8	0	100
	72	0.429	0.149	65.3	0	100
	96	0.321	0	100	0	100
Ibuprofen (µg/L)	12	0.986	0.892	9.53	0.712	10.8
	24	0.821	0.689	16.1	0.61	78.3
	48	0.746	0.234	68.6	0	100
	72	0.542	0	100	0	100
	96	0.05	0	100	0	100
Naproxen (µg/L)	12	3.425	0.786	77.1	0.97	71.7
	24	2.2	0.68	69.1	0.756	65.6

Pharmaceutical	Time (h)	Untreated effluent	UV Treatment	Reduction of UV with respect to control (%)	TiO ₂ /UV Treatment	Reduction of TiO ₂ /UV with respect to control (%)
	48	1.28	0.314	75.5	0.274	78.6
	72	0.286	0.104	63.6	0	100
	96	0	0	100	0	100

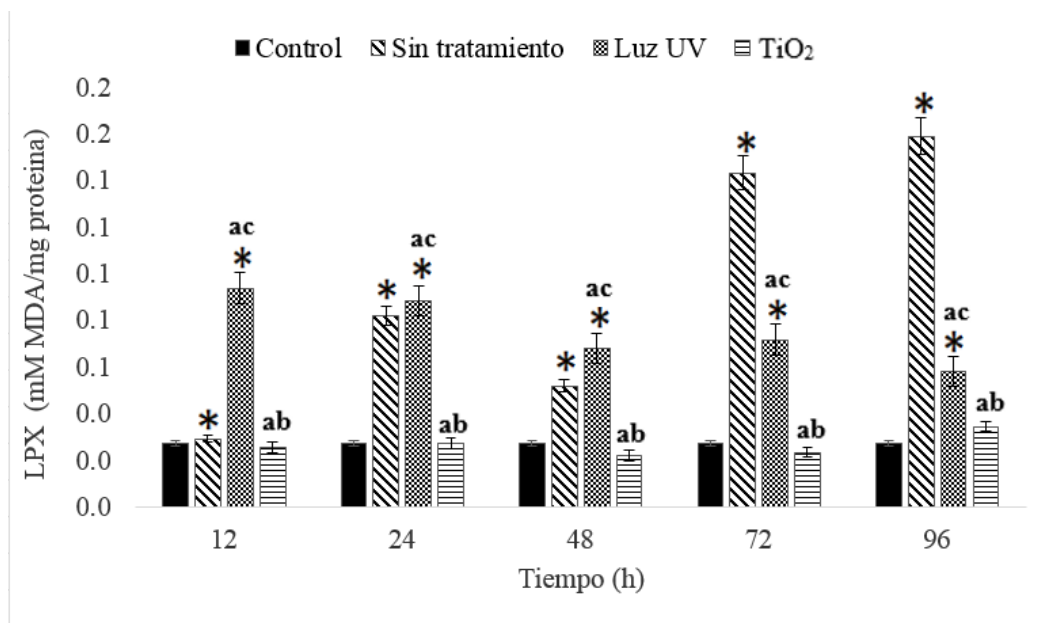


7.3 Toxicidad aguda del efluente hospitalario

Muestra / tratamiento	CL ₅₀	Intervalo
Sin tratamiento	5.623 %	5.024 – 6.219
UV	5.824 %	5.247 – 6.125
TiO ₂ -UV	7.820 %	7.460 – 8.174

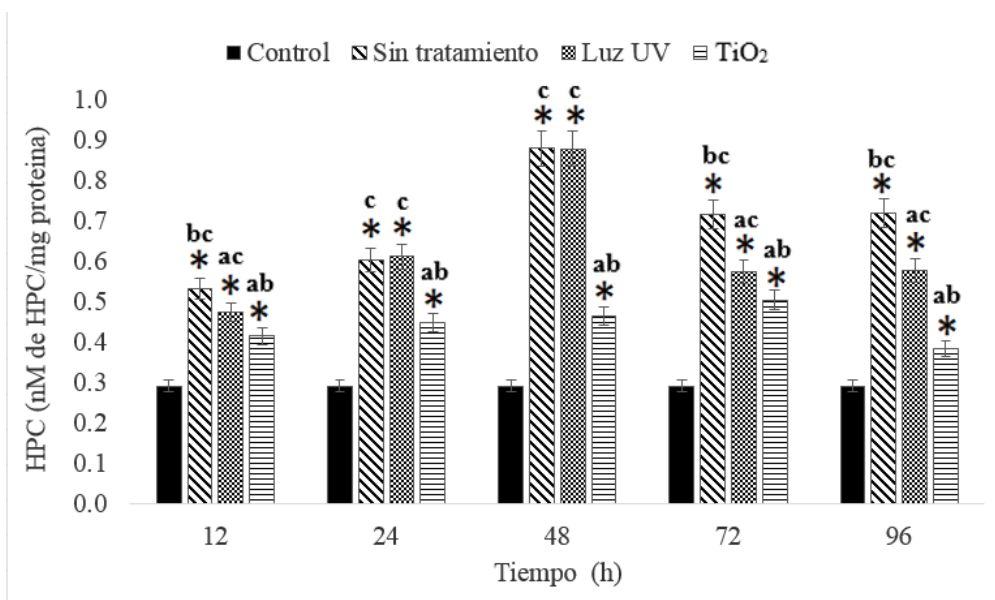
7.4 Toxicidad subletal del efluente hospitalario sobre *Hyaella azteca*

7.4.1 Determinación del grado de lipoperoxidación



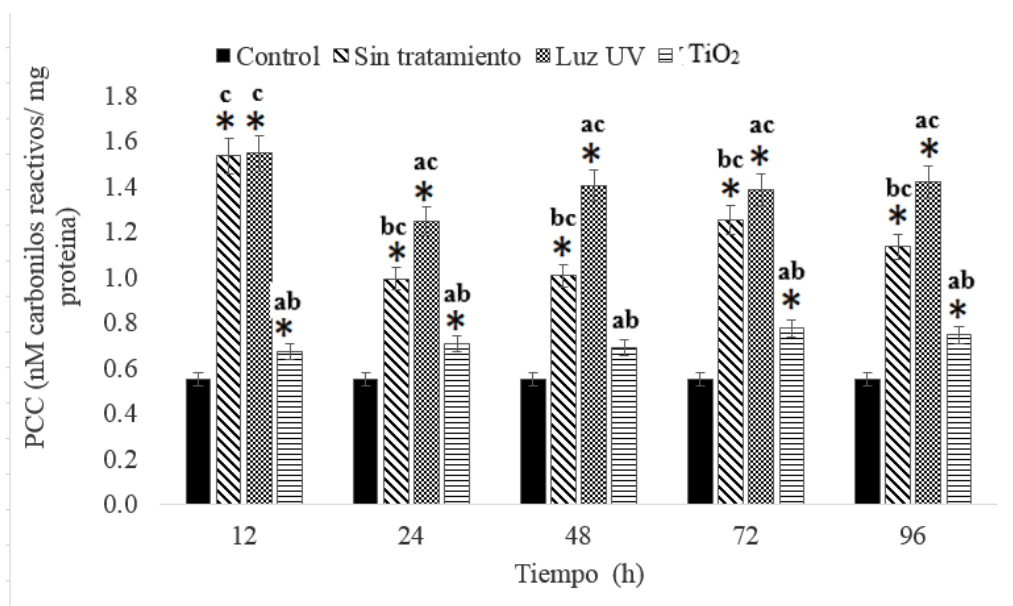
Gráfica 1. Niveles de lipoperoxidación en *Hyaella azteca* expuestas a aguas de un efluente hospitalario sin tratamiento, tratadas con luz UV y tratadas con TiO₂-UV

7.4.2 Determinación de proteínas hidroperóxidos



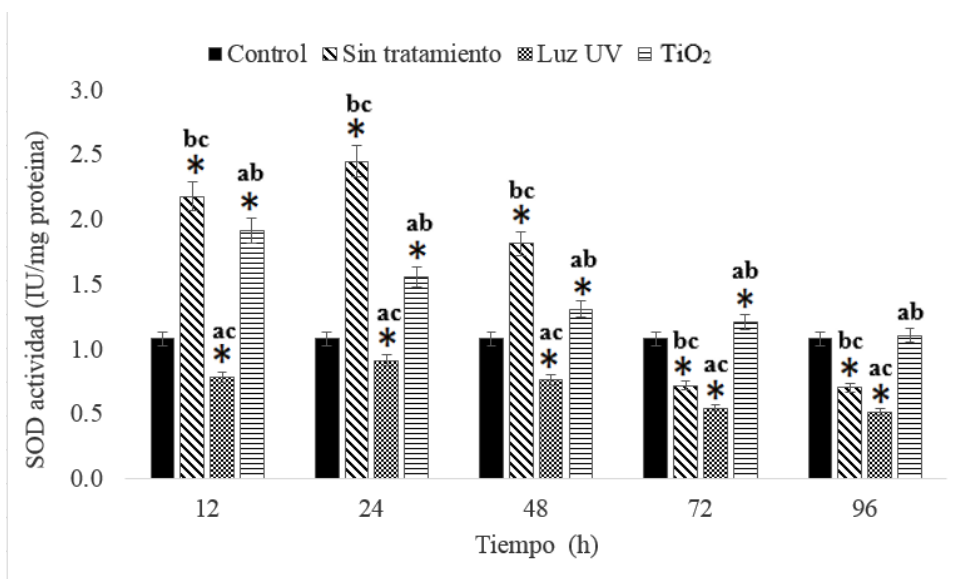
Gráfica 2. Niveles de hidroperóxidos en *Hyalella azteca* expuestas a aguas de un efluente hospitalario sin tratamiento, tratadas con luz UV y tratadas con TiO₂-UV

7.4.3 Determinación de proteínas carboniladas



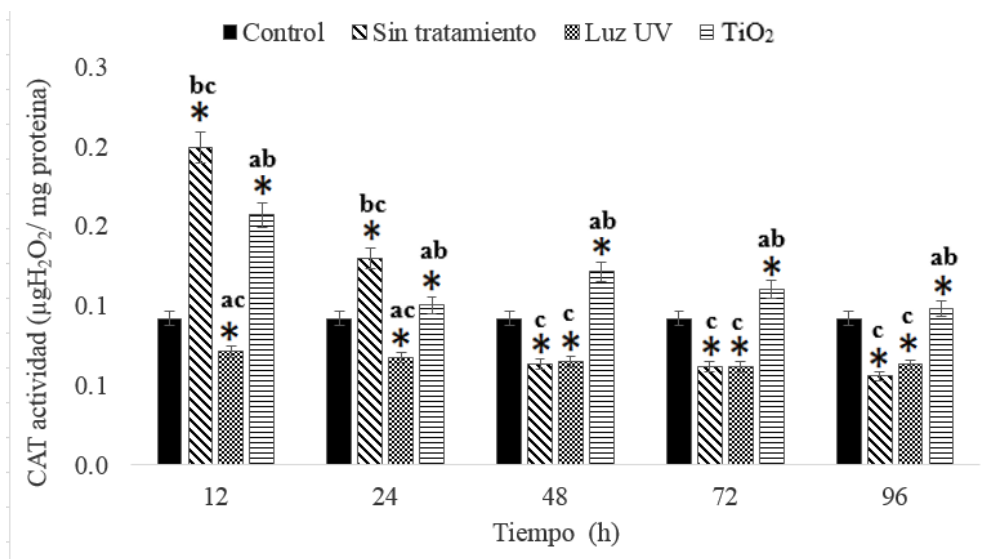
Gráfica 3. Niveles de proteínas carboniladas en *Hyalella azteca* expuestas a aguas de un efluente hospitalario sin tratamiento, tratadas con luz UV y tratadas con TiO₂-UV

7.4.4 Determinación de la superóxido dismutasa



Gráfica 4. Niveles de actividad de la superóxido dismutasa en *Hyalella azteca* expuestas a aguas de un efluente hospitalario sin tratamiento, tratadas con luz UV y tratadas con TiO₂-UV

7.4.5 Determinación de la catalasa



Gráfica 5. Niveles de actividad de la catalasa en *Hyalella azteca* expuestas a aguas de un efluente hospitalario sin tratamiento, tratadas con luz UV y tratadas con TiO₂-UV

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achilleos A., Hapeshi E., Xekoukoulotakis P., Mantzavinos D., Fatta-Kassinos D. 2010. Factors affecting diclofenac decomposition in water by UV-A/TiO₂ photocatalysis. *Chemical Engineering Journal* 161 (2010) 53–59
- Aguinaco A, Beltrán F.J., García-Araya J.F., Oropesa A. 2012. Photocatalytic ozonation to remove the pharmaceutical diclofenac from water: Influence of variables. *Chemical Engineering Journal* 189–190 (2012) 275–282.
- Akpan U.G., B.H. Hameed, J. (2009) *Hazard. Mater.* 170, 520
- Ashton D, Hilton M, Thomas K. Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Sci. Total Environ.* 2004; 33: 131-140.
- Barceló D (2007). Contaminantes emergentes. Departamento de Química Ambiental en el Instituto de Investigación Química Ambiental (CSIC) Barcelona [Serie en Línea] Disponible en URL: <http://www.abc.es/informacion/natural/071224-damia-barcelo.asp>
- Baur, S., Schmidt, H., Krämer, A., Gerber, J., (2005).” The destruction of industrial aqueous waste containing biocides in supercritical water-development of the SUWOX process for the technical application.” *J. Supercrit. Fluids*, 33 (2), 149-157.
- Bedner M, Maccrehan W. 2006. Transformation of acetaminophen by chlorination produces the toxicants 1,4-benzoquinone and N-acetyl-p-benzoquinone imine. *Environ. Sci. Technol.* 40, 516-522.
- Boxal, Alistair B.A., (2012). New and Emerging Water Pollutants Arising from Agriculture. Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD).
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microorganism quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254
- Büege JA, & Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 52:302–310
- Burn L, Bernier M, Losier R, Doe K, Jackman P y Lee H. 2006. Pharmaceutically Active Compounds in Atlantic Canadian Sewage Treatment Plant Effluents and receiving waters and Potential for Environmental effects as Measured by Acute and Chronic Aquatic Toxicity. *Environ Toxicol Chem.* 26 Suppl 8: 2163-2176.

- Carlsson C, Johansson A, Alvan G, Bergmann K, Kühler T. (2006). Are pharmaceuticals potent environment pollutants? Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. *Sci. Total Environ.* 364: 67-87.
- Cleuvers M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol.Lett.* 142 (3), 185-194.
- CONAGUA (2014). Estadísticas del Agua en México. Capítulo 2 situación de los recursos hídricos. Pag 23-55
- CONAGUA. (2011). Estadísticas del agua en México. Capítulo 8 Agua en el mundo. México. Pag 114-126
- De Jongh, C.M., Kooij, P.J., Voogt, P., Laak, T.L. (2012). Screening and health risk assessment of pharmaceuticals and their transformation products in Dutch waters and drinking water. *Science of the Total Environment*, 427-428, 70-77.
- Depledge MH, Fossi MC. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment 2. *Invertebrates. Ecotoxicology* 3:161–172.
- Dutka, B.J., 1996, Bioassays: a Historical Summary of those Used and Developed in our Laboratories at NWRI. National Water Research Institute, Environment Canada, Burlington. 93 pp
- EPA. (2014). Water: Contaminants of Emerging Concern. Disponible en: <http://water.epa.gov/scitech/cec/>. 21 de octubre de 2016.
- Erzsébet Illés, Emese Szabó, Erzsébet Takács, László Wojnárovits, András Dombi, Krisztina Gajda-Schranz. 2014. Ketoprofen removal by O₃ and O₃/UV processes: Kinetics, transformation products and ecotoxicity. *Science of the Total Environment* 472 (2014) 178–184
- Erzsébet Illés, Emese Szabó, Erzsébet Takács, LászlóWojnárovits, András Dombi, Krisztina Gajda-Schranz. Ketoprofen removal by O₃ and O₃/UV processes: Kinetics, transformation products and ecotoxicity. *Science of the Total Environment* 472 (2014) 178–184
- Felis E, Marciocha D, Surmacz-Gorska J, Miksch K. (2007) Photochemical degradation of naproxen in the aquatic environment. *Water Sci Technol*; 55 (12): 281-6.
- Fent K, Weston A, Caminada D. 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat.Toxicol.* 76, 122-159.
- Ferré M, Ferrer I, Ginebrada A, Figueras M, Olivella L, Tirapu L, et al. Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography–mass

spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. *J Chromatogr A* 2001; 938:187–97.

- Gómez-Oliván LM, Neri-Cruz N, Galar-Martínez M, Vieyra-Reyes P, García-Medina S, Razo-Estrada C, Dublán-García O, Corral-Avitia AY. (2012). Assessing the oxidative stress induced by paracetamol spiked in artificial sediment on *Hyalella azteca*. *Water, Air, & Soil Pollution* 223(1): 5097–5104.
- González-González E.D., Gómez-Oliván LM., Galar-Martínez M., Vieyra-Reyes P., Islas-Flores H., García-Medina S., Jiménez-Vargas J.M., Razo-Estrada C., Pérez-Pastén R. (2014). Metals and Nonsteroidal Anti-inflammatory Pharmaceuticals Drugs Present in Water from Madín Reservoir (Mexico) Induce Oxidative Stress in Gill, Blood, and Muscle of Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Arch Environ Contam Toxicol* (2014) 67:281–295.
- Hayashi Y, Heckmann LH, Callaghan A, Sibly RM. 2008. Reproduction recovery of the crustacean *Daphnia magna* after chronic exposure to ibuprofen. *Ecotoxicology*.
- Hui Yu, Er Nie, Jun Xu, Shuwen Yan, William J. Cooper, Weihua Song. 2013. Degradation of Diclofenac by Advanced Oxidation and Reduction Processes: Kinetic Studies, Degradation Pathways and Toxicity Assessments. *water research* 47 (2013) 1909-1918
- Isidori M, Lavorgna M, Nardelli A, Parrella A, Previtera L, Rubino M. Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products. *Sci Total Environ* 2005; 348 (1-3): 93-101.
- Jones OA, Voulvoulis N, Lester JN. 2002. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Res.* 36, 5013-5022
- Khetan S, Collins T. 2007. Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment; A Challenge to Green Chemistry. *Chemical Review.* A-AT
- Kümmerer K (2001). Drugs in the Environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources- a review. *Chemosphere.*, 45:957-969
- Langford K., Thomas K. (2009). Determination of pharmaceutical compounds in hospital effluents and their contribution to wastewater treatment Works. *Environment International* 35 (2009) 766–770.
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol* 233: 346-357
- Lindqvist N, Tuhkanen T, Kronberg L. Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewage and in receiving waters. *Water Res* 2005; 39 (11): 2219-28.
- Maldonado S. Suárez, N. Miranda-García, B. Sánchez. 2000. Fotocatálisis solar mediante TiO₂ inmovilizado. *Plataforma Solar de Almería-CIEMAT.* Almería- Avda.

- Marijana Marković, Milica Jović, Dalibor Stanković, Vesna Kovačević, Goran Roglič, Gordana Gojgić-Cvijović, Dragan Manojlović. 2015. Application of non-thermal plasma reactor and Fenton reaction for degradation of ibuprofen. *Science of the Total Environment* 505 (2015) 1148–1155
- Martínez-Tabche L, Gutiérrez CI, Gómez OL, Galar MM, Germán FC (2000) Toxic effects of zinc from trout farm sediments on ATP, protein and haemoglobin concentrations in *Limnodrilus hoffmeisteri*. *Toxicol Environ Health* 59:575-583
- Michael, I., A. Achilleosa, D. Lambropoulou, V. Osorio Torrens, S. Pérez, M. Petrović, D. Barceló, D. Fatta-Kassinos. 2014. Proposed transformation pathway and evolution profile of diclofenac and ibuprofen transformation products during (sono)photocatalysis. *Applied Catalysis B: Environmental* 147 (2014) 1015– 1027
- Misra HP, & Fridovich I (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247:3170–3175
- Mons, M.N., Hoogenboom, A.C., Noij, T.H.M., (2003). Pharmaceuticals and drinking water supply in the Netherlands. KWR, Nieuwegein, the Netherlands, pag 76.
- Neri-Cruz, N., Gómez-Oliván, LM., Galar-Martínez M., Romero-Figueroa, MS., Islas-Flores, H., García-Medina, S., Jiménez-Vargas, JM., SanJuan-Reyes, N. (2014). Oxidative stress in *Cyprinus carpio* induced by hospital wastewater in México. *Ecotoxicology*. DOI 10.1007/s10646-014-1371-y
- NMX-AA-003-1980. Norma Oficial Mexicana. Aguas residuales, muestreo. Procuraduría Federal de Protección al Ambiente. Diario Oficial de la Federación 25-03-1980.
- Oosterhuis, M., Groteboer, A., Van der Wiele, P.J. (2011). Emissie geneesmiddelen bij de bron aanpakken. *H₂O*. 30-33.
- Oviedo-Gómez DGC, Galar-Martínez M, García-Medina S, Razo-Estrada C, Gómez-Oliván LM. 2010. Diclofenac-enriched artificial sediment induces oxidative stress in *Hyalella azteca*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2010; 29 (1): 39-43.
- Pépin JM. (2006). Impacts écotoxicologiques de certains médicaments dans l'environnement. Essai présenté au Centre Universitaire de Formation en Environnement en vue de l'obtention du grade de maître en environnement. Sherbrooke, Québec, Canada.
- Persoone G, Wells P. Artemia in aquatic toxicology—a review. In: Sorgeloos P, Bengtson DA, Declerck W, Jaspers E, editors. Artemia research and its applications. Morphology, genetics, strain characterisation, toxicology. Wetteren: Universa Press; 1987. p.259–75. genetics, strain characterisation, toxicology. Wetteren: Universa Press; 1987. p. 259–75.

- Petrovic M, Gonzalez S, Barcelo D (2003) TRAC-Trends Anal. Chem. 22, 685
- Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush K M, Carpo JD, & Freeman BA (1991) Detection of catalase in rat heart mitochondria. J. Biol. Chem. 266:22028–22034
- Ravi Naidu, Victor Andres Arias Espana, Yanju Liu a, Joytishna Jit. (2016). Emerging contaminants in the environment: Risk-based analysis for better management. Chemosphere 154 (2016) 350e357
- Richards SM, Cole SE. A toxicity and hazard assessment of fourteen pharmaceuticals to *Xenopus laevis* larvae. (2006) Ecotoxicology 15, 647–656.
- RIWA (2011 a). Jaarrapport 2010 De Rijn. RIWA Rijn, Nieuwegein 216
- RIWA (2011 b). Jaarrapport 2010 Mass. RIWA 56
- Rizzo L., MERIC S., Kassinis D., Guida M., Russo F., Belgiorno V. 2009. Degradation of diclofenac by TiO₂ photocatalysis: UV absorbance kinetics and process evaluation through a set of toxicity bioassays. water research 43 (2009) 979–988
- SanJuan-Reyes, N., Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., Vieyra-Reyes, P., García-Medina, S., Islas-Flores, H., Neri-Cruz, N., 2013. Effluent from an NSAID-manufacturing plant in México induces oxidative stress on *Cyprinus carpio*. Water Air Soil Pollut. 224 (9), 1–14.
- Santos L., Gros M., Rodriguez-Mozaz S., Delerue-Matos C., Pena A., Barceló D., Montenegro M. (2013). Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. Science of the Total Environment 461–462 (2013) 302–316
- Schreiber F, Szewzyk U. (2008). Environmentally relevant concentrations of pharmaceuticals influence the initial adhesion of bacteria. Aquat Toxicol 2008; 87 (4): 227-33.
- Solís-Casados, DA., Alcantara-Cobos, A., Gómez-Oliván, LM., Klimova, T., Escobar-Alarcón, L. (2016). Síntesis de catalizadores basados en TiO₂ modificado con Sn: Caracterización y evaluación de su desempeño fotocatalítico en la degradación de AINEs presentes en aguas residuales. Superficies y Vacío 29 (1) 24-31
- Stülten D, Zühlke S, Lamshöft M, Spitteller M. Occurrence of diclofenac and selected metabolites in sewage effluents. Sci Total Environ 2008; 405 (1-3): 310-6.
- Sushil K y Collins T (2007). Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Challenge to Green Chemistry. Department of Chemistry, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, Pennsylvania. 15:213-233

- Ter Laak, T.L., van der Aa, M., Houtman, C., Stoks, P., van Wezel, A. (2010). Temporal and spatial trends of pharmaceuticals in the Rhine. Association of River Waterworks, RIWA, Nieuwegein, the Netherlands 44
- Ternes TA, Joss A, Siegrist H. 2004. Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. *Environ. Sci. Technol.* 38, 393-398.
- Verlicchi P, Galletti A, Petrovich M, Barceló D. (2010). Hospital effluents as a source of emerging pollutants: an overview of micropollutants and sustainable treatment options. *Journal of Hydrology* 2010; 389: 416-428.
- Verlicchi P., Galletti A., Petrovic M., Barceló D. (2010). Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options. *Journal of Hydrology* 389 (2010) 416–428.
- Verlicchi, P., Aukidy, M., Zambello, E. (2012). Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment-A review. *Science of the Total Environment* 429: 123-155.
- Versteegh, J.F.M., Stolker, A.A.M., Niesing, W., Muller, J.J.A., (2003). Geneesmiddelen in drinkwater en drinkwaterbronnen. Resultaten van het meetprogramma 2002. Bilthoven, the Netherlands, p. 45.
- Versteegh, J.F.M., Stolker, A.A.M., Niesing, W., Muller, J.J.A., (2007). Geneesmiddelen in drinkwater en drinkwaterbronnen. Resultaten van het meetprogramma 2005/2006. RIVM Bilthoven, pag 53.
- Wei Zhang, Linda Zou, Lianzhou Wang (2009) Photocatalytic TiO₂/adsorbent nanocomposites prepared via wet chemical impregnation for wastewater treatment: A review *Applied Catalysis A: General. Journal of Environmental Management* 371:1-9.
- Won-Jin Sim, Ji-Woo Lee, Eung-Sun Lee, Sun-Kyoung Shin, Seung-Ryul Hwang, Jeong-Eun Oh (2011). Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. *Chemosphere* 82 (2011) 179–186
- Zhang X, Wu F, Wu X, Chen P, Deng N. 2008. Photodegradation of acetaminophen in TiO₂ suspended solution. *J. Hazard. Mater.* 157(2-3), 300-307.
- Zuccato E, Castiglioni D, Fanelli R, Reitano G y Bagnati R. 2006. Pharmaceuticals in the environment in Italy: causes, occurrence, effects and control. *Environ Sci & Pollut Res.* 13 (1): 15-21.

9. ANEXOS

9.1 Artículos



Oxidative stress induced in *Hyalella azteca* by an effluent from a NSAID-manufacturing plant in Mexico

Karen Adriana Novoa-Luna¹ · Rubí Romero-Romero² · Reyna Natividad-Rangel² ·
Marcela Galar-Martínez³ · Nely Sanjuan-Reyes¹ · Sandra García-Medina³ ·
Catalina Martínez-Vieyra¹ · Nadia Neri-Cruz¹ · Leonardo Manuel Gómez-Oliván¹

Accepted: 25 May 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Production in the pharmaceutical industry has increased and along with it, the amount of wastewater of various characteristics and contaminant concentrations. The main chemicals in these effluents are solvents, detergents, disinfectants—such as sodium hypochlorite (NaClO)—and pharmaceutical products, all of which are potentially ecotoxic. Therefore, this study aimed to evaluate the oxidative stress induced in the amphipod *Hyalella azteca* by the effluent from a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-manufacturing plant. The median lethal concentration (72 h-LC₅₀) was determined and *H. azteca* were exposed to the lowest observed adverse effect level (0.0732 %) for 12, 24, 48 and 72 h, and biomarkers of oxidative stress were evaluated [hydroperoxide content (HPC), lipid peroxidation (LPX), protein carbonyl content (PCC), and the activity of the superoxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx)]. Statistically significant increases with respect to the control group ($P < 0.05$) were observed in HPC, LPX and PCC in *H. azteca* at all

exposure times. Antioxidant enzymes activity SOD, CAT and GPx activity also increased significantly ($P < 0.05$) with respect to the control group. In conclusion, the industrial effluent analyzed in the present study contains NSAIDs and NaClO, and induces oxidative stress in *H. azteca*.

Keywords *Hyalella azteca* · Oxidative stress · Nonsteroidal anti-inflammatory drugs · NaClO · Amphipod

Introduction

Industrial effluents are mixtures of toxic substances and therefore a main source of direct and continuous input of pollutants into aquatic ecosystems. For this reason, the study of the effects of effluent exposure on organisms, populations or communities has high ecological relevance (Silva et al. 2002; Backhaus et al. 2003; Snodden et al. 2004).

Approximately 3000 compounds are used as medicine, and the annual production amount exceeds hundreds of tons (Sarmah et al. 2006; Calisto and Esteves 2009). Once administered, pharmaceuticals are excreted as the parent compound or active metabolites, and can reach the environment at different extents (Zucconi et al. 2005). These products can also enter the water bodies as a result of the disposal of unused or expired medications (Stackelberg et al. 2004). Water treatment plants, hospitals and the pharmaceutical industry are the principal sources of contamination by pharmaceutical agents (Nikolaou et al. 2007).

Production in the pharmaceutical industry has increased and along with it, the amount of wastewater discharges of various characteristics and contaminant concentrations,

Leonardo Manuel Gómez-Oliván
lmgomez@uamex.mx; lgoivan74@gmail.com

¹ Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Calón Intersección Paseo Toluca s/n, Col. Residencial Calón, 50120 Toluca, State of Mexico, Mexico

² Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEM-UNAM, Carretera Toluca-Atlixcoatlán Km 14.5, Unidad San Cayetano, 50200 Toluca, State of Mexico, Mexico

³ Laboratorio de Toxicología Acuática, Sección de Graduados e Investigación, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Plan de Ayala y Carpio s/n, 11340 Mexico, D.F., Mexico

WATE-D-19-00150 - Submission Confirmation



em.wate.0.60c730.562cc94a@editorialmanager.com en nombre de WATE <em@editorialmanager.com>



Responder a todos | v

Hoy, 01:57 a.m.

Leobardo Manuel Gomez Oliván ✉

Dear Dr. Gómez-Oliván,

Thank you for submitting your manuscript, "Biological evaluation of an effluent before and after a treatment with Sn-modified TiO₂ under UV irradiation through oxidative stress biomarkers", to *Water, Air, & Soil Pollution*

The submission id is: WATE-D-19-00150
Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript.

Your username is: lmgomezo

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at <https://www.editorialmanager.com/wate/>.

If your manuscript is accepted for publication in *Water, Air, & Soil Pollution*, you may elect to submit it to the Open Choice program. For information about the Open Choice program, please access the following URL: <http://www.springer.com/openchoice>

Alternatively, please call us at 001-630-468-7784 (outside the US)/(630)-468-7784 (within the US) anytime from Monday to Friday. Thank you very much.

With kind regards,

Journals Editorial Office WATE
Springer
P.O. Box 990
3300 AZ DORDRECHT
The Netherlands
Fax: +31 78 657 6555



Development of a vibrational startle response assay for screening environmental pollutants and drugs impairing predator avoidance

Melissa Faria^{a,*}, Eva Prats^b, Karen Adriana Novoa-Luna^c, Juliette Bedrossian^{a,d}, Cristian Gomez-Canela^{a,g}, Leobardo Manuel Gomez-Oliván^e, Demetrio Raldúa^a

^a IDAEA-CSIC, Jordi Girona 18, 08034 Barcelona, Spain

^b CID-CSIC, Jordi Girona 18, 08034 Barcelona, Spain

^c Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón s/n, colonia Toluca s/n, Col. Residencial Colón, 50120 Toluca, Estado de México, Mexico

^d University of Toulouse III, Route de Narbonne, 31120 Toulouse, France

^e Department of Analytical Chemistry and Organic Chemistry, Campus Sualceda, Faculty of Chemistry, Universitat Rovira i Virgili, Marcel··· Domingo s/n, Tarragona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 July 2018

Received in revised form 27 August 2018

Accepted 29 August 2018

Available online xxx

Editor: D. Barcelo

Keywords:

Zebrafish

Behavior

Escape response

Habituation

Neurotransmitters

ABSTRACT

The present paper describes the vibrational startle response assay (VSSRA), a new robust, simple and automated *in vivo* medium- to high-throughput procedure for assessment of the escape response and its habituation in zebrafish larvae. Such behaviors enable fish larvae to escape from predator strikes in aquatic ecosystems. The assay is based on measuring the distance moved by each larva during the startle response evoked by repetitive vibrational stimuli. The iterative reduction observed in the response to a series of tapping stimulus in VSSRA met the main criteria of habituation. Subsequently, the analysis of concordance using a battery of neuroactive compounds modulating different neurotransmitter systems demonstrated that the results of VSSRA are highly predictive of the effects on other vertebrates. Finally, as a proof of concept, VSSRA was used to test two relevant environmental pollutants at different concentrations. The results demonstrated that VSSRA is suitable for concentration-response analysis of environmental pollutants, opening the possibility to determine the potency and the associated hazard of impaired escape response for the different compounds. Therefore, we suggest that VSSRA could be a valuable tool for screening of chemical compounds capable of compromising predator avoidance behavior.

© 2018.

1. Introduction

In natural conditions predation is one of the main causes of mortality in feral fish, especially during the larval stage (Houde and Hoyt, 1987). As a part of an innate behavioral repertoire enabling larvae to escape from predator strikes, they respond to abrupt acoustic/vibrational stimuli with a fast C-bend followed by a bout of high-amplitude and low frequency fast swimming (Fero et al., 2011). Two modes of C-bend response have been identified according to latency. Whereas short latency C-bend (SLC) occurs within 15ms of the stimulus, long latency C-bend (LLC) is initiated 20–60ms after the stimulus (Fero et al., 2011). SLC response is regulated by a sensory motor axis that integrates auditory and vibrational information and transduces these stimuli into musculoskeletal activation via a bilateral pair of giant reticulospinal neurons in the hindbrain, the Mauthner cells (Paister et al., 2009). Because of their short latency and explosive speed of the movement, SLC responses are similar to the startle responses in higher vertebrates (Fero et al., 2011).

Habituation is a primitive form of implicit learning. The animal first responds to a new stimulus and, if the stimulus is neither benefi-

cial nor harmful, animal learns, after repeated exposure, to ignore it (Kandel, 1991). Habituation of the escape response results essential for aquatic organisms, as repeated unnecessary escape responses reduce foraging and result in an increase in the predation risk by at least two different ways (Fields and Yen, 1997). On one hand, escape response supposes a high energetic cost, and repeated escape responses will result in exhausted organisms, making them more susceptible to predation. Moreover, unnecessary escape responses attract the attention of both visual and mechanoreceptive predators (Batabyal et al., 2017; Fields and Yen, 1997; Killen and Brown, 2006). Short-term habituation of C-startle response occurs when larvae is exposed to repeated stimulation at short interstimulus intervals (ISIs), with the corresponding Mauthner cell responding only to the few first stimuli, and failing then to elicit a Mauthner spike (Park et al., 2018). As a result, SLC responsiveness to the acoustic/vibrational stimuli diminishes extremely rapidly during short-term habituation.

Currently, the available information about potential adverse effects of environmental pollutants present in aquatic ecosystems on the C-startle response and habituation in fish larvae is very scarce. To our knowledge, only eight environmental pollutants have been tested to determine the effects on the C-startle in fish, and the results indicated that fish exposed to seven of these chemicals were more susceptible to predation (Carlson et al., 1998). Moreover, although it has been demonstrated that exposure to some drugs alters habituation of

* Corresponding author.

Email address: mdfipen@cid.csic.es (M. Faria).

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN Acrylamide acute neurotoxicity in adult zebrafish

Melissa Faría¹, Tamar Ziv², Cristian Gómez-Canela³, Shani Ben-Lulu², Eva Prata³, Karen Adriana Novoa-Luna⁴, Afe Admon², Benjamín Piña², Romá Tauler², Leonardo Manuel Gómez-Oliván⁴ & Demetrio Rakús¹

Received: 7 March 2018

Accepted: 10 May 2018

Published online: 21 May 2018

Acute exposure to acrylamide (ACR), a type-2 alkene, may lead to a ataxia, skeletal muscle weakness and numbness of the extremities in human and laboratory animals. In the present manuscript, ACR acute neurotoxicity has been characterized in adult zebrafish, a vertebrate model increasingly used in human neuropharmacology and toxicology research. At behavioral level, ACR-treated animals exhibited “depression-like” phenotype comorbid with anxiety behavior. At transcriptional level, ACR induced down-regulation of regeneration-associated genes and up-regulation of oligodendrocytes and reactive astrocytes markers, altering also the expression of genes involved in the presynaptic vesicle cycling. ACR induced also significant changes in zebrafish brain proteome and formed adducts with selected cysteine residues of specific proteins, some of them essential for the presynaptic function. Finally, the metabolomics analysis shows a depletion in the monoamine neurotransmitters, consistent with the comorbid depression and anxiety disorder, in the brain of the exposed fish.

Acrylamide (ACR) is a water-soluble alkene widely used in the paper and textile industries, as flocculant in the wastewater treatment and municipal drinking water, as soil conditioner, as chemical grain in tunnels, sewers and wells, in ore processing, and in cosmetics^{1,2}. Reports of ACR poisoning after occupational or accidental exposure to ACR indicated major symptoms related to polyneuropathy, including lethargy, ataxia, skeletal muscle weakness and numbness of the extremities^{3–5}. Although early studies suggested that ACR neurotoxicity was associated with central-peripheral distal axonopathy⁶, it is currently well-established that the molecular initiating event (MIE) of ACR neurotoxicity is the disruption of presynaptic vesicle cycling by selectively forming adducts with thiolate sites located on proteins specifically involved in vesicle docking (synaptotagmin, synaptophysin, and syntaxin), vesicle priming (complexin-2), SNARE core dissolution (N-ethylmaleimide sensitive factor), endocytosis (clathrin), neurotransmitter re-uptake (membrane dopamine transporter) and vesicular storage (vesicular monoamine transporter) at the nerve terminals⁷. Consistently with this adverse effect of ACR on the presynaptic terminals function, a decrease in the monoamine neurotransmitters serotonin, norepinephrine and dopamine content in rat brain has been reported^{8,9}. As monoamine depletion is believed to result in depression and anxiety¹⁰, the potential of ACR to induce these psychological disorders should be concurrently addressed.

Zebrafish (*Danio rerio*) is a vertebrate model increasingly used in biomedical research, including neurotoxicology studies^{11–14}, as this animal species exhibits a similar overall nervous system organization to humans and similar neurotransmitter systems, including glutamatergic, cholinergic, serotonergic, dopaminergic, adrenergic, GABAergic, and histaminergic^{15,16,17}. Recently we characterized the ACR acute neurotoxicity in zebrafish larvae by exposing 5 days post-fertilization (dpf) animals to 1 mM ACR for 3 days¹⁸. The reported results suggest that the adverse outcome pathways behind the ACR acute neurotoxicity in zebrafish larvae are similar to those described in humans and mammalian models¹⁹. However, adult zebrafish is more feasible than larvae for modeling complex brain disorders due to their well-developed central nervous system (CNS) and more complex behavior^{18,19}. Moreover, as zebrafish are a less sentient species, the use of adult zebrafish for modeling brain disorders fully meets the 3Rs principles (Replacement, Reduction and Refinement)²⁰. Adult zebrafish have been used to model affective disorders, including stress-related, anxiety spectrum, depression, post-traumatic and phobic disorders, and multiple behavioral paradigms, resembling well-established rodent tests, have been developed^{21,22}.

¹DAEA-CSIC, Jordi Girona 18, 08034, Barcelona, Spain. ²Technion – Israel Institute of Technology, The Smoler Proteomics Center and the Department of Biology, Haifa, Israel. ³CID-CSIC, Jordi Girona 18, 08034, Barcelona, Spain. ⁴Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón Intersección Paseo Toluca s/n. Col. Residencial Colón, 50120, Toluca, Estado de México, Mexico. Correspondence and requests for materials should be addressed to D.R. (email: drpqam@cid.csic.es)

Development and prevalidation of a zebrafish assay for identifying chemicals impairing the non-associative learning

Melissa Faria^{1*}, Eva Prats², Karen Adriana Novoa-Luna³, Juliette Bedrossiantz⁴
Demetrio Raldua¹

¹IDAEA-CSIC, Jordi Girona 18, 08034, Barcelona, Spain,

²CID-CSIC, Jordi Girona 18, 08034, Barcelona, Spain

³Lab. Toxicología Ambiental, Facultad de Química, UAEMex, Edo. Mex, Mexico

⁴University of Toulouse III – FSI, France

*E-mail contact: mdfoam@cid.csic.es

Habituation is a non-associative form of learning characterized by decreased probability of a behavioural output when the same stimulus is presented repeatedly [1]. In zebrafish, short-term habituation can be measured by assessing the acoustic startle response (ASR) in response to repetitive acoustic/vibrational stimuli [2]. In this study, a new assay for identifying environmental pollutants and drugs able to impair non-associative learning has been developed in zebrafish larvae. The assay is based in assessing the motor response evoked by repetitive acoustic/vibrational stimuli generated by tapping a 48-wells microplate. First of all, the different criteria to determine if the iterative reduction in motor response observed in the assay needed to be demonstrated. Indeed with our assay, we were able to fulfill hallmark criterias of habituation: spontaneous recovery, more rapid reductions in startle to shorter intertrial intervals and dishabituation. We then explored pathways affecting this behaviour using human based neural chemical drugs for learning and memory which included those that targeted the cholinergic, serotonergic, glutaminergic and adenosine systems. In general and with in line of previous reports found in either zebrafish or rodents, the startle response was enhanced by cholinergic agonism and glutaminergic and adenosine antagonism drugs and was impaired by those that increase serotonin signaling and concentration. Furthermore, we tested ASR with different concentrations of two pesticides known to enhance the cholinergic signaling either by inhibiting acetylcholinesterase (AChE) activity or as an agonist of the nicotinic acetylcholine receptors, the organophosphate chlorpyrifos oxon (CPO) and the neonicotinoide imidacloprid, respectively. Both compounds affected ASR in zebrafish, however, the observed responses were divergent. CPO increased ASR in a dose dependent manner, while, Imidacloprid declined it with dose increase. The results are consistent with observed responses in zebrafish exposed to other AChE inhibitors [1] and with habituation impairment studied in honeybees after exposure to imidacloprid [3]. These results suggest that our new approach together with high-throughput screening advantages of the zebrafish model has been proven to be a useful tool to identify compounds that can affect learning and memory.

[1] Best, et al., 2008. Non-associative learning in larval zebrafish. *Neuropsychopharmacology*, 33(5), p.1206.[2] Wolman, et al., 2011. Chemical modulation of memory formation in larval zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(37), pp.15468-15473.[3] Blacquiére, et al., 2012. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, 21(4), pp.973-992

Acknowledgement - The authors thank the Spanish Government for (CTM2017-83242-R; D.R.), the NATO SFP project MD.SFPF 984777 (D.R.) and the Beatriu de Pinós programme (grant NE: 2016 BP 00233) department of the Ministry for Business and Knowledge, Catalonia Government.



AMEQA

Comité Científico AMEQA / SETAC-México 2018.

La Asociación Mesoamericana de Ecotoxicología y Química Ambiental A.C., certifica que:

Novoa Luna Karen Adriana

1. IDAEA-CSIC, Jordi Girona 18, 08034, Barcelona, España
2. Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México, México

Asistió al VIII Congreso de la AMEQA,
Toluca, Edo. De Méx., 8 al 10 de agosto de 2018.
Donde presentó en formato oral el trabajo:

Neurotoxicidad por acrilamida en el comportamiento del pez cebra adulto

De los autores:

Novoa Luna K.A.^{1,2}
Faria M.¹
Prata E.¹
Gómez-Canela C.¹
Piña B.¹
Gómez-Oliván L.M.²
Raldúa D.¹

Dra. Guadalupe Barrera Escorcia.
Presidenta de AMEQA.

c.c.p. Dra. Patricia Ramírez Romero, Secretaria de AMEQA.
c.c.p. Dra. Juan Carlos Sánchez Mesa, Responsable de la organización en la sede.
c.c.p. Dra. Xochitl Guzmán García, Tesorera de AMEQA.
c.c.p.

Archivo

Río Parral No.65 Col. Pasco de Churubusco. CP 09030. Del. Iztapalapa. Cd. de México. Página Internet:
<http://www.ameqa.org> Email: ameqa@ameqa.org Tel. 52-55-5804-6493, Fax 52-55-5804-4738

Development and prevalidation of a zebrafish assay for identifying chemicals impairing the non-associative learning

Melissa Faria¹, Eva Prats², Karen Adriana Novoa-Luna³, Juliette Bedrossiantz⁴
Demetrio Raldua¹

¹IDAIA-CSIC, Jordi Girona 18, 08034, Barcelona, Spain,

²CID-CSIC, Jordi Girona 18, 08034, Barcelona, Spain

³Lab. Toxicología Ambiental, Facultad de Química, UAEMex, Edo. Mex, Mexico

⁴University of Toulouse III – FSI, France

E-mail contact: mdfgam@cid.csic.es

Habituation is a non-associative form of learning characterized by decreased probability of a behavioural output when the same stimulus is presented repeatedly [1]. In zebrafish, short-term habituation can be measured by assessing the acoustic startle response (ASR) in response to repetitive acoustic/vibrational stimuli [2]. In this study, a new assay for identifying environmental pollutants and drugs able to impair non-associative learning has been developed in zebrafish larvae. The assay is based in assessing the motor response evoked by repetitive acoustic/vibrational stimuli generated by tapping a 48-wells microplate. First of all, the different criteria to determine if the iterative reduction in motor response observed in the assay needed to be demonstrated. Indeed with our assay, we were able to fulfill hallmark criterias of habituation: spontaneous recovery, more rapid reductions in startle to shorter intertrial intervals and dishabituation. We then explored pathways affecting this behaviour using human based neural chemical drugs for learning and memory which included those that targeted the cholinergic, serotonergic, glutaminergic and adenosine systems. In general and with in line of previous reports found in either zebrafish or rodents, the startle response was enhanced by cholinergic agonism and glutaminergic and adenosine antagonism drugs and was impaired by those that increase serotonin signaling and concentration. Furthermore, we tested ASR with different concentrations of two pesticides known to enhance the cholinergic signaling either by inhibiting acetylcholinesterase (AChE) activity or as an agonist of the nicotinic acetylcholine receptors, the organophosphate chlorpyrifos oxon (CPO) and the neonicotinoide imidacloprid, respectively. Both compounds affected ASR in zebrafish, however, the observed responses were divergent. CPO increased ASR in a dose dependent manner, while, Imidacloprid declined it with dose increase. The results are consistent with observed responses in zebrafish exposed to other AChE inhibitors [1] and with habituation impairment studied in honeybees after exposure to imidacloprid [3]. These results suggest that our new approach together with high-throughput screening advantages of the zebrafish model has been proven to be a useful tool to identify compounds that can affect learning and memory.

[1] Best, et al., 2008. Non-associative learning in larval zebrafish. *Neuropsychopharmacology*, 33(5), p.1206.[2] Wolman, et al., 2011. Chemical modulation of memory formation in larval zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(37), pp.15468-15473.[3] Blacquièrre, et al., 2012. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, 21(4), pp.973-992

Acknowledgement - The authors thank the Spanish Government for (CTM2017-83242-R; D.R.), the NATO SFP project MD.SFPP 984777 (D.R.) and the Beatriu de Pinós programme (grant NE: 2016 BP 00233) department of the Ministry for Business and Knowledge, Catalonia Government.