



Universidad  
Rey Juan Carlos

**Facultad de Ciencias de la Salud**

*Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública e  
Inmunología y Microbiología Médicas*

**NIVELES DE FÁRMACOS Y DISRUPTORES  
ENDOCRINOS EN AGUAS FLUVIALES Y POTABLES  
ESPAÑOLAS. RIESGOS ECOTOXICOLÓGICOS Y PARA  
LA SALUD PÚBLICA**



**TESIS DOCTORAL**

**Sara Esteban García-Navas  
Madrid, 2013**

Universidad Rey Juan Carlos  
Facultad de Ciencias de la Salud



**NIVELES DE FÁRMACOS Y DISRUPTORES  
ENDOCRINOS EN AGUAS FLUVIALES Y  
POTABLES ESPAÑOLAS. RIESGOS  
ECOTOXICOLÓGICOS Y PARA LA SALUD  
PÚBLICA**

**TESIS DOCTORAL**

Sara Esteban García-Navas

Directora: Dra. Yolanda Valcárcel Rivera

Codirectora: Dra. Myriam Catalá Rodríguez

Madrid, 2013



**DÑA. YOLANDA VALCÁRCCEL RIVERA, PROFESORA  
CONTRATADA DOCTORA DEL DEPARTAMENTO DE  
MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PÚBLICA E INMUNOLOGÍA  
Y MICROBIOLOGÍA MÉDICAS DE LA UNIVERSIDAD REY  
JUAN CARLOS Y DÑA. MYRIAM CATALÁ RODRÍGUEZ,  
PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y  
GEOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD REY JUAN CARLOS**

**CERTIFICAN:**

Que el proyecto de tesis doctoral titulado “*NIVELES DE FÁRMACOS Y DISRUPTORES ENDOCRINOS EN AGUAS FLUVIALES Y POTABLES ESPAÑOLAS. RIESGOS ECOTOXICOLÓGICOS Y PARA LA SALUD PÚBLICA*”, ha sido realizado bajo nuestra dirección por la licenciada en Ciencias Ambientales, Dña. Sara Esteban García-Navas y reúne los requisitos científicos y formales para ser presentado y defendido ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a todos los efectos, firmo el presente certificado en Madrid, a 31 de Octubre de dos mil trece.

Directora

Codirectora

Fdo. Dra. Yolanda Valcárcel Rivera

Fdo. Dra. Myriam Catalá Rodríguez



## **AGRADECIMIENTOS**

*A las profesoras Yolanda Valcárcel y Myriam Catalá, directora y codirectora de este trabajo, respectivamente, además de amigas, por su apoyo y confianza en mi trabajo, por su capacidad para guiar mis ideas y compartir conmigo sus conocimientos haciendo posible mi formación como investigadora.*

*A todos los coautores de los estudios de esta tesis doctoral por su trabajo y esfuerzo para que los artículos salieran adelante.*

*A todas mis compañeras y amigas de trabajo, que siempre me han animado y ayudado cada una de ellas en su ámbito.*

*A mis padres por animarme siempre a continuar y por creer en mí en todo momento, ya que sin ellos nada de esto habría sido posible.*

*A mi marido por escucharme, apoyarme y estar ahí siempre que lo he necesitado.*



*“El agua es el elemento y principio de todas las cosas”*

**(Tales de Mileto)**

*“Olvidamos que el ciclo del agua y el ciclo de la vida son uno mismo”*

**(Jaques Y. Cousteau)**

*“El agua, el aire y la limpieza son los principales productos de mi farmacia”*

**(Napoleón Bonaparte)**



## Contenido

---

<b>ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>RESUMEN</b> .....	3
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	7
Contexto general.....	7
Normativa en materia de aguas .....	8
Normativa en materia de sustancias y preparados químicos .....	14
Contaminantes emergentes.....	15
Los fármacos como contaminantes emergentes .....	17
Disruptores endocrinos.....	26
Riesgos ecotoxicológicos .....	30
Riesgos para la salud .....	32
Fármacos .....	33
Disruptores endocrinos.....	34
<b>OBJETIVOS</b> .....	37
Hipótesis .....	37
Objetivo general .....	37
Objetivos específicos.....	37
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	39
<i>Estudio 1: Residuos farmacéuticos psicoactivos en las cuencas de Galicia</i> .....	39
1.    Ámbito geográfico .....	39
2.    Muestreo .....	39
3.    Compuestos analizados.....	40
4.    Método analítico .....	41
<i>Estudio 2: Análisis y presencia de disruptores endocrinos y actividad estrogénica en las aguas superficiales del centro de España</i> .....	42
1.    Puntos de muestreo .....	42
2.    Compuestos analizados.....	44
3.    Método analítico .....	47
4.    Estrogenicidad .....	48
<i>Estudio 3: Sensibilidad de nuevos bioensayos basados en biomarcadores a la microcontaminación del agua fluvial</i> .....	50
1.    Agua fluvial .....	50
2.    Material biológico.....	52
2.1.    Polystichum setiferum.....	52
2.2.    Danio rerio .....	52
3.    Bioensayos .....	53
3.1.    Toxicidad en el desarrollo de plantas.....	53
3.2.    Toxicidad en el desarrollo de animales.....	54
3.3.    Tests de toxicidad estándar .....	55
4.    Análisis de los datos de toxicidad.....	56
<i>Estudio 4: Monitorización de disruptores endocrinos y actividad estrogénica en el agua de grifo de la Comunidad de Madrid</i> .....	57
1.    Puntos de muestreo .....	57
2.    Compuestos analizados.....	58

3. Método analítico .....	59
4. Estrogenicidad .....	59
5. Evaluación de riesgos .....	59
<b>RESULTADOS</b> .....	63
<i>Estudio 1: Residuos farmacéuticos psicoactivos en las cuencas de Galicia</i> .....	63
1. Aguas residuales .....	63
1.1. Agua residual de entrada en la depuradora .....	63
1.2. Agua residual de salida de la depuradora .....	64
2. Agua superficial .....	65
3. Agua de grifo .....	65
<i>Estudio 2: Análisis y presencia de disruptores endocrinos y actividad estrogénica en las aguas superficiales del centro de España</i> .....	67
1. Estrógenos naturales y sintéticos y sus conjugados .....	72
2. Conservantes (parabenos) .....	72
3. Antimicrobianos/desinfectantes (triclosán y triclocarban) .....	72
4. Plastificante (bisfenol A) .....	72
5. Alquifenoles (nonilfenol y octilfenol) .....	72
6. Retardantes de llama organofosforados .....	73
7. Anticorrosivos (benzotriazol y tolitriazol) .....	73
8. Contribución de cada compuesto analizado a la contaminación detectada .....	73
9. Estrogenicidad .....	74
<i>Estudio 3: Sensibilidad de nuevos bioensayos basados en biomarcados a la microcontaminación del agua fluvial</i> .....	76
1. Muestras tomadas en verano .....	76
1.1. Test de toxicidad estándar .....	76
1.2. Bioensayo de toxicidad en plantas .....	77
1.3. Bioensayo de toxicidad en animales .....	80
2. Muestras tomadas en invierno .....	82
2.1. Bioensayo de toxicidad en plantas .....	82
2.2. Bioensayo de toxicidad en animales .....	84
<i>Estudio 4: Monitorización de disruptores endocrinos y actividad estrogénica en el agua de grifo de la Comunidad de Madrid</i> .....	85
1. Disruptores endocrinos en el agua de grifo .....	85
2. Diferencias entre puntos de muestreo .....	87
3. Estrogenicidad .....	88
4. Evaluación de riesgos para la salud humana .....	88
<b>DISCUSIÓN</b> .....	93
<i>Estudio 1: Residuos farmacéuticos psicoactivos en las cuencas de Galicia</i> .....	93
1. Aguas residuales y aguas fluviales .....	93
2. Aguas de grifo .....	95
3. Conclusión .....	96
<i>Estudio 2: Análisis y presencia de disruptores endocrinos y actividad estrogénica en las aguas superficiales del centro de España</i> .....	98
1. Estrógenos naturales y sintéticos y sus conjugados .....	98
2. Conservantes (parabenos) .....	98
3. Antimicrobianos/desinfectantes (triclosán y triclocarban) .....	99
4. Plastificante (bisfenol A) .....	99
5. Alquifenoles (nonilfenol y octilfenol) .....	100

6.	Retardantes de llama organofosforados .....	101
7.	Anticorrosivos (benzotriazol y tolitriazol).....	102
8.	Contribución de cada compuesto analizado a la contaminación detectada ...	103
9.	Estrogenicidad .....	104
10.	Conclusión.....	105
	<b><i>Estudio 3: Sensibilidad a la microcontaminación del agua fluvial de nuevos bioensayos basados en biomarcados</i></b> .....	106
1.	Bioensayo de toxicidad en plantas .....	106
1.1.	Actividad mitocondrial.....	106
1.2.	Cantidad de DNA .....	107
2.	Bioensayo de toxicidad en animales .....	107
3.	Embalse de Cazalegas.....	108
4.	Diferencias estacionales.....	109
5.	Diferencias entre puntos de muestreo .....	109
6.	Comparación de bioensayos .....	109
7.	Toxicidad causada por el agua fluvial contaminada.....	111
8.	Conclusión .....	113
	<b><i>Estudio 4: Monitorización de disruptores endocrinos y actividad estrogénica en el agua de grifo de la Comunidad de Madrid</i></b> .....	114
1.	Disruptores endocrinos en el agua de grifo.....	114
2.	Diferencias entre puntos de muestreo .....	117
3.	Estrogenicidad .....	117
4.	Evaluación de riesgos .....	117
5.	Conclusión .....	118
	<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	119
	<b>CONCLUSIÓN GENERAL</b> .....	123
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	125



## Índice de Tablas

---

<b>Tabla 1.</b> Normas de calidad ambiental (NCA) para las sustancias prioritarias y otros contaminantes .....	13
<b>Tabla 2.</b> Principales contaminantes emergentes .....	16
<b>Tabla 3.</b> Consumo farmacéutico por región (2003).....	18
<b>Tabla 4.</b> Consumo de los principales subgrupos terapéuticos (2003) .....	19
<b>Tabla 5.</b> Subgrupos ATC de mayor consumo en 2009 ordenados por importe PVP ....	20
<b>Tabla 6.</b> Consumo (en DHD, Dosis Habitante Definida) de algunos grupos terapéuticos entre los países europeos de la OCDE. Promedio del periodo 2000-2007 .....	23
<b>Tabla 7.</b> Características de las estaciones de depuración de aguas residuales seleccionadas en las cuencas de Galicia durante 2008-2009.....	40
<b>Tabla 8.</b> Fármacos psicoactivos y metabolitos seleccionados.....	40
<b>Tabla 9.</b> Características de los puntos de muestreo de agua superficial (ríos Jarama y Manzanares, Madrid).....	44
<b>Tabla 10.</b> Sustancias analizadas con posible actividad endocrina.....	46
<b>Tabla 11.</b> Concentración efectiva ( $EC_{50}$ ), factores de estrogenicidad relativos (E2 equiv.) y límites de detección ( $\mu\text{g/l}$ ) obtenidos para cada compuesto por Céspedes et al. (2004) mediante ensayo de levadura recombinante .....	49
<b>Tabla 12.</b> Características de los puntos de muestreo de agua superficial (río Tajo, Toledo) .....	51
<b>Tabla 13.</b> Propiedades físico-químicas de las aguas en los puntos de muestreo del río	52
<b>Tabla 14.</b> Porcentaje (%) de las muestras con concentraciones detectables y concentración media (ng/l) a la entrada (I) y salida (E) de las EDARs, aguas abajo de los ríos (DSSTP) y en aguas de grifo de las cuencas de Galicia en 2008-2009 .....	63
<b>Tabla 15.</b> Concentraciones (ng/l) máxima-mínima de los fármacos detectados en las aguas de grifo de las ciudades Gallegas seleccionadas .....	65
<b>Tabla 16A.</b> Concentraciones (ng/l) de disruptores endocrinos en el río Manzanares en ambas campañas de muestreo.....	68
<b>Tabla 16B.</b> Concentraciones (ng/l) de disruptores endocrinos en el río Jarama en ambas campañas de muestreo.....	69
<b>Tabla 17.</b> Niveles de concentración (ng/l) de disruptores endocrinos encontrados en las aguas superficiales de los estudios publicados en la última década.....	71
<b>Tabla 18.</b> Valores de $EC_{50}$ de <i>Scenedesmus subspicatus</i> y <i>Daphnia magna</i> tras 72 horas de exposición en % (V/V) para las muestras tomadas en verano.....	77
<b>Tabla 19.</b> Concentraciones, mediana y rango (ng/l) de disruptores endocrinos detectados en las muestras de agua de grifo.....	86
<b>Tabla 20.</b> Evaluación del riesgo en las muestras de aguas de grifo.....	90
<b>Tabla 21.</b> Caracterización del riesgo en las muestras de aguas de grifo.....	91

## Índice de Figuras

---

<b>Figura 1.</b> Fuentes de contaminación del agua .....	8
<b>Figura 2.</b> Evolución del consumo español de los distintos grupos de antihipertensivos en relación con la media de consumo de los países europeos de la OCDE. Periodo 2000-2007 .....	24
<b>Figura 3.</b> Localización de los puntos de muestreo de agua superficial (ríos Jarama y Manzanares, Madrid).....	43
<b>Figura 4.</b> Localización de los puntos de muestreo de agua superficial, río Tajo, Toledo (tomado de Valcárcel et al. 2013).....	50
<b>Figura 5.</b> Localización de los puntos de muestreo y características de las muestras de agua de grifo .....	58
<b>Figura 6.</b> Frecuencia de detección de los disruptores endocrinos analizados en las muestras de agua superficial durante las dos campañas de muestreo (domingo-jueves) 70	
<b>Figura 7.</b> Niveles acumulados (ng/l) de los grupos de disruptores endocrinos en las aguas superficiales analizadas durante las dos campañas de muestreo (domingo-jueves) .....	74
<b>Figura 8.</b> Niveles acumulados (pg/l) de equivalentes de $\beta$ -estradiol (EEQ) para cada compuesto analizado.....	75
<b>Figura 9.</b> Porcentaje de variación de la actividad mitocondrial tras 24 horas de exposición de las esporas de <i>Polystichum setiferum</i> con respecto al control en los cinco puntos de muestreo del río Tajo tomadas en verano (A) e invierno (B) .....	78
<b>Figura 10.</b> Porcentaje de variación en la cantidad de DNA tras 24 horas de exposición de las esporas de <i>Polystichum setiferum</i> con respecto al control en los cinco puntos de muestreo del río Tajo en verano (A) e invierno (B) .....	79
<b>Figura 11.</b> Peroxidación lipídica de los embriones de <i>Danio rerio</i> expuestos al agua fluvial durante 90 min en verano (A) e invierno (B).....	81
<b>Figura 12.</b> Porcentaje de variación de la actividad mitocondrial (A) y la cantidad de DNA (B) tras 24 horas de exposición de las esporas de <i>Polystichum setiferum</i> con respecto al control en las aguas potables del embalse de Cazalegas tomadas en invierno .....	83
<b>Figura 13.</b> Niveles de concentración de disruptores endocrinos en cada uno de las muestras de aguas de grifo (ng/l).....	87
<b>Figura 14.</b> Niveles acumulados (pg/l) de equivalentes de $\beta$ -estradiol (EEQ) para cada compuesto analizado.....	88

## ABREVIATURAS

AEMA: Agencia Europea de Medio Ambiente  
ATC: *Anatomical, Therapeutic, Chemical classification system*  
BeP: Benzilparabeno  
BHT: Hidroxitolueno butilado  
BPA: Bisfenol A  
BT: Benzotriazol  
C: Concentración de Exposición  
Caff: Cafeína  
CAS: *Chemical Abstracts Service*  
Ci: Concentración compuesto  
CMA: Concentración Máxima Admisible  
CP: Coeficiente de Peligrosidad  
DE: Duración de exposición  
DES: Dietilestilbestrol  
DfR: Dosis de Referencia  
DHD: Dosis Habitante Definida  
EC<sub>50</sub>: Concentración media efectiva  
ECB: *European Chemical Bureau*  
EDAR: Estación Depuradora de Aguas Residuales  
EEQ: Equivalentes de estradiol  
ETAP: Estación de Tratamiento de Agua Potable  
EtP: Etilparabeno  
E1: Estrona  
E2: 17- $\beta$ -estradiol  
E2 equiv.: Factor de estrogenicidad relativa  
E3: Estriol  
EE2: 17- $\alpha$ -etinilestradiol  
E1-3S: Estrona 3-sulfato  
E1-3G: Estrona 3-glucurónido  
E2-17G: Estradiol 17-glucurónido  
E3-3S: Estriol 3-sulfato  
E3-16G: Estriol 16-glucurónido  
FE: Frecuencia de exposición  
HBCDD: Hexabromociclododecano  
HPLC: *High-performance liquid chromatography*  
IARC: *International Agency for Research of Cancer*  
IDE: Índice de exposición  
INE: Instituto Nacional de Estadística  
LC: Límite de cuantificación  
LC-LC-MS/MS: *Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry*  
LD: Límite de detección  
MA: Media anual  
MDA: Malondialdehído  
MeP: Metilparabeno  
NCA: Normas de Calidad Ambiental

NP: Nonilfenol  
NP<sub>1</sub>EC: Nonilfenol monocarboxilado  
NP<sub>1</sub>EO: Nonilfenol monoetoxilado  
NP<sub>2</sub>EO: Nonilfenol dietoxilado  
OP: Octilfenol  
OP<sub>1</sub>EC: Octilfenol monocarboxilado  
OP<sub>1</sub>EO: Octilfenol monoetoxilado  
OP<sub>2</sub>EO: Octilfenol dietoxilado  
OECD: *Organisation for Economic Co-operation and Development*  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
PC: Peso corporal  
PCB: Policlorobifenilos  
PET: Tereftalato de polietileno  
PrP: Propilparabeno  
PFOS: Ácido perfluorooctanosulfónico  
REACH: *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*  
SRM: *Selected Reaction transition*  
TBA: Ácido tiobarbitúrico  
TBEP: Tris (butoxietil) fosfato  
TC: Tasa de contacto  
TCA: Ácido tricloroacético  
TCCP: Tris (cloroisopropil) fosfato  
TCEP: Tris (2-cloroetil) fosfato  
TCC: Triclocarban  
TCS: Triclosán  
TM: Periodo en el que se promedia la exposición  
TSQ: *Thermo Fisher Scientific*  
TT: Tolitriazol  
TTC: Cloruro de trifeniltetrazolio  
USEPA: *United States Environmental Protection*

## RESUMEN

Este trabajo se centra en el estudio de los denominados “*contaminantes emergentes*”, que son aquellas sustancias que alteran la calidad del agua y de las que se sospecha podrían ser potencialmente peligrosas para los seres vivos y para la salud de los seres humanos, pero sobre los que todavía se tiene poco conocimiento y no están regulados a través de la legislación. Estas sustancias se detectan a concentraciones muy bajas (trazas, ng/l o µg/l) y, si bien sus efectos a corto plazo son prácticamente inexistentes, los posibles efectos a largo plazo tanto en organismos acuáticos como en los seres humanos todavía no están identificados. Se trata de efectos subletales como, por ejemplo, retrasos, anomalías y cambios durante las etapas de desarrollo, reducción de la fertilidad, cambios en el comportamiento reproductivo, trastornos cognitivos, etc., que, sin ser letales, podrían comprometer la viabilidad futura de las poblaciones naturales.

El objetivo de este trabajo es proporcionar mayor información sobre la presencia de determinados “*contaminantes emergentes*” en las aguas españolas, concretamente los productos farmacéuticos y las sustancias con capacidad o sospecha de alteración del sistema hormonal, con el fin de que las administraciones competentes, la industria química y farmacéutica, el sector médico y la población en general, dispongan de un mayor conocimiento sobre la calidad de nuestras aguas y puedan adoptarse las medidas que se consideren oportunas para prevenir posibles riesgos ecotoxicológicos y para la salud humana derivados de la presencia de estos contaminantes en las aguas.

Para cumplir estos objetivos se han llevado a cabo las siguientes actuaciones. Por un lado, se han tomado muestras de aguas residuales, fluviales y de grifo en las *Demarcaciones Hidrográficas de Galicia-Costa y Miño-Sil* en Galicia, para el análisis de productos farmacéuticos pertenecientes al grupo de los psicoactivos. Por otro lado, se han recogido muestras de aguas fluviales y de grifo en la *Demarcación Hidrográfica del Tajo* en Madrid para el análisis de perturbadores endocrinos de elevado uso en nuestra vida cotidiana y para la aplicación de una de las herramientas actualmente disponible para la evaluación de riesgos para la salud humana. Asimismo, en las aguas de la cuenca del Tajo a su paso por la provincia de Toledo se ha evaluado el desarrollo

de nuevos ensayos más sensibles en la detección de posibles riesgos ecotoxicológicos en los organismos acuáticos derivados de la contaminación de las aguas.

Tras los análisis efectuados se demostró la presencia de psicofármacos en las cuencas gallegas, tanto en aguas fluviales como de grifo, siendo los ansiolíticos y los antidepresivos los encontrados a mayores concentraciones, en especial, el ansiolítico lorazepam y el antidepresivo venlafaxina. Además, se observó la conversión de los metabolitos a sus compuestos parentales en las Estaciones de Depuración de Aguas Residuales. Asimismo, ha quedado demostrada la presencia de compuestos con capacidad de perturbar el sistema endocrino en las aguas de la cuenca del río Tajo, así como en las aguas de grifo analizadas en la Comunidad Autónoma de Madrid, siendo los retardantes de llama organofosforados, los alquifenoles y los anticorrosivos los hallados a concentraciones más elevadas. La estimación de la actividad estrogénica de las muestras de agua fluviales y de grifo no supone un potencial riesgo estrogénico para los ecosistemas acuáticos y la salud humana. No obstante, no pudieron incluirse en dicha estimación todos los compuestos analizados, ya que no se disponía de información sobre actividad estrogénica a través del método utilizado. Por otro lado, la evaluación de los nuevos bioensayos utilizados ha permitido determinar que éstos son herramientas útiles y más sensibles en la detección de efectos subletales producidos por las bajas concentraciones de contaminantes que algunos de los bioensayos estándar validados en la actualidad. Finalmente, la metodología de evaluación de riesgos para la salud humana sólo permite realizar una estimación, ya que hay que tener en cuenta que, en el caso de los perturbadores endocrinos su capacidad de actuación se produce a dosis muy bajas.

Los resultados de este trabajo evidencian la necesidad de incrementar la monitorización medioambiental de las cuencas españolas y de mejorar las tecnologías de tratamiento de aguas residuales y potables con el fin de prevenir la presencia de estos contaminantes. Del mismo modo, resulta imprescindible prestar especial atención a aquellas poblaciones abastecidas con agua potabilizada proveniente de los ríos españoles, ya que aunque las concentraciones de contaminantes detectadas en este trabajo son muy bajas como para poder afirmar posibles riesgos para la salud pública, estas sustancias tienen la capacidad de actuar a dosis muy bajas y sus efectos pueden

manifestarse a largo plazo, siendo especialmente importantes las exposiciones durante el embarazo, y las primeras etapas de la vida.

En el caso concreto de los productos farmacéuticos las medidas deben encaminarse a involucrar a la población en el uso y eliminación responsable de fármacos, y trasladar los resultados de estos estudios a las asociaciones de médicos, ya que son los que finalmente prescriben los medicamentos, con el fin de que se utilicen fármacos menos contaminantes y tóxicos para el medio ambiente. En cuanto a los perturbadores endocrinos, las concentraciones detectadas tanto en agua fluvial como potable ponen de manifiesto la importancia de realizar estudios posteriores con muestreos más representativos y continuos con el fin de poder observar variaciones de concentración y posibles incrementos en la actividad estrogénica de los mismos.

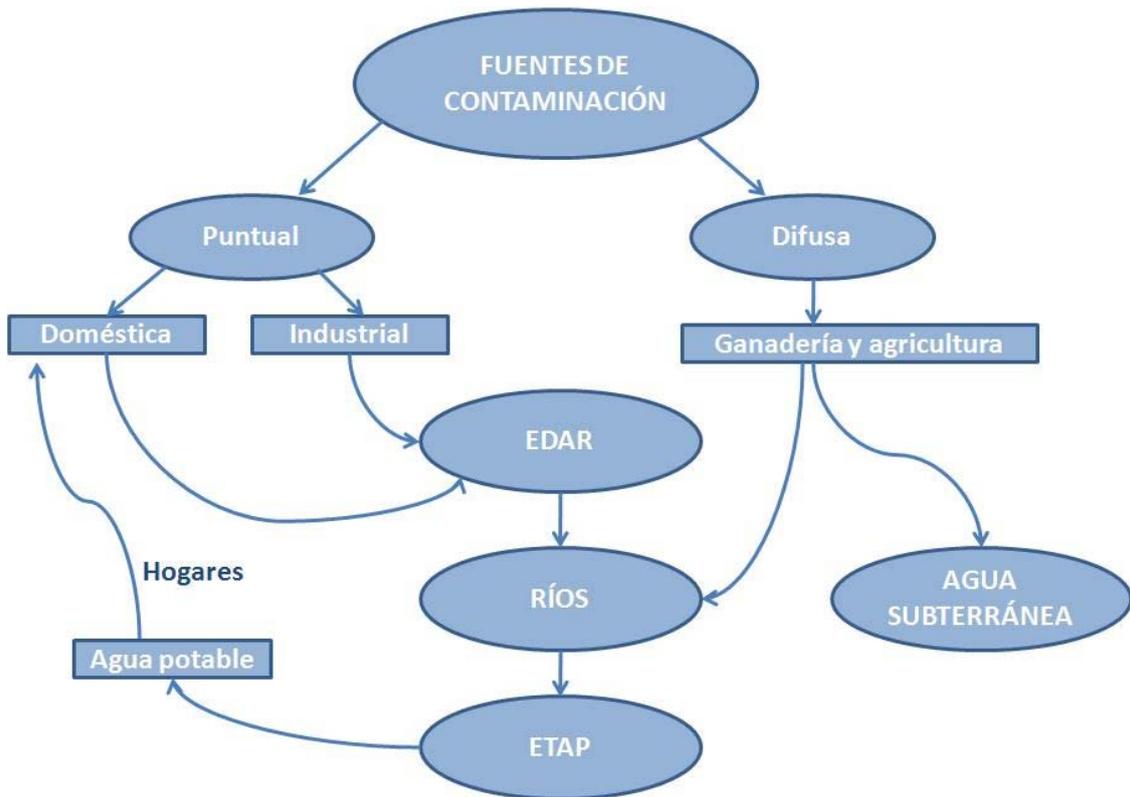


# INTRODUCCIÓN

## *Contexto general*

El agua es un recurso natural escaso y necesario para la vida humana y el sostenimiento del medio ambiente. Como resultado de su inadecuado uso y de la actividad antropogénica contaminante su deterioro es cada vez más acusado. El rápido desarrollo humano e industrial ha hecho que durante décadas las aguas superficiales sean receptoras de multitud de sustancias y compuestos contaminantes de diferente naturaleza. A este problema de deterioro de la calidad del agua cabe añadir su escasez (especialmente vulnerables las regiones mediterráneas), agravada por las consecuencias del cambio climático y la desertización.

La alteración de la calidad del agua se produce fundamentalmente por la descarga de aguas residuales urbanas e industriales procedentes de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) y por efluentes de origen agrícola y ganadero (Figura 1). En los últimos años, la normativa en materia de contaminación y calidad de aguas ha permitido controlar y mejorar la descarga de sustancias contaminantes “convencionales” (nitratos, fosfatos, sulfuros, cloruros, etc.) en las aguas continentales. Sin embargo, el continuo descubrimiento de nuevos contaminantes no regulados y potencialmente peligrosos, llamados “*contaminantes emergentes*”, pone de manifiesto la necesidad de continuar investigando sobre la presencia y las concentraciones detectadas en las aguas, el posible riesgo que dichas concentraciones podrían suponer para la salud humana y el medio ambiente, así como el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan eliminar estos contaminantes en las EDARs y en las estaciones de tratamiento de agua potable (ETAPs). Especial atención merecen los denominados “*microcontaminantes*”, que son aquellos contaminantes que llegan a las aguas naturales a nivel de trazas ( $\mu\text{g/l}$  o  $\text{ng/l}$ ), y cuyos posibles efectos (crónicos o aditivos) sobre los organismos acuáticos no están todavía identificados. Entre otros cabe destacar los fármacos, drogas de abuso, productos de higiene personal, hormonas, agentes de limpieza, etc., de diversa procedencia (uso de fitoquímicos y fitosanitarios, efluentes y fangos de depuradoras, efluentes industriales, agrícolas, ganaderos y hospitalarios, etc.).



**Figura 1. Fuentes de contaminación del agua**

### ***Normativa en materia de aguas***

El agua es un recurso natural que engloba las aguas continentales superficiales, las aguas de transición, las aguas costeras y las aguas subterráneas. Todas ellas se integran en el ciclo hidrológico y constituyen un recurso unitario, subordinado al interés general, que debe preservarse de una mala utilización y de posibles actividades contaminantes. Por ello, para su correcta utilización, desde el año 1879, se regula en España este recurso natural a través de la denominada “**Ley de Aguas**” que posteriormente fue modificada a través de la *Ley 29/1985, de 2 de Agosto*. En esta normativa se pone de manifiesto que el agua es un recurso natural escaso, indispensable para la vida y para el ejercicio de la inmensa mayoría de las actividades económicas. El agua es un recurso limitado, irremplazable, no ampliable por mera voluntad del hombre, irregular en su forma de presentarse en el tiempo y el espacio, y muy susceptible y vulnerable de usos sucesivos. Posteriormente, en el año 2001, el Gobierno español desarrolla el *Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas*, en el que se refunda y adapta toda la normativa

legal existente en materia de aguas hasta el momento. En el 2007 el texto refundido de la Ley de Aguas se modificó a través del *Real Decreto-Ley 4/2007, de 13 de abril*, en relación con la competencia para la tramitación de las autorizaciones de vertido. Esta es la legislación básica española en materia de aguas.

En relación con el dominio público hidráulico, se aprobó el “**Reglamento de Dominio Público Hidráulico**” a través del *Real Decreto 849/1986, de 11 de abril, que desarrolla los Títulos preliminar, I, IV, V, VI y VIII de la Ley de Aguas*. Este Reglamento ha sufrido varias modificaciones desde entonces, en parte debido a la obligación de los Estados miembros de la Unión Europea de incorporar las medidas legislativas desarrolladas a través de diversas directivas:

- *Real Decreto 995/2000, de 2 de junio, por el que se fijan objetivos de calidad para determinadas sustancias contaminantes*, y por la que se incorpora la obligación establecida en la *Directiva 76/464/CEE del Consejo, de 4 de mayo*, de adoptar determinadas medidas para eliminar la contaminación causada por los vertidos al medio acuático de las sustancias peligrosas incluidas en su anexo I y para reducir la producida por los vertidos que contengan aquellas que figuran en su anexo II.
- *Real Decreto 606/2003*, por el que se modifican aspectos relativos a la utilización del dominio público hidráulico, concesiones, acuíferos sobreexplotados y registro de aguas, del “**Reglamento de Dominio Público Hidráulico**”. El objetivo de estas modificaciones es la adaptación de la regulación española a la normativa europea en materia de política de aguas aprobada mediante la *Directiva 2000/60/CE*.

La *Directiva 2000/60/CE, de 23 de octubre, establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas*, y su aprobación supuso la derogación de gran parte de la normativa que hasta ese momento se había desarrollado en materia de aguas tanto a nivel europeo como nacional. El objetivo de esta Directiva es la protección de las aguas superficiales continentales, de transición, costeras y subterráneas, para prevenir o reducir su contaminación, promover su uso sostenible, proteger y mejorar el medio ambiente acuático, y contribuir a paliar los efectos de las

inundaciones y sequías. De acuerdo con la “*Directiva Marco del Agua*”, los Estados miembros deberán aplicar las medidas necesarias para prevenir el deterioro del estado de todas las masas de agua superficial de su territorio y garantizar el mejor estado ecológico y químico posibles. Asimismo, establecerán programas de seguimiento del estado de todas las masas de agua y velarán por que todos los vertidos en las aguas superficiales se controlen y por el establecimiento de los controles de emisión basados en las mejores técnicas disponibles, los valores límite de emisión que correspondan, y en el caso de impactos difusos, los controles y las mejores prácticas medioambientales, que se establecen en la siguiente normativa:

- *Directiva 96/61/CE, de 24 de septiembre, relativa a la prevención y al control integrado de la contaminación, incorporada al ordenamiento español a través de la Ley 16/2002, de 1 de julio.*
- *Directiva 91/271/CE, de 21 de mayo, sobre tratamiento de las aguas residuales urbanas, incorporada al ordenamiento español a través del Real Decreto-Ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas, que a su vez ha sido desarrollado a través del Real Decreto 509/1996, de 15 de marzo, que completa la normativa sobre recogida, depuración y vertido de las aguas residuales.*
- *Directiva 91/676/CE, de 12 de diciembre, relativa a la protección de las aguas contra la contaminación producida por nitratos utilizados en la agricultura, incorporada al ordenamiento español a través del Real Decreto 261/1996, de 16 de febrero, de protección de aguas contra la contaminación por nitratos de fuentes agrarias.*

Asimismo, la “*Directiva Marco del Agua*” establece la necesidad de elaborar una **lista de sustancias prioritarias** que presenten un riesgo significativo para el medio acuático o a través de él. La propuesta de la Comisión incluyó inicialmente una lista de 33 sustancias prioritarias, 20 de ellas clasificadas como peligrosas, a través de la *Decisión nº 2455/2001/CE*, tras la evaluación de riesgos de multitud de sustancias centrada en la ecotoxicidad acuática y en la toxicidad humana a través del medio

acuático (Tabla 1). La Directiva preveía la revisión periódica (cada cuatro años) de esta lista con la posibilidad de incorporación de otras sustancias en caso de nuevas evidencias de riesgo para el medio acuático o a través de él. Para cada una de estas sustancias prioritarias se fijaron unas **Normas de Calidad Ambiental (NCA)** a través de la *Directiva 2008/105/CE, de 16 de diciembre*, que se incorporó al ordenamiento español a través del *Real Decreto 60/2011, de 21 de enero, sobre normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas*. Las NCA son límites de concentración que no deben superarse en las aguas:

- **Valor o concentración media anual (MA)**: el objetivo es garantizar la calidad del medio acuático a largo plazo.
- **Concentración máxima admisible (CMA)**: el objetivo es limitar los picos de contaminación a corto plazo.

Aparte de las 33 sustancias prioritarias ya identificadas por la Comisión, ésta propuso el estudio y evaluación de posibles riesgos de otras 15 sustancias a través de la *Propuesta de Directiva [COM (2011) 876 final]* que son las siguientes:

- **Sustancias fitosanitarias**: aclonifén, bifenox, cipermetrina, dicofol, heptacloro y quinoxifeno.
- **Sustancias utilizadas en biocidas**: cibutrina, diclorvós y terbutrina.
- **Sustancias químicas industriales**: ácido perfluorooctanosulfónico (PFOS) y hexabromociclododecano (HBCDD).
- **Productos derivados de la combustión**: dioxina y policlorobifenilos (PCB) similares a las dioxinas.
- **Sustancias farmacéuticas**: 17- $\alpha$ -etinilestradiol (EE2), 17- $\beta$ -estradiol (E2) y diclofenaco.

Finalmente, de estas 15 sustancias únicamente 12 se han incorporado a la nueva lista de sustancias prioritarias a través de la aprobación de la nueva *Directiva 2013/39/CE, por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE* (ver

sustancias marcadas en azul en la Tabla 1), quedando fuera por el momento las sustancias farmacéuticas (ver sustancias marcadas en rojo en la Tabla 1). Sin embargo, esta nueva Directiva prevé la creación por parte de la Comisión de una **lista de observación** de sustancias sobre las que deben recabarse datos de seguimiento a nivel de la Unión Europea para que sirvan de base a futuros ejercicios de asignación de prioridad. La Directiva establece que la primera lista de observación incluirá como máximo 10 sustancias o grupos de sustancias e indicará las matrices de seguimiento y los posibles métodos de análisis que no generen costes excesivos, para cada sustancia. Las sustancias susceptibles de inclusión en la lista de observación se seleccionarán entre aquellas de las que la información disponible indique que pueden suponer un riesgo significativo para el medio acuático o a través de éste, y para las que los datos de seguimiento sean insuficientes. En la primera lista de observación se incluirán el diclofenaco, 17- $\beta$ -estradiol y el 17- $\alpha$ -etinilestradiol para recabar datos de seguimiento con el fin de que faciliten la determinación de medidas adecuadas para afrontar el riesgo que suponen dichas sustancias. Por tanto, la lista de sustancias prioritarias es una lista abierta y puede ampliarse ante nuevas evidencias de riesgo de determinadas sustancias. Esta circunstancia hace evidente la insuficiente información que actualmente existe todavía sobre multitud de sustancias presentes en el medio ambiente, y por ende, la necesidad de continuar investigando en éste área.

**Tabla 1. Normas de calidad ambiental (NCA) para las sustancias prioritarias y otros contaminantes**

Nº	NOMBRE SUSTANCIA	Nº CAS <sup>1</sup>	NCA-MA <sup>2</sup> Aguas superficiales continentales <sup>3</sup>	NCA-MA <sup>2</sup> Otras aguas superficiales	NCA-CMA <sup>4</sup> Aguas superficiales continentales <sup>3</sup>	NCA-CMA <sup>4</sup> Otras aguas superficiales	NCA Biota <sup>5</sup>
(1)	Alacloro	15972-60-8	0,3	0,3	0,7	0,7	
(2)	Antraceno	120-12-7	0,1	0,1	0,1	0,1	
(3)	Atrazina	1912-24-9	0,6	0,6	2,0	2,0	
(4)	Benceno	71-43-2	10	8	50	50	
(5)	Difeniléteres bromados	32534-81-9	4,9 10 <sup>-8</sup>	2,4 10 <sup>-9</sup>	0,14	0,14	0,0085
(6)	Cadmio y sus compuestos (en función de las clases de dureza del agua)	7440-43-9	≤ 0,08 (clase 1) 0,08 (clase 2) 0,09 (clase 3) 0,15 (clase 4) 0,25 (clase 5)	0,2	≤ 0,45 (clase 1) 0,45 (clase 2) 0,6 (clase 3) 0,9 (clase 4) 1,5 (clase 5)	≤ 0,45 (clase 1) 0,45 (clase 2) 0,6 (clase 3) 0,9 (clase 4) 1,5 (clase 5)	
(6 bis)	Tetracloruro de carbono	56-23-5	12	12	No aplicable	No aplicable	
(7)	Cloroalcanos C10-13	85535-84-8	0,4	0,4	1,4	1,4	
(8)	Clorfeninfos	470-90-6	0,1	0,1	0,3	0,3	
(9)	Clorpirifos	2921-88-2	0,03	0,03	0,1	0,1	
(9 bis)	Plaguicidas de tipo ciclodieno: Aldrina, Dieldrina, Endrina, Isodrina	309-00-2 60-57-1 72-20-8 465-73-6	Σ = 0,01	Σ = 0,005	No aplicable	No aplicable	
(9 ter)	DDT total	No aplicable	0,025	0,025	No aplicable	No aplicable	
	para-para-DDT	50-29-3	0,01	0,01	No aplicable	No aplicable	
(10)	1,2-dicloroetano	107-06-2	10	10	No aplicable	No aplicable	
(11)	Diclorometano	75-09-2	20	20	No aplicable	No aplicable	
(12)	Ftalato de di(2-etilhexilo) (DEHP)	117-81-7	1,3	1,3	No aplicable	No aplicable	
(13)	Diurón	330-54-1	0,2	0,2	1,8	1,8	
(14)	Endosulfán	115-29-7	0,005	0,0005	0,01	0,004	
(15)	Fluoranteno	206-44-0	0,0063	0,0063	0,12	0,12	30
(16)	Hexaclorobenceno	118-74-1			0,05	0,05	10
(17)	Hexaclorobutadieno	87-68-3			0,6	0,6	55
(18)	Hexaclorociclohexano	608-73-1	0,02	0,002	0,04	0,02	
(19)	Isoproturón	34123-59-6	0,3	0,3	1,0	1,0	
(20)	Plomo y sus compuestos	7439-92-1	1,2	1,3	14	14	
(21)	Mercurio y sus compuestos	7439-97-6			0,07	0,07	20
(22)	Naftaleno	91-20-3	2	2	130	130	
(23)	Níquel y sus compuestos	7440-02-0	4	8,6	34	34	
(24)	Nonilfenoles (4-nonifenol)	84852-15-3	0,3	0,3	2,0	2,0	
(25)	Octilfenoles ((4-(1,1',3,3'-tetrametilbutil-fenol))	140-66-9	0,1	0,01	No aplicable	No aplicable	
(26)	Pentaclorobenceno	608-93-5	0,007	0,0007	No aplicable	No aplicable	
(27)	Pentaclorofenol	87-86-5	0,4	0,4	1	1	
(28)	Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)	No aplicable	No aplicable	No aplicable	No aplicable	No aplicable	
	Benzo(a)pireno	50-32-8	1,7 10 <sup>-4</sup>	1,7 10 <sup>-4</sup>	0,27	0,27	2 para peces
	Benzo(b)fluoranteno	205-99-2			0,017	0,017	5 para crustáceos y cefalópodos
	Benzo(k)fluoranteno	207-08-9			0,017	0,017	
	Benzo(g, h, i)perileno	191-24-2			8,2 10 <sup>-3</sup>	8,2 10 <sup>-4</sup>	10 para moluscos
	Indeno(1,2,3-d)pireno	193-39-5					
(29)	Simazina	122-34-9	1	1	4	4	
(29 bis)	Tetracloroetileno	127-18-4	10	10	No aplicable	No aplicable	

(29 ter)	Tricloroetileno	79-01-6	10	10	No aplicable	No aplicable	
(30)	Compuestos de tributilestano	36643-28-4	0,0002	0,0002	0,0015	0,0015	
(31)	Triclorobencenos	12002-48-1	0,4	0,4	No aplicable	No aplicable	
(32)	Triclorometano	67-66-3	2,5	2,5	No aplicable	No aplicable	
(33)	Trifluralina	1582-09-8	0,03	0,03	No aplicable	No aplicable	
(34)	Dicofol	115-32-2	$1,3 \cdot 10^{-3}$	$3,2 \cdot 10^{-5}$	No aplicable	No aplicable	33
(35)	Ácido perfluorooctano-sulfónico y sus derivados (PFOS)	1763-23-1	$6,5 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^{-4}$	36	7,2	9,1
(36)	Quinoxifeno	124495-18-7	0,15	0,015	2,7	0,54	
(37)	Dioxinas y compuestos similares						Suma PCDD + PCDF+ PCBDL 0,008 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ TEQ
(38)	Aclonifeno	74070-46-5	0,12	0,012	0,12	0,012	
(39)	Bifenox	42576-02-3	0,012	0,0012	0,04	0,004	
(40)	Cibutrina	28159-98-0	0,0025	0,0025	0,016	0,016	
(41)	Cipermetrina	52315-07-8	$8 \cdot 10^{-5}$	$8 \cdot 10^{-6}$	$6 \cdot 10^{-4}$	$6 \cdot 10^{-5}$	
(42)	Diclorvós	62-73-7	$6 \cdot 10^{-4}$	$6 \cdot 10^{-5}$	$7 \cdot 10^{-4}$	$7 \cdot 10^{-5}$	
(43)	Hexabromociclo-dodecano (HBCDD)		0,0016	0,0008	0,0	0,05	167
(44)	Heptacloro y epóxido de heptacloro	76-44-8/1024-57-3	$2 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-8}$	$3 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-5}$	$6,7 \cdot 10^{-3}$
(45)	Terbutrina	886-50-0	0,065	0,0065	0,34	0,034	
<b>LISTA DE OBSERVACIÓN (Directiva 2013/39/CE)</b>							
(46)	17- $\alpha$ -etinilestradiol	57-63-6	$3,5 \cdot 10^{-5}$	$7 \cdot 10^{-6}$	No aplicable	No aplicable	
(47)	17- $\beta$ -estradiol	50-28-2	$4 \cdot 10^{-4}$	$8 \cdot 10^{-5}$	No aplicable	No aplicable	
(48)	Diclofenaco	15307-79-6	0,1	0,01	No aplicable	No aplicable	

<sup>1</sup> CAS: *Chemical Abstracts Service*.

<sup>2</sup> Este parámetro es la NCA expresada como valor medio anual (NCA-MA). Salvo que se especifique otra cosa, se aplica a la concentración total de todos los isómeros.

<sup>3</sup> Las aguas superficiales continentales incluyen los ríos y los lagos y las masas de agua artificiales o muy modificadas conexas.

<sup>4</sup> Este parámetro es la NCA expresada como concentración máxima admisible (NCA-CMA). Cuando en la columna NCA-CMA se indica "no aplicable", se considera que los valores de NCA-MA protegen contra los picos de contaminación a corto plazo en el caso de los vertidos continuos, ya que son significativamente inferiores a los valores calculados sobre la base de la toxicidad aguda.

<sup>5</sup> Salvo indicación explícita en contra, las NCA de la biota se refieren a los peces.

## **Normativa en materia de sustancias y preparados químicos**

El Reglamento CE nº 1970/2006, del Parlamento Europeo y del Consejo, regula el registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y los preparados químicos (**REACH**), con el objetivo de garantizar un elevado nivel de protección de la salud humana y del medio ambiente, así como la libre circulación de sustancias en el mercado interior. El sistema **REACH** es un sistema integrado que pretende mejorar la protección de la salud humana y del medio ambiente, pero manteniendo al mismo tiempo la competitividad y reforzando el espíritu de innovación de la industria química europea. De esta forma, **REACH** obliga a las empresas que fabrican sustancias y preparados químicos a evaluar los riesgos derivados de su utilización y a adoptar las medidas necesarias para gestionar cualquier riesgo

identificado. Por tanto, la seguridad de las nuevas sustancias y preparados químicos que quieran comercializarse en la Unión Europea recae sobre la industria. En caso de que tras la evaluación de riesgos se sospeche que una sustancia puede presentar un riesgo para la salud humana o el medio ambiente, la **Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos** incluirá dicha sustancia en una lista específica, y un Estado miembro designado procederá a su evaluación para determinar si la empresa debe facilitar alguna información complementaria.

Este nuevo sistema es una herramienta que permite garantizar un mayor control sobre los nuevos productos químicos potencialmente contaminantes que salen al mercado, y que podrían afectar al medio ambiente y a nuestra propia salud. Se trata, por tanto, de un paso más hacia el control de la comercialización de nuevos productos químicos, que pueden alcanzar el medio ambiente europeo, y sobre los cuales, hasta el desarrollo de este Reglamento, poco se conocía en cuanto a mecanismos de acción e interacción en el medio natural y posibles riesgos o efectos para los ecosistemas naturales y el ser humano. Sin embargo, muchos de los productos no se detectan en los ensayos de toxicidad ya que sus efectos son a dosis muy bajas, y acaban saliendo al mercado y siendo de amplio uso para la población.

### ***Contaminantes emergentes***

Para poder mejorar el estado químico de las masas de agua superficial y subterránea resulta necesario continuar trabajando en aumentar el conocimiento sobre los posibles contaminantes que, en la actualidad, forman parte de nuestra vida diaria, y que podrían afectar a nuestra salud, así como a los ecosistemas acuáticos y terrestres.

En este sentido, los “***contaminantes emergentes***” son compuestos de diferente naturaleza cuya presencia en los diferentes compartimientos medioambientales y las posibles consecuencias de la misma han pasado inadvertidas hasta hace algunos años (Barceló and López de Alda 2011). Por ello, están poco regulados y la disponibilidad de métodos para su análisis es todavía escasa. A pesar de ello, el desarrollo de nuevos métodos de análisis, ya desde 1977 con los estudios de Hignite and Azarnoff (1977) hasta la actualidad, ha permitido detectar estos contaminantes en diferentes matrices y a concentraciones realmente bajas. De hecho en la actualidad el estudio de la presencia de

contaminantes emergentes es una de las líneas prioritarias de investigación en las políticas medioambientales y de salud pública. Otra particularidad que cabe destacar con respecto a este tipo de contaminantes es que su introducción en el medio ambiente es continua debido a su elevada producción y consumo en la actividad humana, y por tanto, no necesitan ser persistentes para encontrarse en el medio ambiente y ocasionar efectos negativos (Petrovic et al. 2003).

Los “*contaminantes emergentes*” abarcan una amplia variedad de productos de uso industrial y doméstico. Entre ellos se incluyen productos de higiene personal, médicos y farmacéuticos, productos industriales y para el hogar (Tabla 2). Muchos de estos compuestos han sido detectados en las aguas residuales de plantas de tratamiento y en aguas superficiales, subterráneas, marinas, sedimentos y algunos de ellos incluso en aguas potables (Halling-Sorensen et al. 1998, Bester et al. 2001, Kuster et al. 2008, Benotti et al. 2009, Pal et al. 2010, Brausch and Rand 2011, Deblonde et al. 2011, Bono-Blay et al. 2012). Además, algunos están incluidos en la lista de sustancias prioritarias de la *Directiva Marco del Agua*, como por ejemplo, los retardantes de llama difenil éteres polibromados, los compuestos alquilfenólicos etoxilados y sus derivados y las parafinas cloradas. Y algunos se encuentran actualmente en fase de evaluación para su posible inclusión en la lista prioritaria, como es el caso del antiinflamatorio no esteroideo diclofenaco, o los estrógenos 17- $\alpha$ -etinilestradiol y 17- $\beta$ -estradiol.

**Tabla 2. Principales contaminantes emergentes**

GRUPOS DE CONTAMINANTES EMERGENTES	
Productos farmacéuticos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Antibióticos</li> <li>- Analgésicos y antiinflamatorio</li> <li>- Antidepresivos</li> <li>- Ansiolíticos</li> <li>- Reguladores de lípidos</li> <li>- Betabloqueantes</li> <li>- Medios de contraste para rayos x</li> </ul>
Drogas de abuso	Cocaínicos, anfetamínicos, cannabinoides, opiáceos, alucinógenos
Esteroides u hormonas	Estradiol, estrona, estriol, Dietilestilbestrol
Productos para el cuidado personal	Fragancias, nitropolicíclicos y macrocíclicos, parabenos, antimicrobianos
Agentes para protección de la luz solar	Benzofenona, metilbenzilideno
Repelentes de insectos	N N-dietyl-toluamida
Antisépticos	Triclosán o clorofeno
Agentes de limpieza	Alquilfenoles y carboxilados alquilfenoles
Retardantes de llama	Éteres polibromados
Agentes y aditivos industriales	2-cloroetilfosfato
Aditivos para la gasolina	Éteres de alquilo o éter metil-t-butilo
Subproductos de la desinfección	Bromoácidos, bromoacetnitrilos, bromatos
Otras sustancias	Nicotina, cafeína

## Los fármacos como contaminantes emergentes

Entre los “*contaminantes emergentes*” cabe destacar el grupo de los fármacos y sus metabolitos. Los fármacos se utilizan para multitud de fines en la sociedad moderna, pero son contaminantes cuando se encuentran en el medio ambiente (Halling-Sorensen et al. 1998). En ocasiones estos compuestos no se gestionan adecuadamente y son vertidos directamente a través de los desagües, o en otros casos no se metabolizan completamente en el cuerpo humano y son excretados a través de la orina y las heces. De cualquier modo terminan en las EDARs donde no son completamente eliminados con los tratamientos actuales, llegando finalmente al medio ambiente acuático. En la actualidad la contaminación por fármacos es una preocupación medioambiental en muchos países y por ello, la investigación en este campo es muy extensa en los últimos años (Fatta-Kassinos et al. 2011). Como resultado de estas investigaciones, muchos grupos terapéuticos de fármacos como los antiinflamatorios, cardiovasculares, analgésicos, antibióticos, esteroides etc., se han detectado tanto en plantas de tratamiento de aguas residuales, como en agua superficial, subterránea, agua marina, sedimentos e incluso agua potable (Halling-Sorensen et al. 1998, Ternes 1998, Heberer 2002, Collier 2007, Kasprzyk-Hordern et al. 2008, Fatta-Kassinos et al. 2011, Fram and Belitz 2011). Además, debido a los recientes avances tecnológicos estos contaminantes se pueden detectar a niveles de nanogramos por litro (ng/l) (Ternes 1998, Heberer 2002, Kolpin et al. 2002).

La presencia de fármacos en las aguas continentales se ha estudiado en el centro y este de Europa, países mediterráneos, Sur y Norteamérica y Asia (Glassmeyer et al. 2008). La primera investigación llevada a cabo por Ternes (1998) sobre productos farmacéuticos y sus residuos en el agua mostró que el 80% de los 32 medicamentos analizados fueron detectados en el efluente de al menos una de las plantas de tratamiento de aguas residuales. Asimismo, se detectaron 20 medicamentos diferentes y cuatro metabolitos en diferentes ríos y corrientes de agua de Alemania (Ternes 1998). En agua potable y de grifo los principales estudios se han realizado en Alemania, Italia, Francia y Finlandia (Vieno et al. 2007, Mompelat et al. 2009). En España se han realizado estudios sobre la eficacia de las EDARs en la eliminación de fármacos con nuevos métodos analíticos (Carballa et al. 2004, Gros et al. 2007, Carballa et al. 2008b,

Martínez-Bueno et al. 2010), pero hay pocos estudios sobre la presencia de fármacos en el medio ambiente y agua potable y los que existen se han llevado a cabo, desde el año 2009, principalmente en la zona Noreste de la Península (Huerta-Fontela et al. 2008, Kuster et al. 2008, Gros et al. 2010).

El consumo de medicamentos a nivel mundial difiere en función del país de que se trate. La Organización Mundial de la Salud (OMS) (Hoebert et al. 2011) establece 4 categorías de consumo de medicamentos: Alta, Media-alta, Media-baja y Baja. De acuerdo con dicha clasificación, los países con mayor consumo de medicamentos son los países más desarrollados (Europa, Norte América, Australia y Japón). De hecho, en el año 2003, América del Norte, Europa y Japón concentraron el 88% del consumo farmacéutico del mundo (Tabla 3) (IMS Health 2004). Asimismo, el consumo de medicamentos en el mundo crece a una tasa sostenida del 7 al 8% anual desde hace varios años, y el aumento es más rápido en países desarrollados y en los sectores con mayor poder adquisitivo.

**Tabla 3. Consumo farmacéutico por región (2003)**

MERCADO MUNDIAL AUDITADO	Venta (US\$B)*	% venta mundial (US\$)	% crecimiento año tras año
Norte América	229,5	49	+11
Europa (UE)	115,4	25	+8
Resto de Europa	14,3	3	+14
Japón	52,4	22	+3
Asia (excluyendo Japón), África y Australia	37,3	8	+12
América latina	17,4	4	+6
<b>TOTAL</b>	<b>466,3</b>	<b>100</b>	<b>+9</b>

\* US\$B: miles de millones de dólares.

Fuente: IMS *World Review* 2004.

De entre los 10 grupos terapéuticos más consumidos en el mundo (2003), cuatro de ellos (reductores de colesterol y triglicéridos, antipsicóticos, productos de eritropoyetina y antiepilépticos) crecieron más de un 10% al año, siendo los antiepilépticos y los antipsicóticos aquellos fármacos en los que el consumo ha crecido más con un 22% y 20%, respectivamente (Tabla 4) (IMS Health 2004).

**Tabla 4. Consumo de los principales subgrupos terapéuticos (2003)**

SUBGRUPOS TERAPÉUTICOS		Venta 2003 (US\$B)*	% venta mundial (US\$)	% crecimiento año tras año
1.	<b>Reductores de colesterol y triglicéridos</b>	26,1	6	+14
2.	<b>Antiulcerantes</b>	24,3	5	+9
3.	<b>Antidepresivos</b>	19,5	4	+10
4.	<b>Antirreumáticos no esteroideos</b>	12,4	3	+6
5.	<b>Antipsicóticos</b>	12,2	3	+20
6.	<b>Antagonistas del calcio</b>	10,8	2	+2
7.	<b>Productos de eritropoyetina</b>	10,1	2	+16
8.	<b>Antiepilépticos</b>	9,4	2	+22
9.	<b>Antidiabéticos orales</b>	9,0	2	+10
10.	<b>Cefalosporinas y combinaciones</b>	8,3	2	+3
	<b>TOTAL</b>	142,0	30%	+11%

\* US\$B: miles de millones de dólares.

Fuente: IMS *World Review* 2004.

Dentro de la Unión Europea, España ocupa el quinto lugar en gasto farmacéutico. Concretamente, de acuerdo con el último informe publicado del Sistema Nacional de Salud (Volumen 34, N° 3/2010), el importe total de la prestación farmacéutica a través de receta en 2009 fue de 13.850,86 millones de euros, de los cuales 12.711,68 millones han correspondido a medicamentos (91,78% del importe total). En la Tabla 5 se recogen los subgrupos ATC (*Anatomical, Therapeutic, Chemical*), según el sistema de clasificación de grupos terapéuticos de la OMS, de mayor consumo en el Sistema Nacional de Salud en el año 2009.

**Tabla 5. Subgrupos ATC de mayor consumo en 2009 ordenados por importe PVP**

Subgrupo ATC	Nombre	Consumo (mill. €)	Envases (miles)	Precio medio/envase	% del total	Δ% 2009/2008 (en importe)	Δ% 2009/2008 (en envases)
C10AA	Inhibidores de la HMG CoA reductasa	915,38	43.331,20	21,13	7,20	6,61	10,58
A02BC	Inhibidores bomba de protones	636,81	65.053,04	9,79	5,01	-1,59	9,54
R03AK	Adrenérgicos y otros agentes contra padecimientos obstructivos vías respiratorias	559,76	8.179,59	68,43	8,21	8,18	8,21
C09CA	Antagonistas de la anltensina II y monofármacos	522,76	19.284,46	27,09	4,11	4,33	5,79
C09DA	Antagonistas de la anltensina II y diuréticos	432,37	14.496,77	29,82	3,40	7,58	7,44
N03AX	Otros antiepilépticos	388,14	6.964,84	55,73	3,05	10,56	13,85
B01AC	Inhibidores agregación plaquetaria, excluyendo heparina	362,12	30.270,77	11,96	2,85	4,59	5,43
N06AB	Antidepresivos: ISRS	342,89	17.690,11	19,38	2,70	-3,76	4,95
N06AX	Otros antidepresivos	329,23	9.548,85	34,48	2,59	9,33	13,66
M05BA	Bifosfonatos	286,05	8.930,36	32,03	2,25	5,53	7,73
N05AX	Otros antipsicóticos	264,68	2.572,19	102,90	2,08	11,17	1,92
N05AH	Diazepinas, oxazepinas y tiazepinas	262,18	3.300,99	79,43	2,06	2,20	17,19
N06DA	Antidemencia: Anticolinesterasas	212,43	1.743,91	121,81	1,67	8,87	5,16
R03BB	Otros agentes contra padecimientos obstructivos vías respiratorias, inhalatorios: Anticolinérgicos	201,68	5.589,20	36,08	1,59	8,75	6,26
A10AE	Insulinas y análogos de acción prolongada	188,97	2.447,99	77,19	1,49	14,51	14,42
C08CA	Derivados de la dihidropiridina	182,79	13.934,87	13,12	1,44	-9,00	0,78
G04CA	Fármacos hipertrofia prostática benigna: Antagonistas de receptores α adrenérgicos	163,06	7.070,29	23,06	1,28	1,35	6,21
M01AE	AINEs y antirreumáticos: Derivados del ácido propiónico	158,98	33.356,52	4,77	1,25	0,11	7,12
B01AB	Grupo de la heparina	157,12	2.512,12	62,55	1,24	8,45	3,60
C10AX	Otros agentes modificadores de lípidos	137,52	3.477,64	39,54	1,08	17,80	21,32
L02AE	Antineoplásticos: Análogos hormona liberadora gonadotrofinas	129,77	407,08	318,78	1,02	1,17	-3,79
L02BG	Inhibidores enzimáticos	121,28	855,38	141,79	0,95	-1,07	3,75
L01XE	Inhibidores de la proteinquinasa	121,01	49,58	2.440,89	0,95	224,72	381,90
N05BA	Ansiofíticos: Derivados de benzodiazepina	119,11	46.883,12	2,54	0,94	0,86	2,24
N02AB	Analgésicos opiodes: derivados de la fenilpiperidina	116,63	2.155,82	54,10	0,92	-7,87	9,24

<b>C09AA</b>	IECA, monofármacos	112,04	20.827,89	5,38	0,88	-15,04	0,42
<b>R03DC</b>	Antagonistas del receptor de leucotrienos	111,36	2.571,39	43,31	0,88	10,04	10,10
<b>N02BE</b>	Otros analgésicos antipiréticos: anilidas	110,79	38.846,22	2,85	0,87	1,28	4,96
<b>G04BD</b>	Antiespasmódicos urinarios	105,59	2.180,81	48,42	0,83	15,20	7,98
<b>A10AD</b>	Combinación de insulinas y análogos de acción intermedia y rápida	101,54	2.180,71	46,56	0,80	-0,47	-1,79
<b>N02AX</b>	Otros opioides	101,29	10.578,95	9,57	0,80	11,87	15,95
<b>M01AX</b>	Otros agentes antiinflamatorios y antireumáticos no esteroideos	97,71	7.016,34	13,93	0,77	5,24	5,47
<b>L04AA</b>	Inmunosupresores selectivos	95,72	642,89	148,89	0,75	-53,29	-60,39
<b>M01AH</b>	Coxibs	94,48	2.706,15	34,91	0,74	30,36	31,29
<b>L04AD</b>	Inhibidores de la calcineurina	93,96	977,23	96,15	0,74	4,13	-1,46
<b>S01EE</b>	Preparados contra glaucoma: análogos prostaglandinas	91,59	4.296,41	21,32	0,72	2,06	1,91
<b>N06DX</b>	Otros fármacos antidepresión	90,18	2.301,61	39,18	0,71	12,83	6,32
<b>C01DA</b>	Vasodilatadores: nitratos orgánicos	89,43	5.323,40	16,80	0,70	-2,25	-3,17
<b>C05CA</b>	Agentes estabilizadores capilares: bioflavonoides	89,42	8.348,70	10,71	0,70	4,96	6,15
<b>J01CR</b>	Combinación de penicilinas, incluyendo inhibidores de $\beta$ lactamasa	88,18	10.431,30	8,45	0,69	-0,03	0,42
<b>TOTAL (%).....</b>		<b>69,11</b>	<b>IMPORTE (mill. €).....</b>		<b>8.785,62</b>		

La Tabla 5 muestra que, en cuanto a consumo de medicamentos, el grupo ATC de los fármacos destinados al sistema nervioso central (Grupo N) se sitúa en el segundo lugar, por detrás del grupo de fármacos cardiovasculares (Grupo C). Los problemas de salud mental son una preocupación creciente para la salud pública y los fármacos psicoactivos son un grupo terapéutico particular debido a las implicaciones socioculturales en torno a su uso. El estudio de Calisto and Esteves (2009) muestra el amplio uso de este tipo de fármacos cuyo consumo se ha incrementado drásticamente en los últimos años. Además, los fármacos psicoactivos son un grupo de medicamentos comúnmente recetados y en otros muchos casos se consumen sin receta médica.

En España durante el periodo 2000-2007 los grupos más consumidos fueron los ansiolíticos, seguidos por los antidrepressivos y los hipnóticos y sedantes (Simó Miñana 2012). Según el banco “*Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) Health Data*” (OECD Health Data 2013), España se encuentra actualmente en el grupo de países con mayor consumo de ansiolíticos de Europa (ocupando el quinto

lugar). De hecho, en el periodo 2000 y 2007, el consumo español de ansiolíticos fue un 37% superior a la media europea (Tabla 6) con una tendencia creciente durante estos últimos años (Figura 2) (Simó Miñana 2012). Finalmente, es importante destacar que el consumo de este tipo de medicamentos está relacionado con dos factores importantes: el sexo y la edad (Carrasco et al. 2001). De acuerdo con la “*Encuesta sobre Alcohol y Drogas en la Población General de España, EDADES 2011-2012*” (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad 2013), la mayor prevalencia en el consumo de hipnosedantes se da en el grupo de edad de 55-64 años con un 27% en mujeres y un 11% en hombres.

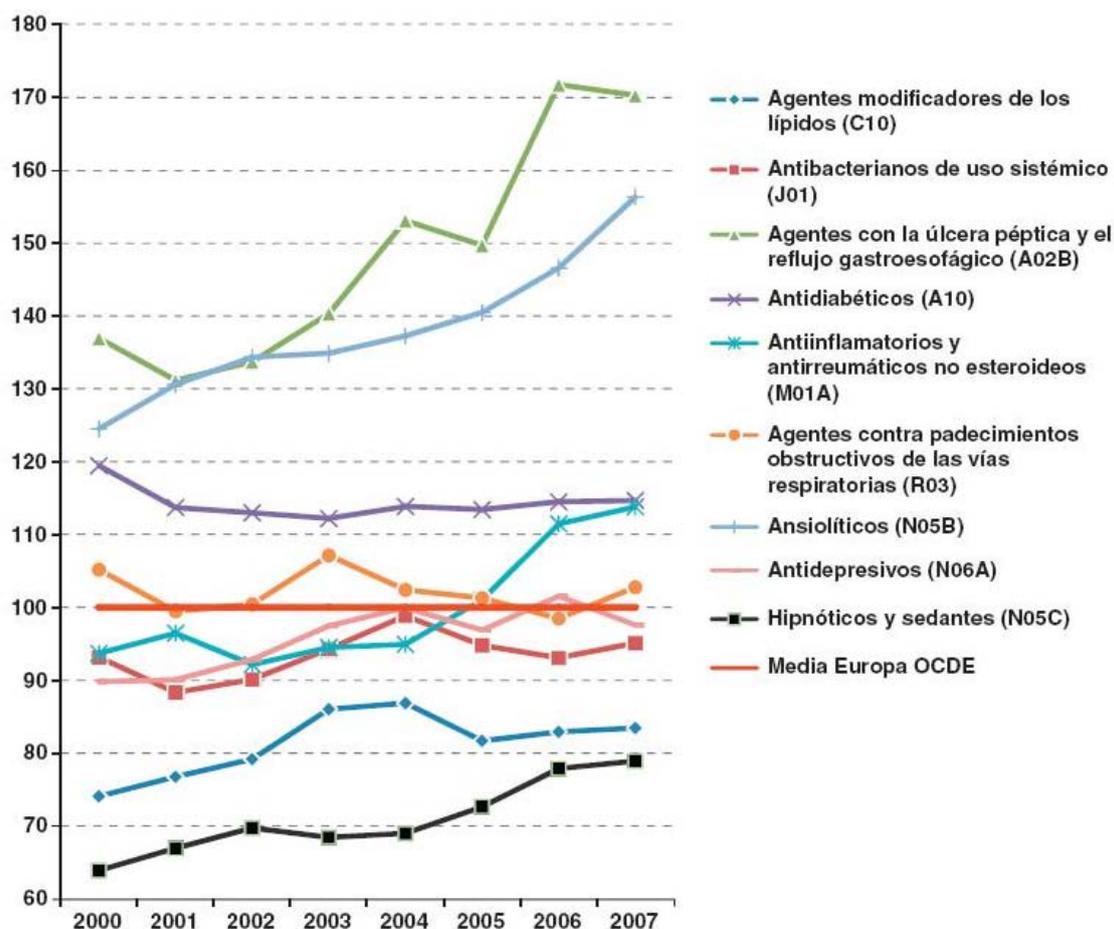
**Tabla 6. Consumo (en DHD, Dosis Habitante Definida) de algunos grupos terapéuticos entre los países europeos de la OCDE. Promedio del periodo 2000-2007**

	A02B	A10	C10	J01	M01A	N05B	N06A	N05C	R03	C02	C03	C07	C08	C09	Anti-HTA
<b>Alemania</b>	33,0	59,5	33,1	13,4 <sup>g</sup>	32,5	6,6	26,5	8,0	46,2	12,7	66,7	66,8	52,4	145,7	344,3
<b>Austria</b>	ND	ND	ND	13,1	ND	ND									
<b>Bélgica</b>	38,1	38,5	98,1	24,2	36,8	ND	49,5	ND	53,8	5,3	42,9	65,4	39,1	84,2	236,9
<b>Dinamarca</b>	28,4	30,1	73,8 <sup>c</sup>	14,0	44,6	20,6	52,9	31,5	62,3	2,5	109,3	28,0	47,0	80,9	267,6
<b>España</b>	57,9	49,5	60,8	18,8	48,8	43,0	40,9	21	56,8	7,3 <sup>b</sup>	37,2	17,5	35,9	108,3	206,0
<b>Finlandia</b>	27,7	59,1	83,3 <sup>c</sup>	18,3	70,1	31,2	47,7	53,4	51,5	1,7	62,0	65,7	47,1	115,1	291,5
<b>Francia</b>	47,1	43,1	108,0	30,0	43,0	57,4	46,4	ND	ND	13,6	ND	52,2	42,9	103,0	211,7
<b>Grecia</b>	35,2 <sup>a</sup>	52,9 <sup>a</sup>	ND	32,9 <sup>b</sup>	50,8 <sup>a</sup>	29,5 <sup>a</sup>	27,7 <sup>a</sup>	16,6 <sup>a</sup>	66,0 <sup>a</sup>	6,8 <sup>a</sup>	34,6 <sup>a</sup>	26,3 <sup>a</sup>	63,5 <sup>a</sup>	124,2 <sup>a</sup>	255,5
<b>Hungría</b>	39,8 <sup>b</sup>	51,0 <sup>b</sup>	61,6 <sup>b,i</sup>	18,3 <sup>b</sup>	40,7 <sup>b</sup>	46,9 <sup>b</sup>	19,0 <sup>b</sup>	23,7 <sup>b</sup>	27,7 <sup>b</sup>	16,9 <sup>b</sup>	40,9 <sup>b</sup>	49,7 <sup>b</sup>	71,9 <sup>b</sup>	140,6 <sup>b</sup>	320,1
<b>Italia</b>	ND	ND	ND	25,6	ND	ND									
<b>Irlanda</b>	ND	ND	ND	20,0	ND	ND									
<b>Islandia</b>	49,2	21,5	71,1	20,9 <sup>b</sup>	64,4	25,6	87,4	62,6	45,2	1,3	64,1	44,6	30,6	78,2	218,8
<b>Luxemburgo</b>	48,5	41,2	116,4 <sup>e</sup>	25,6	55,3	47,2 <sup>f</sup>	41,6 <sup>f</sup>	51,9 <sup>f</sup>	23,4 <sup>f</sup>	3,3	23,5	35,3	33,3 <sup>f</sup>	91,1 <sup>h</sup>	186,5
<b>Noruega</b>	28,0	35,6	109,0	15,7 <sup>c</sup>	44,6	20,4	49,4	38,2	61,6	7,0	45,3	38,4	46,8	95,0	232,5
<b>Países Bajos</b>	50,8 <sup>c</sup>	55,8 <sup>c</sup>	94,6 <sup>c</sup>	10,0 <sup>b</sup>	28,6 <sup>c</sup>	17,8 <sup>c</sup>	36,4 <sup>c</sup>	22,0 <sup>c</sup>	62,0 <sup>c</sup>	3,0 <sup>c</sup>	53,5 <sup>c</sup>	45,4 <sup>c</sup>	35,3 <sup>c</sup>	88,7 <sup>c</sup>	225,9
<b>Polonia</b>	ND	ND	ND	21,5 <sup>g</sup>	ND	ND									
<b>Portugal</b>	40,7	46,5	64,2	24,2	64,1	72,1	41,9	14,8	23,0	0,5 <sup>c</sup>	42,2	16,9	36,5	103,0	198,9
<b>República Checa</b>	27,3	45,1	65,4	16,5 <sup>f</sup>	61,2	19,3	20,2	15,4	33,5	7,3	38,6	67,6	60,4	96,8	270,7
<b>República Eslovaca</b>	18,3	32,7	36,1	25,7	52,2	19,7	15,3	13,3	25,3	10,4	34,6	41,1	59,9	93,1	239,1
<b>Suecia</b>	38,8	42,2	70,4	15,2	48,6	16,4	61,9	49,7	51,9	1,8	86,0	51,7	41,2	84,2	264,9
<b>Suiza</b>	ND	ND	ND	9,0 <sup>i</sup>	ND	ND									
<b>Reino Unido</b>	48,9 <sup>d</sup>	37,3	159,2 <sup>d</sup>	14,9 <sup>g</sup>	32,0 <sup>d</sup>	28,7 <sup>d</sup>	47,6	12,1 <sup>d</sup>	60,3 <sup>d</sup>	14,7 <sup>d</sup>	72,8 <sup>d</sup>	34,1 <sup>d</sup>	63,1 <sup>d</sup>	136,9 <sup>d</sup>	321,5
<b>Media</b>	38,7	43,6	81,5	19,4	48,1	31,4	41,9	28,9	46,3	6,8	53,4	43,9	47,5	47,5	255,6

ND: sin datos; A02B: agentes contra la úlcera péptica y el reflujo gastroesofágico; A10: antidiabéticos; C10: agentes modificadores de lípidos; J01: antibacterianos de uso sistémico; M01A: antiinflamatorios y antirreumáticos no esteroideos; N05B: ansiolíticos; N06A: antidepresivos; N05C: hipnóticos y sedantes; R03: agentes contra padecimientos obstructivos de las vías respiratorias; C02: antihipertensivos; C03: diuréticos; C07: betabloqueantes; C08: bloqueantes del canal del calcio; C09: agentes activos sobre el sistema renina-angiotensina; anti-HTA: C02+C03+C07+C08+C09; DHD: DDD/1.000 hab./día (Dosis diarias definidas por 1.000 habitantes día).

<sup>a</sup>ND para 2005-2007; <sup>b</sup>ND para 2007; <sup>c</sup>ND para 2000; <sup>d</sup>ND para 2000-2004; <sup>e</sup>ND para 2000-2005; <sup>f</sup>ND para 2000-2002; <sup>g</sup>ND para 2006-2007; <sup>h</sup>ND para 2000-2003; <sup>i</sup>datos sólo para 2004.

Fuente: *OECD Health Data 2009*.



**Figura 2. Evolución del consumo español de los distintos grupos de antihipertensivos en relación con la media de consumo de los países europeos de la OCDE. Periodo 2000-2007**

Dentro del grupo de los fármacos psicoactivos, la investigación internacional y europea se ha centrado en la detección ambiental del antiepiléptico carbamazepina (Ternes 1998, Heberer 2002, Moldovan et al. 2007, Kasprzyk-Hordern et al. 2008, Zhou et al. 2010a), los antidepresivos citalopram, sertralina, fluoxetina y venlafaxina (Metcalf et al. 2010, Schultz et al. 2010) y dentro del grupo de los hipnosedantes, la benzodiacepina diazepam (Heberer 2002, Moldovan et al. 2007). En España, la presencia de fármacos psicoactivos se ha estudiado principalmente en las cuencas de los ríos Ebro, Llobregat y en la región de Madrid (Gros et al. 2007, Huerta-Fontela et al. 2008, González et al. 2010). Sin embargo, aún es escasa la información sobre presencia de ansiolíticos del grupo de las benzodiacepinas en las aguas superficiales y potables tanto de España como de Europa, a pesar de que es uno de los grupos de medicamentos más consumidos por la población.

La presencia de productos farmacéuticos en el medio ambiente acuático todavía muestra muchas incógnitas en relación con su potencial biológico para la flora, fauna y

para el ser humano (Fatta-Kassinos et al. 2011). En la actualidad, aún son escasos los datos disponibles sobre la presencia de fármacos en los puntos de consumo de agua potable, en parte debido a la creencia de que los procesos de tratamiento actuales de agua potable eliminan completamente estos productos. Aunque los posibles riesgos asociados con la exposición a fármacos son previsiblemente más preocupantes en relación con el entorno natural, la preocupación de la población está más centrada en conocer los posibles riesgos de la exposición humana a estos compuestos (Jones et al. 2005).

En España, destaca la ciudad de Barcelona y sus alrededores como consumidores directos de agua de río potabilizada procedente del río Llobregat debido a la escasez de fuentes de agua subterránea. Aproximadamente, las ETAPs aportan el 40% del agua potable a la ciudad de Barcelona y a sus alrededores. El río Llobregat ha estado sometido durante la última década a sobreexplotación y al vertido de 30 plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas e industriales y de la escorrentía agrícola (González et al. 2012). Concretamente en sus aguas, se han encontrado concentraciones detectables de hasta 3090 ng/l y 4,2 ng/l del antiepiléptico carbamazepina y del antidepresivo fluoxetina, respectivamente (Muñoz et al. 2009, Ginebreda et al. 2010, López-Roldán et al. 2010). En la Comunidad de Madrid, desde el año 2010 se ha comenzado a abastecer a la población de la zona sur (Aranjuez, Colmenar de Oreja, Chinchón, Pinto, Parla, Getafe, San Martín de la Vega, Villaconejos, Valdelaguna, Belmonte de Tajo, Morata de Tajuña, Titulcia, Ciempozuelos, Valdemoro y Perales de Tajuña) con agua potabilizada del río Tajo a través de la ETAP de Colmenar de Oreja (<http://www.madrid.org/cs/>), y en la actualidad se está terminando la puesta a punto de la ETAP de Aranjuez (<http://www.espormadrid.es/2012/12/nueva-estacion-elevadora-del-deposito.html>), que presumiblemente abastecerá a mayor población que la de Colmenar de Oreja.

En las muestras de aguas de grifo analizadas en el estudio de Valcárcel et al. (2011a) en las principales zonas de abastecimiento de la Comunidad de Madrid, aquellas que reciben agua potabilizada del río Tajo, se registraron trazas detectables del antiepiléptico carbamazepina (4 ng/l) y del antidepresivo venlafaxina (9 ng/l).

## Disruptores endocrinos

La presencia de compuestos químicos con la capacidad de perturbar el sistema hormonal de los organismos, llamados *disruptores endocrinos*, ha alcanzado un gran interés para la comunidad científica debido, por un lado, a sus múltiples aplicaciones industriales y domésticas y por otro, a los potenciales efectos adversos sobre los organismos (Deblonde et al. 2011). En los últimos años se ha descubierto una asociación entre la exposición a disruptores endocrinos y determinados cambios en el metabolismo, desarrollo, crecimiento y reproducción de los organismos (Jackson and Sutton 2008). Entre los efectos observados se incluyen reducción de fertilidad, feminización, anomalías en los órganos reproductores y cambios en el comportamiento sexual de varios organismos acuáticos (peces, algas, anfibios, organismos bentónicos, etc.) (Pal et al. 2010). Debido a su impacto en multitud de actividades hormonales, los estudios más recientes en humanos se han centrado en los potenciales efectos que estos compuestos pueden producir sobre el sistema reproductivo y los sistemas fisiológicos, como el inmune, el cardiovascular y el sistema nervioso. En concreto, se ha demostrado que algunos compuestos organofosforados con actividad hormonal podrían estar involucrados en el incremento de incidencia de ciertos desórdenes metabólicos, como la obesidad y la diabetes tipo 2 (Lyche et al. 2011). Uno de los aspectos importantes en este sentido es el momento del ciclo de vida en el que se produce la exposición a estos compuestos, ya que algunos estudios han observado una mayor severidad en la exposición durante el desarrollo embrionario. La exposición a estas sustancias durante el embarazo o la infancia puede alterar el desarrollo de determinados órganos y circuitos de regulación y puede conducir a efectos tóxicos permanentes que pueden manifestarse en etapas posteriores de la vida (Lyche et al. 2011).

Actualmente, todavía es escasa la regulación sobre la presencia de disruptores endocrinos en el agua. En esta materia, la Unión Europea ha evaluado alrededor de 553 compuestos a partir de la lista original de sustancias candidatas en relación con su capacidad de perturbar el sistema hormonal. Como resultado de esta evaluación se han clasificado 194 sustancias en la *categoría 1* (clara evidencia de perturbación endocrina en organismos) y 125 en la *categoría 2* (posibilidad de perturbación endocrina en organismos) (Petersen et al. 2007). La presencia de alteradores endocrinos sintéticos y

sus concentraciones en ecosistemas naturales es un excelente marcador del impacto humano en el medio ambiente y un buen indicador de calidad del agua.

Los alquilfenoles son un grupo muy importante dentro del conjunto de compuestos con actividad perturbadora del sistema endocrino. Tanto el compuesto nonilfenol como el octilfenol pertenecen a la *categoría 1* de la lista de disruptores endocrinos prioritarios con efectos claros en la fauna y los humanos. Además, ambos compuestos pertenecen a la lista de 33 sustancias prioritarias de la *Directiva Marco del Agua 2000/60/CE, modificada a través de la Directiva 2008/105/CE relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas*, estando clasificadas como sustancias peligrosas prioritarias. Los metabolitos nonilfenol dietoxilado y nonilfenol monocarboxilado pertenecen a las *categorías 1* y *2*, respectivamente, de la lista de disruptores endocrinos prioritarios. Los alquilfenoles interfieren en el sistema endocrino y son bioacumulativos en los organismos acuáticos. Tal y como establece el “*European Chemicals Bureau (ECB)*” (ECB, 2002), los efectos tóxicos a largo plazo pueden ocurrir a concentraciones de 3,3 mg/l. Particularmente, se ha observado que el nonilfenol induce la producción de la vitelogenina (una proteína precursora de huevo) en los machos de trucha y reduce la producción de huevos en las hembras de pez cebra (Zoller 2006).

El bisfenol A pertenece a la *categoría 1* de la lista de disruptores endocrinos prioritarios, y recientemente ha sido incluido en la lista de sustancias bajo revisión para su identificación como sustancia prioritaria o peligrosa de acuerdo con la *Directiva 2008/105/CE*. A día de hoy, esta revisión ha concluido que no existe evidencia suficiente de riesgo importante para el medio ambiente acuático. Sin embargo, la Comisión Europea reevalúa periódicamente la información disponible de cada sustancia y si hubiese nuevas evidencias sería incorporada a la lista. Los efectos ecotoxicológicos del bisfenol A incluyen reducción de la fertilidad y de la calidad del esperma, inhibición de la ovulación en varias especies de peces, alteración en el desarrollo de la cola de los renacuajos en las especies de anfibios y anomalías en el desarrollo de los otolitos del pez cebra durante la embriogénesis (Gibert et al. 2011). Además, varios estudios recientes (An et al. 2013, Teng et al. 2013) han analizado la posible actividad estrogénica del bisfenol A (por ejemplo, interfiere en la contractibilidad uterina de las ratas y tiene efectos en la función del receptor andrógeno).

De acuerdo con la nueva *Directiva 2013/39/CE, sobre sustancias prioritarias y normas de calidad ambiental*, los compuestos estrogénicos 17- $\alpha$ -etinilestradiol y 17- $\beta$ -estradiol se incluirán en la primera lista de observación de sustancias sobre las que deben recabarse datos de seguimiento a nivel de la Unión Europea con el fin de que faciliten la determinación de medidas adecuadas para afrontar el riesgo que suponen dichas sustancias. La estrogenicidad de estas sustancias puede afectar a los organismos acuáticos alterando el funcionamiento normal de las hormonas, como ocurre con los peces expuestos a niveles extremadamente bajos de estradiol y etinilestradiol (0,1 a 10 ng/l) (Céspedes et al. 2004).

Los conservantes etilparabeno y propilparabeno pertenecen a la *categoría 1* de la lista prioritaria de disruptores endocrinos. De esta manera, la atención se ha centrado en los últimos años en los efectos potenciales a largo plazo de estos compuestos en los organismos acuáticos y en los seres humanos. Por otro lado, los parabenos son fácilmente absorbidos a través de la piel y por ello se han encontrado en la leche materna, el suero y la orina (Blanco et al. 2009). Sin embargo, varios estudios (Terasaki et al. 2009) sugieren que a pesar de que los parabenos tienen una respuesta estrogénica su potencia es menor que la del estradiol natural. Pero a pesar de ello la actividad estrogénica *in vitro* de los parabenos en células de cáncer de mama humano es elevada (Okubo et al. 2001, Dagher et al. 2012).

Aunque otros compuestos como los antimicrobianos, anticorrosivos y retardantes de llama organofosforados no están incluidos en la lista prioritaria de disruptores endocrinos, muchos de ellos se consideran candidatos o sospechosos de ser compuestos con capacidad de perturbar el sistema hormonal. Por ejemplo, el antimicrobiano triclosán es bioacumulativo y produce toxicidad crónica en las especies acuáticas (algas, peces, anfibios, etc.). Por otra parte, como resultado del desarrollo de resistencia cruzada, el triclosán puede producir cepas de bacterias que son resistentes a antimicrobianos y antibióticos. El impacto potencial medioambiental de la resistencia antimicrobiana en los ecosistemas acuáticos es bajo, aunque puede tener importantes implicaciones para la salud humana (Brausch and Rand 2011). La información sobre los impactos toxicológicos potenciales de los retardantes de llama organofosforados es todavía muy escasa. Entre ellos, el Tris (2-cloroetil) fosfato y el Tris (cloroisopropil) fosfato son los más importantes debido a su toxicidad, persistencia y movilidad. Según el *ECB* (ECB 2009), el Tris (2-cloroetil) fosfato podría ser carcinógeno y neurotóxico

para los animales, aunque sólo existen algunos estudios que resultan insuficientes. Otros estudios (Liu et al. 2012) han analizado la posible actividad estrogénica de estos compuestos como resultado de su habilidad para perturbar el equilibrio hormonal sexual a través de varios mecanismos, incluyendo alteraciones en la esteroidogénesis o metabolismo estrogénico. Por último, el benzotriazol y el tolitriazol (anticorrosivos) muestran una biodegradabilidad limitada y el benzotriazol se clasifica como tóxico para los organismos acuáticos (Kasprzyk-Hordern et al. 2008).

Algunas de las escasas investigaciones realizadas en este campo muestran la presencia de alteradores hormonales en las aguas residuales (Jackson and Sutton 2008, Zhou et al. 2010b), aguas naturales (fluviales, subterráneas y marinas) (Comeau et al. 2008, Jafari et al. 2009, Jonkers et al. 2010, Wang et al. 2012), y en las aguas potables (Loos et al. 2007, Benotti et al. 2009, Li et al. 2010, Amiridou and Voutsas 2011) de todo el mundo. Estos compuestos se producen como resultado de diferentes procesos de manufactura y no son completamente eliminados por las plantas de tratamiento de aguas residuales. En España, todavía son escasos los estudios sobre detección de alteradores endocrinos y su actividad estrogénica y la mayoría de ellos se centran en las zonas Noreste y Noroeste de la Península. De esta manera en la Comunidad Autónoma de Galicia, Carballa et al. (2008a, 2008b) detectaron la presencia del estrógeno etinilestradiol en aguas residuales. En la cuenca del río Llobregat los estudios conducidos por Muller et al. (2008), Kuster et al. (2010) y López-Roldán et al. (2010) detectaron los estrógenos estradiol, etinilestradiol, estrona, estrona 3-sulfato y estriol en las aguas residuales y potables de la ciudad de Barcelona. Por otra parte, en la misma cuenca, Blanco et al. (2009), Montes et al. (2009), Brix et al. (2010) y Pelayo et al. (2011) encontraron otros disruptores endocrinos como los parabenos, el triclosán y los alquifenoles. En la cuenca del río Ter, el trabajo de Céspedes et al. (2006) muestra también la presencia de alquifenoles y de bisfenol A. El estudio realizado por Camacho-Muñoz et al. (2010) en el Parque Natural de Doñana, detectó la presencia del estradiol y el etinilestradiol en las muestras tomadas durante los meses de verano. A pesar de ello, la mayoría de los estudios se centran en el análisis de un limitado número de compuestos, principalmente estrógenos naturales y sintéticos, bisfenol A y alquifenoles. Por tanto, es necesario realizar estudios que incluyan un mayor número de compuestos con capacidad de perturbar el sistema endocrino demostrada así como otros compuestos candidatos o sospechosos de poder actuar perturbando el sistema hormonal

de los organismos y seres humanos, ya que el análisis de un gran número de compuestos en las aguas superficiales proporciona importante información sobre la toxicidad potencial en las muestras.

### ***Riesgos ecotoxicológicos***

A pesar de los esfuerzos políticos para controlar y mejorar la calidad del agua, los ecosistemas acuáticos continúan siendo de los más amenazados por las diferentes fuentes (industrial y urbana) de contaminación humana. Problema que se ha acentuado en los últimos años ante la presencia de nuevos contaminantes emergentes en las aguas superficiales. La reducción de la calidad del agua puede tener efectos ecotoxicológicos para los organismos acuáticos, por lo que en los últimos años la comunidad científica se ha centrado en el estudio de la presencia de numerosos microcontaminantes antropogénicos así como de sus efectos en los ecosistemas acuáticos (Pal et al. 2010, González et al. 2012).

La aplicación de bioensayos para el control de la calidad de las aguas naturales es una importante herramienta para la adecuada valoración de la problemática ambiental que acarrea la presencia de “*contaminantes emergentes*”. El uso de bioensayos para evaluar la toxicidad es un enfoque holístico que ofrece una indicación de la biodisponibilidad y los efectos conjuntos de muestras ambientales completas en la biota. En concreto, existen varios bioensayos que permiten la observación de efectos letales causados por contaminantes relevantes, como por ejemplo, los métodos estándar validados que utilizan algas unicelulares (*Scenedesmus subspicatus*) o el cladóceros *Daphnia magna*. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que los microcontaminantes pueden inducir perturbación endocrina conduciendo a cambios importantes a nivel ecológico (Jjemba 2006, Feito et al. 2012, García-Camero et al. 2012, Feito et al. 2013). Estos efectos subletales sobre los organismos acuáticos pasan desapercibidos en los tests de toxicidad letal. Asimismo, los bioensayos estándar utilizan un número bajo de taxones y, en algunos casos, los resultados no siempre pueden extrapolarse a otras especies del mismo o de diferente hábitat (Fent et al. 2006, Chung et al. 2007, Catalá et al. 2009). En este sentido, resulta importante evaluar el impacto de la toxicidad en el hábitat ripario, pero en la actualidad los modelos de toxicidad terrestres continúan siendo escasos. Por otro lado, los ecotoxicólogos están de acuerdo en que durante determinadas etapas del ciclo de vida de las diferentes especies,

como por ejemplo durante el desarrollo, los organismos podrían ser especialmente sensibles a los compuestos tóxicos (Scholz et al. 2008, Bergek et al. 2012, Jordaan et al. 2012). Por todas estas razones, una de las principales preocupaciones de la toxicología ambiental actual es el desarrollo de nuevos enfoques que utilicen un rango de taxones más sensible y adecuado para poder alcanzar resultados ecológicamente relevantes, en especial, en los hábitats riparios terrestres, y proporcionar conocimiento sobre los posibles riesgos de los microcontaminantes en las primeras etapas de la vida, todo ello de una manera costo-efectiva. El desarrollo de biomarcadores de toxicidad subletal bioquímicos o de fisiología celular podría ayudar a diseñar herramientas versátiles y costo-efectivas capaces de proporcionar datos sobre los mecanismos de toxicidad (Feito et al. 2012, Feito et al. 2013).

Las plantas vasculares son esenciales en un ecosistema equilibrado y el desarrollo de nuevos modelos de plantas es importante para la evaluación de los impactos potenciales de los contaminantes. Las plantas y las algas muestran diferente sensibilidad a los contaminantes y, por tanto, las algas no deben tomarse como modelos subrogados de toxicidad para las plantas. Wang (1991) apuntó hace dos décadas que la visión arcaica de que las algas y las plantas son miembros de un mismo reino no debe conducirnos al error de aceptar que los datos de toxicidad en algas pueden extrapolarse a las plantas vasculares. Con más de 10.000 especies, los helechos son el segundo grupo más importante de plantas vasculares (Schneider et al. 2004) y componentes esenciales en numerosas comunidades de plantas especialmente en los hábitats riparios terrestres. Recientemente Catalá et al. (2009) han desarrollado un microbioensayo de fitotoxicidad basado en las esporas de helecho utilizando biomarcadores como la actividad mitocondrial. Los factores de estrés ambientales que perturban la actividad mitocondrial afectarán a la capacidad energética de la espora poniendo en peligro potencial el desarrollo del helecho y su supervivencia. Este nuevo microbioensayo se ha utilizado en trabajos preliminares y los resultados indican que combina relevancia biológica y ecológica junto con una elevada sensibilidad y simplicidad, lo que la convierte en una herramienta costo-efectiva de alto rendimiento para la detección y el seguimiento de la toxicidad (Catalá et al. 2009, Rodríguez-Gil et al. 2010, Feito et al. 2012, Feito et al. 2013).

Por otro lado, el uso de embriones de pez para analizar posibles efectos ecotoxicológicos de los contaminantes en el medio ambiente acuático se ha convertido

en una nueva herramienta utilizada en varios estudios (Caminada et al. 2006, Scholz et al. 2008, Coelho et al. 2011, Bergek et al. 2012, García-Camero et al. 2012). En la actualidad hay disponibles bioensayos que utilizan diferentes especies de peces (por ejemplo, *Oryzias latipes*, *Pimephales promelas* o *Zoarcetes viviparus*) y que incrementan la sensibilidad, aplicabilidad y predictibilidad de los tests toxicológicos tradicionales basados en variables morfológicas macroscópicas. Una de las especies de vertebrados más popular en desarrollos genéticos y en ecotoxicología es el pez cebra (*Danio rerio*) (Scholz et al. 2008). El bioensayo con embriones de pez cebra utilizado en la actualidad requiere de largo tiempo (varios días) y debe llevarse a cabo por personal especializado, lo cual incrementa los costes. El desarrollo de biomarcadores de daño fácilmente medibles por métodos automáticos, como la peroxidación lipídica, podría mejorar el potencial de este modelo. La peroxidación lipídica es un biomarcador temprano de daño oxidativo en la membrana. El mal funcionamiento de las membranas dañadas del embrión alterará la comunicación de la célula durante el crecimiento del tejido.

### ***Riesgos para la salud***

A día de hoy todavía son muchas las incógnitas en relación con los posibles efectos que la presencia de “**contaminantes emergentes**” en las aguas de consumo humano podrían tener sobre la salud de la población. Cabe resaltar que una de las características más importantes de este tipo de contaminantes es que no necesitan ser persistentes para causar efectos negativos, ya que sus altas tasas de transformación puede compensarse por su continua introducción en el medio ambiente. Para la mayoría de este tipo de compuestos su incidencia, contribución al riesgo y datos ecotoxicológicos no están disponibles, así que es difícil predecir posibles riesgos para la salud humana.

Varios son los estudios que hasta el momento se han realizado en las aguas superficiales, subterráneas y potables para la detección de nuevos microcontaminantes ampliamente utilizados en nuestra vida diaria y sobre los que aún se tiene un escaso conocimiento, en relación con sus posibles efectos a largo plazo en el medio ambiente y en la salud humana. Aunque estos microcontaminantes se encuentran en las aguas a concentraciones muy bajas ello no significa que el riesgo sea cero, ya que dichos compuestos no deberían estar presentes en el medio ambiente acuático, y en todo caso, su forma de causar toxicidad es a dosis muy bajas. Por tanto, su existencia altera la

calidad del agua limitando los posibles usos y servicios (consumo humano, agrícola, recreativo, etc) a los que la misma puede destinarse como recurso natural. Asimismo, nos alerta sobre posibles riesgos a largo plazo, actualmente desconocidos y difíciles de determinar dadas las dosis de microcontaminantes encontradas y la presencia de multitud de compuestos contaminantes. De hecho, investigaciones recientes sugieren que aun cuando las consecuencias para los adultos pueden ser inapreciables, en bebés, niños, jóvenes y ancianos, así como en determinados momentos de nuestra vida (embarazos o enfermedades) los efectos podrían ser mayores bien porque su sistema inmune todavía no está maduro, o bien porque sus defensas están mermadas y es más complicado eliminar este tipo de compuestos de su organismo.

## **Fármacos**

Según un informe de la OMS sobre “*Productos farmacéuticos en el agua potable*” (OMS 2013), actualmente existen pocos programas de seguimiento sistemático y estudios completos sobre la exposición humana a productos farmacéuticos presentes en el agua potable. Sin embargo, en la literatura científica se han publicado diversos métodos para la detección y priorización de productos farmacéuticos, que permiten evaluar los riesgos para la salud humana derivados de la exposición a estos productos a través del agua potable. Estos métodos se rigen por el principio de la “*dosis terapéutica mínima*” (o “*dosis mínima efectiva clínicamente*”) o la “*ingesta diaria admisible*”, junto con factores de seguridad o de incertidumbre relativos a los diferentes grupos de productos farmacéuticos. El objetivo es determinar un margen de seguridad o de exposición entre el peor caso de exposición observado o previsto, y la dosis terapéutica mínima o la ingesta diaria admisible. Las investigaciones actuales sugieren que es muy poco probable que la exposición a niveles muy bajos de fármacos a través del agua potable pueda suponer riesgos adversos apreciables para la salud humana, ya que los niveles detectados en las aguas ( $\mu\text{g/l}$  o  $\text{ng/l}$ ) son varios órdenes de magnitud inferiores a la “*dosis terapéutica mínima*”. Por este motivo, la OMS en su informe (OMS 2013) no justifica hasta el momento la introducción de nuevos sistemas de tratamiento de agua potable, los cuáles serían muy especializados y costosos, siendo además el beneficio para la salud humana muy limitado. Las medidas a adoptar en este caso pasarían por minimizar la presencia de estos productos farmacéuticos en el agua potable mediante una combinación de medidas preventivas tales como la información a la población sobre

el uso y la eliminación racional de estos productos, la capacitación de aquellos que prescriben los medicamentos, y la ejecución sistemática de programas de recuperación de medicamentos. A pesar de ello, de acuerdo con el principio de control de contaminantes en la fuente, sería apropiado tratar de mejorar los sistemas de tratamiento de aguas residuales con el fin de suprimir la principal vía de entrada en el medio acuático de este tipo de contaminantes. Si bien en la actualidad las evaluaciones de riesgos indican ausencia de riesgos considerables para la salud humana, dadas las bajas concentraciones detectadas, todavía son inexistentes evaluaciones de riesgos asociados a exposiciones prolongadas a bajas concentraciones de productos farmacéuticos, y los posibles efectos combinados derivados de las mezclas de fármacos.

### **Disruptores endocrinos**

En la actualidad los ensayos estandarizados medioambientales no son capaces de valorar el daño de los perturbadores hormonales o disruptores endocrinos ya que aún se desconocen gran parte de sus propiedades (bioacumulación en especies medioambientales, efectos a dosis bajas y a largo plazo, efectos de las mezclas, destino y comportamiento medioambiental). Según el informe de la OMS, titulado “*State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals 2012*” (Bergman et al. 2012), una vez liberados al medio ambiente, las sustancias más persistentes pueden ser transportados por las corrientes de agua a lugares remotos, y muchos de ellos pueden biomagnificarse a través de las redes tróficas a niveles altos en los seres humanos y en otros grandes depredadores. Otros alteradores hormonales tienen una vida más corta en el medio ambiente, pero sin embargo, se liberan regularmente a través de las depuradoras, la escorrentía agrícola y ganadera, por lo que se pueden registrar altos niveles ambientales de estos compuestos en las aguas potables.

Las sustancias con capacidad de alterar la acción de las hormonas pueden actuar durante todas las etapas de desarrollo de los seres vivos: desarrollo fetal, lactancia, primera infancia, pubertad, edad adulta y edad avanzada. Mientras que, en la etapa adulta su acción tiene lugar en el periodo de tiempo en el que se produce la exposición, disminuyendo los efectos cuando termina dicha exposición, durante las etapas de desarrollo estos compuestos pueden tener efectos permanentes cuando la exposición tiene lugar durante el periodo en el que se está desarrollando un tejido específico (Bergman et al. 2012).

En cuanto a los posibles riesgos para la salud humana, cabe destacar que los estudios realizados sólo pueden demostrar asociaciones, pero en ningún caso relaciones causa-efecto. Por ello, es importante la utilización tanto de datos en humanos como en animales para poder mostrar la evidencia entre la exposición a disruptores endocrinos y la enfermedad humana. Según el último informe de la OMS (Bergman et al. 2012), los datos de modelos animales y la evidencia humana sustentan la idea de que la exposición a disruptores endocrinos durante el desarrollo fetal y la pubertad juega un papel importante en el incremento de la incidencia de enfermedades reproductivas (endometriosis, infertilidad y pubertad precoz), cánceres (de mama o de próstata), enfermedades del sistema nervioso (alzheimer, parkinson, problemas de comportamiento y aprendizaje), infecciones, asma, hipertensión, obesidad y diabetes en humanos.

Recientemente, la exposición de adultos a disruptores endocrinos se ha relacionado con la obesidad, las enfermedades cardiovasculares y la diabetes (Lyche et al. 2011), coincidiendo con el aumento de la incidencia de estas enfermedades en los últimos años. Por ejemplo, la presencia de bisfenol A puede producir un exceso de señalización y secreción de insulina, sobreestimando las células beta, y provocando un incremento de resistencia a la insulina y agotamiento de las células beta característicos de la diabetes tipo 2, según el informe “*The impacts of endocrine disruptors on wildlife, people and their environments 1996-2011*” de la Agencia Europea del Medio Ambiente (AEMA) (AEMA 2013). Asimismo, algunas de estas sustancias pueden interactuar con el sistema tiroideo. La función tiroidea es muy importante para el desarrollo normal del cerebro, fundamentalmente durante el embarazo y después del nacimiento. La exposición a disruptores endocrinos durante estas etapas se ha relacionado con el incremento en la tasa de desórdenes neuroconductuales, entre los que se incluyen la dislexia, retraso mental, trastorno por déficit de atención con hiperactividad y autismo (Bergman et al. 2012).



## **OBJETIVOS**

### ***Hipótesis***

Si las plantas depuradoras no son capaces de eliminar totalmente ciertos “*contaminantes emergentes*” presentes a nivel de trazas ( $\mu\text{g/l}$  o  $\text{ng/l}$ ), como los fármacos o los disruptores endocrinos, podríamos encontrarlos en las aguas naturales y esto podría suponer una serie de riesgos ecotoxicológicos y de salud pública actualmente desconocidos.

### ***Objetivo general***

El objetivo de nuestro estudio es incrementar la información disponible sobre las sustancias contaminantes presentes en nuestras aguas con el fin de que las administraciones competentes en materia de aguas, la industria química y farmacéutica, el sector médico y la población general, dispongan de mayor conocimiento sobre la situación y calidad de las mismas y así poder llevar a cabo las actuaciones que resulten necesarias para prevenir posibles riesgos derivados de la presencia de estos contaminantes en las aguas.

### ***Objetivo específico 1***

Monitorizar la presencia de psicofármacos en las aguas residuales, naturales y de grifo de la Comunidad Autónoma de Galicia.

### ***Objetivo específico 2***

Evaluar la presencia de sustancias clasificadas como disruptores endocrinos, o sospechosas de serlo, en las aguas fluviales del centro de España (ríos Jarama y Manzanares, Comunidad Autónoma de Madrid) y estimar la actividad estrogénica total de las muestras medioambientales y la contribución estrogénica de cada uno de los compuestos analizados.

### ***Objetivo específico 3***

Evaluación de la toxicidad de microcontaminantes en aguas fluviales comparando ensayos validados y de nuevo desarrollo.

#### ***Objetivo específico 4***

Determinar la presencia de sustancias clasificadas como disruptores endocrinos, o sospechosas de serlo, en el agua de grifo de las principales zonas de abastecimiento de la Comunidad de Madrid, así como determinar su actividad estrogénica total y estimar el riesgo para la salud de la población, de aquellos compuestos encontrados en concentraciones detectables.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### ***Estudio 1: Residuos farmacéuticos psicoactivos en las cuencas de Galicia***

#### **1. Ámbito geográfico**

La Comunidad Autónoma de Galicia tiene un área total de 29.574,38 km<sup>2</sup> y una población estimada de 2.781.498 habitantes [5,88% de la población española; Base de Datos del Instituto Nacional de Estadística, 2012]. El 28% de la población total de Galicia tiene más de 60 años (808.217 habitantes) y es un 6% más anciana que el total de la población española. Por otro lado, el 51,6% son mujeres y el 48,3% hombres. Esta proporción se incrementa en el grupo de edad de más de 60 años (56,5% mujeres y 43,5% hombres).

#### **2. Muestreo**

Se seleccionaron 5 EDARs en cada una de las principales ciudades de la Comunidad Autónoma de Galicia: A Coruña, Ourense, Pontevedra, Santiago de Compostela y Vigo. Por motivos de confidencialidad, el orden en el que aparecen citadas cada una de las ciudades gallegas no se corresponde con la numeración asignada a las EDARs (Tabla 7).

Las EDAR1 y EDAR5 descargan directamente a las aguas superficiales de las cuencas de Galicia-Costa y Miño-Sil, respectivamente, y las restantes (EDAR2, EDAR3, EDAR4) descargan directamente al mar. Las estaciones de muestreo han sido cuidadosamente seleccionadas con el fin de producir resultados consistentes y representativos para la interpretación final de los datos. El muestreo se efectuó a la entrada y a la salida de las cinco EDARs y también 50 metros aguas abajo de los puntos de emisión de las EDAR1 (DSSTP1) y EDAR5 (DSSTP5). En total se recogieron 36 muestras durante tres campañas de muestreo: Agosto 2008, Enero 2009 y Junio 2009. Se tomó una muestra de agua en cada punto de muestreo por cada campaña.

Asimismo, se recogieron un total de 75 muestras de agua de grifo procedentes de lugares públicos y residencias privadas de cada una de las ciudades seleccionadas en las

mismas campañas de muestreo que las del agua residual y superficial. En cada ciudad se tomaron 5 muestras en cada una de las campañas de muestreo.

**Tabla 7. Características de las estaciones de depuración de aguas residuales seleccionadas en las cuencas de Galicia durante 2008-2009**

Código EDAR	CUENCA	POBLACIÓN EQUIVALENTE	AGUA RECEPTORA	TRATAMIENTO	
				Agua	Fango
EDAR1	Galicia-Costa	9.407	Río Sar	BAS + TT (NP + C)	s
EDAR2	Galicia-Costa	358.257	Costa de A Coruña	BAS + TT (UV)	d + s
EDAR3	Galicia-Costa	111.240	Ría de Pontevedra	PQ + BAS + TT (UV)	bf
EDAR4	Galicia-Costa	8.234	Ría de Vigo	BAS + TT (UV)	s
EDAR5	Miño-Sil	295.790	Río Miño	BAS + TT (NP)	d + dt

BAS: fangos activados; bf: filtro de secado; d: digestión anaerobia; PQ: tratamiento físico-químico; s: centrifugado; td: secado térmico; TT: tratamiento terciario UV: desinfección UV; NP: eliminación de nitrógeno y fósforo; N: eliminación de nitrógeno; C: cloración.

### 3. Compuestos analizados

Se escogieron 13 fármacos y un metabolito (Tabla 8) debido a su toxicidad potencial y a su persistencia en el medio ambiente. Los fármacos analizados se utilizan como medicamentos para el sistema nervioso central y pertenecen a tres de los grupos terapéuticos más frecuentemente prescritos: antidepresivos, ansiolíticos y antiepilépticos.

**Tabla 8. Fármacos psicoactivos y metabolitos seleccionados**

GRUPOS TERAPÉUTICOS	Nº CAS	FÁRMACOS	LC (ng/l)
<b>ANTIDEPRESIVOS</b>			
	549-18-8	Amitriptilina	10
	59729-33-8	Citalopram	10
	303-49-1	Clomipramina	10
	54910-89-3	Fluoxetina	10
	72-69-5	Nortriptilina	10
	79617-96-2	Sertralina	10
	99300-78-4	Venlafaxina	10
<b>ANSIOLÍTICOS</b>			
	28981-97-7	Alprazolam	10
		$\alpha$ - Alprazolam <sup>a)</sup>	10
	846-49-1	Lozarepam	10
	65891-80-7	Nordiazepam	10
	604-75-1	Oxazepam	10
	10379-14-3	Tetrazepam	10
<b>ANTIEPILÉPTICOS</b>			
	298-46-4	Carbamazepina	10

LC: límite de cuantificación; a) metabolito del alprazolam.

#### **4. Método analítico**

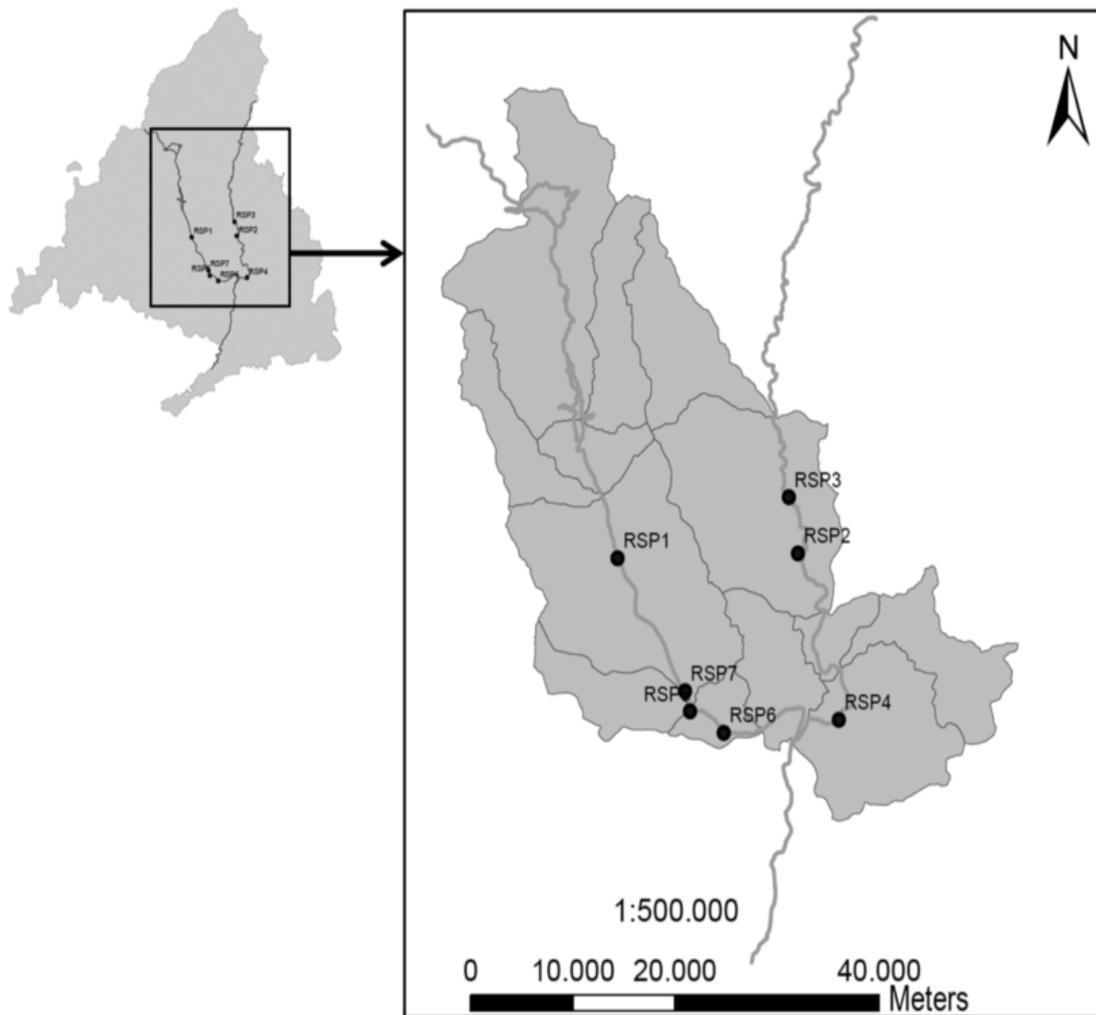
Las soluciones madre de los estándares (10 µg/ml, excepto ibuprofeno con 100 µg/ml) se disolvieron en metanol para preparar soluciones individuales de trabajo con una concentración de 0,5 µg/ml, 0,1 µg/ml y 0,02 µg/ml. Para la extracción de las muestras y el análisis instrumental se eligió el método descrito en la literatura y utilizado por Gros et al. (2007). En primer lugar, las muestras fueron filtradas con un filtro de fibra de vidrio. A continuación, 20 ml de acetonitrilo se hicieron pasar a través del filtro (por la gravedad) y se recogieron para la extracción de la muestra. La extracción de las muestras se realizó mediante extracción automática en fase sólida para concentrar los compuestos a analizar y eliminar impurezas. En la primera extracción se utilizó OASIS MCX (3 cm<sup>3</sup> 60 mg). La solución de elución MCX y el segundo lavado se evaporaron a 45° C bajo una corriente de nitrógeno en un baño de agua. Para la segunda extracción se utilizó OASIS MAX (3 cm<sup>3</sup> 60 mg). La solución de elución MAX se evaporó a 45° C bajo una corriente de nitrógeno. Finalmente, los extractos MCX y MAX fueron reconstituidos con 100 µl de fase móvil. Las muestras de agua se sometieron a cromatografía líquida de alta resolución con detector de masas (HPLC-MS-MS). Esta etapa se llevó a cabo en dos fases con dos métodos diferentes con el objetivo de caracterizar los compuestos con diferentes condiciones de flujo, temperatura y fase móvil. Para la separación cromatográfica de los productos farmacéuticos se utilizó una columna Atlantis C18 (2,1 x 50 mm, 3 µm), empleando acetonitrilo en ácido fórmico al 0,1% como fase móvil, a un caudal de 0,3 ml/min.

## ***Estudio 2: Análisis y presencia de disruptores endocrinos y actividad estrogénica en las aguas superficiales del centro de España***

### **1. Puntos de muestreo**

La Comunidad Autónoma de Madrid es la comunidad con mayor densidad de población de España y una de las más densamente pobladas de Europa. Concretamente presenta una densidad de población de 808,41 habitantes por km<sup>2</sup>. Esta comunidad, con un área de 8.028 km<sup>2</sup> (1,6% del conjunto de España), está ocupada por una población estimada de 6.498.560 habitantes. Alrededor del 81,64% de la población se concentra en la ciudad de Madrid (50,31%) y en los municipios de su área metropolitana [31,34%; Base de Datos del Instituto Nacional de Estadística, 2012]. La principal actividad industrial de la región se concentra en el sur y este de la comunidad.

Para este muestreo se seleccionaron, en función de la población servida, 7 EDARs de la Comunidad Autónoma de Madrid. La localización de las EDARs se muestra en la Figura 3 y las características de cada punto de muestreo se recogen en la Tabla 9. Las muestras de agua superficial se tomaron, aproximadamente a 100 metros aguas abajo de la salida de cada una de las EDARs, las cuales descargan directamente en dos de los ríos más importantes que atraviesan la región de Madrid: río Jarama y río Manzanares.



**Figura 3. Localización de los puntos de muestreo de agua superficial (ríos Jarama y Manzanares, Madrid)**

El río Jarama es el segundo río más largo que atraviesa la Comunidad de Madrid, cruzando la parte oriental de la región. En este río se seleccionaron los siguientes puntos de muestreo: RSP-1, RSP-5, RSP-6 y RSP-7. El río Manzanares atraviesa la ciudad de Madrid (3.233.527 habitantes) y desemboca en el río Jarama. Los puntos de muestreo seleccionados en este río son: RSP-2, RSP-3 y RSP-4. Los puntos de muestreo RSP-2, RSP-3, RSP-4 y RSP-6 se sitúan en algunas de las áreas más industrializadas de la Comunidad de Madrid (Tabla 9).

**Tabla 9. Características de los puntos de muestreo de agua superficial (ríos Jarama y Manzanares, Madrid)**

PUNTO DE MUESTREO	EDAR	POBLACIÓN EQUIVALENTE	LOCALIZACIÓN	RÍO	TRATAMIENTO	
					Agua	Fango
RSP-1	Vivero	550.000	M-30 Carretera Castilla	Manzanares	BAS + BB	NIA
RSP-2	Rejas	500.000	Torrejón Ardoz, A2	Jarama	BAS	NIA
RSP-3	Valdebebas	200.000	Paracuellos del Jarama	Jarama	BAS	NIA
RSP-4	La Poveda (Sur Oriental)	200.000	Arganda del Rey	Jarama	PQ + BAS	a + bf
RSP-5	Butarque	1.100.000	Avda Rosales, M-301	Manzanares	BAS	NIA
RSP-6	Depuradora Sur	2.000.000	Getafe	Manzanares	BAS	d + bf
RSP-7	La Gavia	1.000.000	Avda Rosales, M-301	Manzanares	BAS	NIA

NIA: no hay información disponible; PQ: tratamiento físico-químico; BAS: fangos activados; TF: tratamiento terciario de filtración; BL: lecho bacteriano; a: estabilización aeróbica; d: digestión anaerobia; bf: filtro de secado; s: centrifugado.

Fuente: Plan Regional de Tratamiento de Fangos (2006-2016). Comunidad de Madrid: <http://www.madrid.org/cs>

En total se recogieron 14 muestras de agua superficial de cada uno de los siete puntos de muestreo durante dos campañas: domingo y jueves (Febrero 2012). Los días para estas campañas de muestreo se escogieron con el fin de poder comparar un día laborable y otro no laborable y poder determinar si la actividad industrial podría estar relacionada con la presencia de determinados compuestos (como los disruptores endocrinos) en las aguas superficiales estudiadas.

## 2. Compuestos analizados

Se analizaron 30 sustancias con posible actividad endocrina, y el marcador químico cafeína, en las muestras de agua superficial (Tabla 10). Estos compuestos pertenecen a los siguientes grupos:

- a) **10 estrógenos naturales y sintéticos y sus conjugados.** En este grupo se incluyen el estradiol (E2), la estrona (E1), el estriol (E3), el etinilestradiol (EE2), dietilestilbestrol (DES), estrona 3-sulfato (E1-3S), estriol 3-sulfato (E3-3S), estradiol 17-glucurónido (E2-17G), estrona 3- glucurónido (E1-3G) y el estriol 16-glucurónido (E3-16G).
- b) **2 antimicrobianos/desinfectantes:** triclosán (TCS) y triclocarban (TCC), los cuales se encuentran en productos utilizados en la vida diaria, como los productos de cuidado personal.
- c) **4 conservantes,** pertenecientes a las familias de los antibacterianos y antifúngicos, como son el metilparabeno (MeP), etilparabeno (EtP), propilparabeno (PrP) y el benzilparabeno (BeP).

- d) **Plastificante Bisfenol A (BPA)**, ampliamente utilizado para la fabricación de polímeros policarbonados y resinas epoxi, junto con otros materiales utilizados en la fabricación de plásticos.
- e) **8 compuestos alquilfenoles y sus metabolitos**: octilfenol (OP), nonilfenol (NP), octilfenol y nonilfenol monocarboxilado (OP<sub>1</sub>EC y NP<sub>1</sub>EC), octilfenol y nonilfenol monoetoxilado (OP<sub>1</sub>EO y NP<sub>1</sub>EO), y octilfenol y nonilfenol dietoxilado (OP<sub>2</sub>EO y NP<sub>2</sub>EO).
- f) **2 anticorrosivos**: Benzotriazol (BT) y tolitriazol (TT).
- g) **3 retardantes de llama organofosforados**: tris (butoxietil) fosfato (TBEP), tris (cloroisopropil) fosfato (TCCP) y tris (2-cloroetil) fosfato (TCEP).

Las soluciones patrón de alta pureza (> 97%) de los compuestos de interés y sus homólogos deuterados (utilizados como patrones sustitutos) se obtuvieron a través de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), Aldrich (Milwaukee, WI, USA), Dr. Ehrenstorfer (Alemania) Fluka (Buchs, Suiza) y CDN Isotopes (Pointe-Claire, Quebec, Canadá).

**Tabla 10. Sustancias analizadas con posible actividad endocrina**

FAMILIA	COMPUESTOS	Nº CAS	PATRÓN INTERNO	Recuperaciones relativas (% RSD <sup>a</sup> , n=6)	LD <sup>b</sup>	LC <sup>c</sup>
<b>Estrógenos naturales y sintéticos y sus conjugados</b>	Estradiol (E2)	50-28-2	E2-d <sub>5</sub>	94	0.037	0.12
	Estrona (E1)	53-16-7	E1-d <sub>4</sub>	98	0.05	0.17
	Estriol (E3)	50-27-1	E2-d <sub>5</sub>	65	0.17	0.56
	Etinilestradiol (EE2)	57-63-6	EE2- d <sub>4</sub>	104	0.14	0.47
	Dietilestilbestrol (DES)	56-53-1	EE2- d <sub>4</sub>	54	0.043	0.14
	Estrona 3-sulfato (E1-3S)	438-67-5	E1-3S-d <sub>4</sub>	103	0.0038	0.013
	Estriol 3-sulfato (E3-3S)	5150-64-1	E1-3S-d <sub>4</sub>	96	0.03	0.1
	Estradiol 17-glucurónido (E2-17G)	14982-12-8	E1-3S-d <sub>4</sub>	128	0.46	1.5
	Estrona 3- glucurónido (E1-3G)	15087-01-1	E1-3S-d <sub>4</sub>	111	0.056	0.18
Estriol 16- glucurónido (E3-16G)	1852-50-2	E1-3S-d <sub>4</sub>	100	0.059	0.19	
<b>Antimicrobianos/Desinfectantes</b>	Triclosan (TCS)	3380-34-5	Etilhidroxibenzoato C <sub>13</sub>	62	0.17	0.58
	Triclocarban (TCC)	101-20-2	Etilhidroxibenzoato C <sub>13</sub>	74	0.036	0.12
<b>Conservantes</b>	Metilparabeno (MeP)	99-76 -3	Etilhidroxibenzoato C <sub>13</sub>	72	0.2	0.68
	Etilparabeno (EtP)	120-47-8	Etilhidroxibenzoato C <sub>13</sub>	116	0.27	0.89
	Propilparabeno (PrP)	94-13-3	Etilhidroxibenzoato C <sub>13</sub>	100	0.021	0.069
	Benzilparabeno (BeP)	94-18-8	Etilhidroxibenzoato C <sub>13</sub>	95	0.031	0.1
<b>Plastificante</b>	Bisfenol A (BPA)	80-05-7	BPA-d <sub>16</sub>	95	0.11	0.39
<b>Alquilfenoles</b>	Octilfenol (OP)	140-66-9	OP-d <sub>2</sub>	93	0.14	0.46
	Nonilfenol (NP)	25154-52-3	NP-d <sub>8</sub>	70	0.013	0.043
	Octilfenol monocarboxilado (OP <sub>1</sub> EC)	15234-85-2	NP <sub>1</sub> EC-d <sub>2</sub>	101	0.065	0.22
	Nonilfenol monocarboxilado (NP <sub>1</sub> EC)	3115-49	NP <sub>1</sub> EC-d <sub>2</sub>	103	0.034	0.12
	Octilfenol monoetoxilado (OP <sub>1</sub> EO)	51437-89-9	NP <sub>1</sub> EO-d <sub>2</sub>	82	17	56
	Nonilfenol monoetoxilado (NP <sub>1</sub> EO)	104-35-8	NP <sub>1</sub> EO-d <sub>2</sub>	75	62	208
	Octilfenol dietoxilado (OP <sub>2</sub> EO)	51437-90-2	NP <sub>1</sub> EO-d <sub>2</sub>	106	0.011	0.035
	Nonilfenol dietoxilado (NP <sub>2</sub> EO)	20427-84-3	NP <sub>1</sub> EO-d <sub>2</sub>	107	0.013	0.044
<b>Anticorrosivos</b>	1H-Benzotriazol (BT)	95-14-7	BT-d <sub>4</sub>	86	0.072	0.24
	Toliltriazol (TT)	29385-43-1	BT-d <sub>4</sub>	78	0.013	0.044
<b>Retardantes de llama organofosforados</b>	Tris(butoxietil) fosfato (TBEP)	78-51-3	ThPPd <sub>15</sub>	87	0.0024	0.0079
	Tris(cloroisopropil) fosfato (TCPP)	13674-87-8	ThPPd <sub>15</sub>	95	0.0025	0.0084
	Tris(2-cloroetil) fosfato (TCEP)	115-96-8	ThPPd <sub>15</sub>	90	0.034	0.11
<b>Marcador químico</b>	Cafeína (Caff)	58-08-2	Cafeína C <sub>13</sub>	115	0.021	0.071

<sup>a</sup> RSD: Desviación estándar relativa; <sup>b</sup> Limite de detección; <sup>c</sup> Limite de cuantificación.

### 3. Método analítico

Las muestras de agua superficial se recogieron en botellas (0,5 l) ámbar de tereftalato de polietileno (PET) y se transportaron al laboratorio bajo condiciones refrigeradas (4° C). Tras la recepción de las muestras, éstas se filtraron a través de filtros de membrana de nylon de 0,45 µm (Whatman International Ltd., Maidstone, England) y se almacenaron en oscuridad a -20° C en botellas PET de color ámbar hasta su análisis.

La metodología utilizada para el análisis de los disruptores endocrinos en las aguas de río es la cromatografía líquida/pre-concentración en línea con la tecnología Equan acoplada a espectrómetro de masas con triple cuadrupolo Vantatge TSQ (Thermo Fisher Scientific) (LC-LC-MS/MS). El análisis cromatográfico se realizó utilizando dos bombas de HPLC (Finnigan Surveyor L-Pump). Esta nueva metodología se describe en detalle en el artículo analítico de Gorga et al. (2013). Antes del análisis de los compuestos diana, las muestras se enriquecieron con una solución que contenía los patrones internos análogos a los compuestos estudiados (Tabla 10) a una concentración de 250 ng/l. Durante la etapa de carga se preconcentró una alícuota de 5 ml de las muestras de agua de manera que los compuestos de interés quedaron retenidos en la columna Equan (Hypersil Gold™ 20 x 2,1 mm, 12 µm). A continuación, los analitos se eluyeron en la columna Equan y se separaron en una columna de análisis (5 µm, 125 x 2 mm i.d., C18, columna de fase reversa, Purospher STAR RP-18). Se programó una válvula de desvío en el espectrómetro de masas mediante un sistema de datos para controlar la carga y la elución de las dos columnas LC. Con el fin de evitar una posible contaminación de las muestras, éstas se manipularon de forma apropiada y las muestras en blanco fueron analizadas por triplicado.

El análisis mediante espectrometría de masas se llevó a cabo utilizando un espectrómetro con triple cuadrupolo Vantatge TSQ (Thermo Scientific) equipado con una fuente de ionización electrospray. Las masas se monitorizaron en dos transiciones diferentes para cada compuesto por SRM (Selected Reaction transition). La cuantificación se realizó utilizando el método de patrón interno basado en las áreas de los picos obtenidos para cada analito y su correspondiente patrón interno análogo. Las curvas de calibración obtenidas para los analitos fueron lineales entre 2,5 (o el límite de cuantificación, si es superior) y 4500 ng/l, con coeficientes de correlación ( $r^2$ ) mayores de

0,99 en todos los casos. Un total de 11 calibraciones patrón externas de agua se aplicaron usando un rango apropiado en función de la concentración de la muestra. Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se estimaron experimentalmente, mediante el análisis Eqan-LC-MS/MS de las muestras, ya que la concentración de analito que proporciona una señal con un ratio de ruido de 3 y 10, respectivamente. La media de LD y LC para cada analito en las muestras estudiadas se muestra en la Tabla 10. Las recuperaciones relativas se calcularon comparando las áreas de los picos obtenidos por LC-MS/MS y LC-LC-MS/MS, respectivamente. Se efectuó un control de calidad cada tres muestras reales con el fin de comprobar las posibilidades del sistema de accionamiento. Los criterios de identificación y confirmación de los compuestos disruptores endocrinos seleccionados se basaron en dos restricciones: el tiempo de retención para dos transiciones controladas de cada compuesto de interés debe ser maximizado simultáneamente  $\pm 2\%$ ; las abundancia relativas de las dos transiciones SRM seleccionadas para cada analito en las muestras deben situarse entre  $\pm 20-50\%$  del ratio producido por el patrón comercial.

#### **4. Estrogenicidad**

La actividad estrogénica total de las muestras ambientales tomadas en los ríos Jarama y Manzanares se estimó comparándola con la actividad del estrógeno natural 17- $\beta$ -estradiol (E2) y se expresó como equivalentes de estradiol. Cabe resaltar que la estrogenicidad sólo se calculó en aquellos grupos de compuestos para los que el estudio de Céspedes et al. (2004) proporciona valores de estrogenicidad experimentales.

En la Tabla 11, tomada del estudio de Céspedes et al. (2004), se resumen las concentraciones medias efectivas ( $EC_{50}$ ) y los factores de estrogenicidad relativa (E2 equiv.) para cada compuesto. Los factores de estrogenicidad relativa se definen como la  $EC_{50}$  de cada compuesto dividido por la  $EC_{50}$  del 17- $\beta$ -estradiol. La  $EC_{50}$  se define como la concentración del contaminante que produce el 50% del máximo efecto estrogénico. Los equivalentes de estradiol (EEQs) se calcularon utilizando el factor de estrogenicidad relativa (E2 equiv.) y la concentración de cada compuesto detectado ( $C_i$ ) mediante la siguiente ecuación:

$$EEQ \text{ (ng/l)} = C_i \times E2 \text{ equiv.}$$

**Tabla 11. Concentración efectiva (EC<sub>50</sub>), factores de estrogenicidad relativos (E2 equiv.) y límites de detección (µg/l) obtenidos para cada compuesto por Céspedes et al. (2004) mediante ensayo de levadura recombinante**

COMPUESTOS	EC <sub>50</sub> (µg/l)	E2 equiv. <sup>a</sup>	LD (µg/l) <sup>b</sup>
E2	4x10 <sup>-2</sup> ± 4x10 <sup>-2</sup>	1,0000	0,0100
E1	2,12 ± 1,16	0,01886	0,5339
E3	0,116 ± 6,4x 10 <sup>-2</sup>	0,3448	0,274
EE2	0,234 ± 0,128	0,1709	0,0538
DES	0,87 ± 0,438	0,04597	0,2207
OP	188 ± 84	2,13x 10 <sup>-4</sup>	63,920
NP	79,20 ± 19,8	5,05x 10 <sup>-4</sup>	19,800
NP <sub>1</sub> EO	2983,2 ± 396	1,336x 10 <sup>-5</sup>	748,63
NP <sub>2</sub> EO	< LD <sup>c</sup>	< LD	< LD
NP <sub>1</sub> EC	< LD	< LD	< LD
BPA	1644 ± 388	2,43x 10 <sup>-5</sup>	490,32
BT	5490 ± 1322	7,286x10 <sup>-6</sup>	2765,3

<sup>a</sup> Expresado como el ratio entre los valores de EC<sub>50</sub> para el 17-β-estradiol y los compuestos analizados.

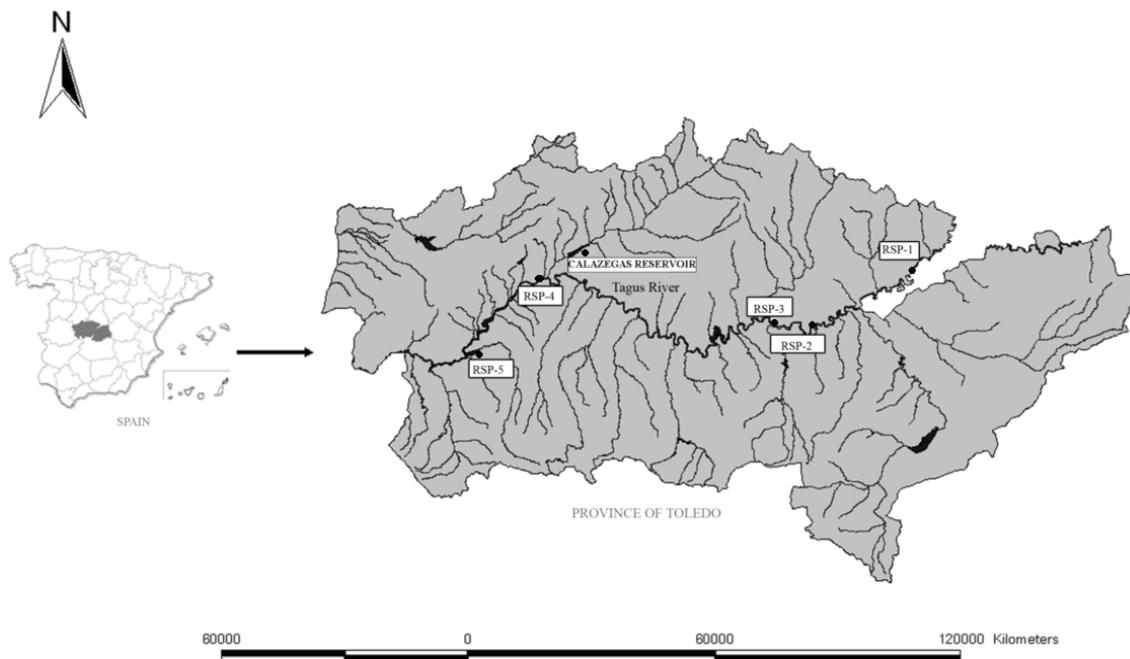
<sup>b</sup> Límite de detección en el ensayo.

<sup>c</sup> < Límite de detección.

## ***Estudio 3: Sensibilidad de nuevos bioensayos basados en biomarcadores a la microcontaminación del agua fluvial***

### **1. Agua fluvial**

Se seleccionaron 5 puntos de muestreo a lo largo del río Tajo, a su paso por la provincia de Toledo (uno de los ríos más importantes de España y Portugal): RSP-1, RSP-2, RSP-3, RSP-4 y RSP-5 (Tabla 12). Los puntos RSP-1 y RSP-5 se localizan a la entrada (Añoover del Tajo) y salida (Azután), respectivamente, del río Tajo en la provincia de Toledo. Mientras que los puntos RSP-2, RSP-3 y RSP-4 se sitúan aproximadamente 100 metros aguas abajo de los efluentes de las EDARs “Santa María de la Bequerencia”, “Toledo” y “Talavera de la Reina”, respectivamente (Figura 4).



**Figura 4. Localización de los puntos de muestreo de agua superficial, río Tajo, Toledo (tomado de Valcárcel et al. 2013)**

**Tabla 12. Características de los puntos de muestreo de agua superficial (río Tajo, Toledo)**

Código muestra	Tipo muestra	Agua receptora	EDAR	Efluente EDAR (m <sup>3</sup> /año)	Componente industrial	Población equivalente	Población servida
RSP-1	Fluvial	Tajo	-	-	-	-	-
RSP-2	Fluvial	Tajo	Toledo	8.760.000	0%	120.000	75.000
RSP-3	Fluvial	Tajo	Santamaría de Bequerencia	7.300.000	20-30%	120.000	19.000
RSP-4	Fluvial	Tajo	Talavera de la Reina	18.000.000	20%	126.000	89.000
RSP-5	Embalse (riego)	Embalse Azután	-	-	-	-	-
Embalse Cazalegas	Embalse (agua potable)	Embalse Cazalegas	-	-	-	-	-

Se tomaron 10 muestras de agua (100 ml) de la superficie del río, recogidas en tubos de plástico pre-enjuagados con agua del punto de muestreo, en dos estaciones: Septiembre (final de verano) y Febrero (mitad de invierno). Asimismo, se tomó una muestra de agua en invierno procedente del embalse de Cazalegas debido a su valor como fuente superficial de agua potable. En este caso, no fue posible tomar muestras en este embalse durante el verano. Las muestras se refrigeraron y se llevaron al laboratorio en 24 horas, siendo almacenadas a -22° C en oscuridad hasta su análisis. Antes de su uso, las muestras se filtraron mediante un filtro de membrana de vidrio de 0,45 µm (Pall, NY, USA). Los puntos de muestreo se localizaron en la proximidad de estaciones de control de la *Red Integrada de Calidad del Agua del Río Tajo (SAICA, Demarcación Hidrográfica del Tajo 2013)*, y los parámetros físico-químicos (turbidez, pH, conductividad, temperatura, amonio, fosfatos y metales pesados) se encuentran dentro de los límites establecidos por la regulación medioambiental. La caracterización físico-química de las muestras de agua fue publicada por Valcárcel et al. (2013) y se muestra en la Tabla 13. El estudio de Valcárcel et al. (2013) informó de la presencia de 58 compuestos activos farmacéuticos en las muestras de agua analizadas. Sin embargo, no hay más información disponible sobre la presencia de microcontaminantes, ni en la *Red Integrada de Calidad del Agua del Río Tajo* ni en otros estudios independientes.

**Tabla 13. Propiedades físico-químicas de las aguas en los puntos de muestreo del río**

		RSP-1	RSP-2	RSP-3	RSP-4	RSP-5	Embalse
VERANO	T (°C)	25,6	23,1	21,9	25,4	26,1	23,0
	pH	8,0	8,2	8,3	8,5	8,6	7,5
	OD (mg/l)	8,4	8,9	8,3	9,2	7,9	7,2
	C (μS/cm)	2503	2361	2428	2519	1416	101
	DBO <sub>5</sub> (mg O <sub>2</sub> /l)	6	4	5	4	4	3
	TSS (mg/l)	34	35	43	22	4	24
INVIERNO	T (°C)	8,9	8,6	8,8	8,3	7,9	6,8
	pH	7,4	7,5	7,5	7,1	7,3	8,5
	OD (mg/l)	7,7	7,3	7,6	9,6	9,4	12,6
	C (μS/cm)	1009	1689	1595	786	909	289
	DBO <sub>5</sub> (mg O <sub>2</sub> /l)	4	5	5	3	5	3
	TSS (mg/l)	38	35	46	52	10	8

T: Temperatura; OD: Oxígeno Disuelto; C: Conductividad; DBO: Demanda Bioquímica de Oxígeno; TSS: Total Sólidos en Suspensión.

## 2. Material biológico

### 2.1. *Polystichum setiferum*

*Polystichum setiferum* es un helecho típico de los ecosistemas riparios de las regiones templadas que cuenta con una amplia distribución. Las esporas de *Polystichum setiferum* utilizadas en este estudio se recogieron en la zona Noroeste de España, en la provincia de A Coruña, en el río San Xusto, cerca de un parque natural. Para ello se extrajeron fragmentos de hojas con esporangios cerrados y maduros que se mantuvieron a 4° C en la nevera. La liberación de las esporas se realizó mediante secado de los fragmentos en papel liso durante una semana en el laboratorio y posteriormente las esporas se almacenaron a 4° C en oscuridad hasta su uso como se describe en el artículo de Catalá et al. (2009).

### 2.2. *Danio rerio*

Los embriones de *Danio rerio* (silvestre) se adquirieron de ZF BioLabs (Tres Cantos, Madrid) tras 4 horas de post fertilización y se transportaron en agua sintética: 11,80 mg/l de CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 4,92 mg/l de MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 2,52 mg/l de NaHCO<sub>3</sub> y 1,10 mg/l de KCl (Kapp et al. 2006), a temperatura de 26 ± 1° C durante 1 hora al laboratorio. Los embriones, en el comienzo del período de gástrula, se expusieron inmediatamente tras su llegada durante 90 minutos (n = 8 para cada concentración).

### 3. Bioensayos

#### 3.1. Toxicidad en el desarrollo de plantas

Se utilizaron dos biomarcadores para evaluar la fitotoxicidad agua: actividad mitocondrial y cuantificación de DNA. Se tomaron alícuotas con  $8 \times 10^4$  esporas, las cuales se incubaron con cada muestra de agua en condiciones controladas ( $20^\circ \text{C}$ , PAR  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  16 h fotoperiodo) durante 24 horas. Se realizaron al menos seis réplicas independientes para cada muestra de agua. Los controles se realizaron con medio de cultivo Dyer suplementado con Tween 20 al 0,001% (DT). Tras la exposición, las suspensiones de esporas se esterilizaron con lejía comercial (1:100, 5 min) y se lavaron dos veces en medio fresco.

##### 3.1.1. Actividad Mitocondrial

La actividad mitocondrial se utilizó como biomarcador de la viabilidad celular en las esporas de *Polystichum setiferum*. El método para medir la actividad mitocondrial se basa en la reducción de sales de tetrazolio y ha sido recientemente descrito por Catalá et al. (2009) y modificado por Feito et al. (2012, 2013). Brevemente, el ensayo de tetrazolio se realizó con cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) 0,6%, pH = 8 y se incubó a  $20^\circ \text{C}$  durante 2 horas en oscuridad. La homogeneización de las esporas se realizó en varios pasos: una mezcla consistente en KOH 0,1N y etanol 96% se añadió sobre el pellet de esporas y se introdujeron en un baño Selecta Ultrasons durante 1 hora (40 kHz, 100 W) a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se incubaron a  $65^\circ \text{C}$  durante 15 minutos en un baño de agua. Finalmente, se añadieron 200  $\mu\text{l}$  aproximadamente de fragmentos de vidrio tamizados (0,2-1mm) a los tubos anteriores y se agitaron 30 minutos (3000 rpm, Labnet, Edison, NJ, USA) para su completa homogeneización.

La sal de formazan coloreada se extrajo en 1000  $\mu\text{l}$  de n-hexano mediante agitación fuerte durante 10 minutos con un agitador V x 100 (Labnet, Edison, NJ, USA). La separación de fases se efectuó después de 7 minutos de centrifugación a  $1100 \times g$  en un Heraeus Fresco Biofuge (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). La absorbancia de la sal roja de formazan disuelta en n-hexano fue se midió a una longitud de onda de 492 nm en un espectrofotómetro Spectronic Genesys 8 UV/Vis (Thermo Electron Corporation). La actividad mitocondrial de las esporas solamente expuestas al medio de cultivo se evaluó como tratamiento de control.

### 3.1.2. Cuantificación de DNA

La cuantificación de DNA se utilizó para evaluar posibles alteraciones en el número de células de las esporas de helecho. Después de la incubación, las muestras se congelaron (-20° C) antes de realizar el ensayo de DNA. Tras su descongelación, se sedimentaron alícuotas de 1 ml de las esporas tratadas durante 5 minutos por centrifugación a 600 x g en un Heraus Fresco Biofuge (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). El sobrenadante se descartó y las esporas fueron resuspendidas en 1 ml de mezcla 1:1 de tampón TNE (Tris base 100 mM, EDTA-Na<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 1 M, pH 7,4) con solución de lisis (0,2% Triton X-100 y 1% NaOH 1 N). La homogeneización se realizó durante 30 minutos de agitación (3000 rpm, Labnet, Edison, NJ, USA) con aproximadamente 200 µl de fragmentos de vidrio tamizados (0,2-1 mm).

Tras la incubación a 37° C durante 1 hora en un baño de agua, se añadieron a los pocillos 190 µl de Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany), 0,1 µg/ml en tampon THREAD y 10 µl de cada muestra. La autofluorescencia de las propias esporas se descartó utilizando TNE sin Hoechst. La fluorescencia ( $\lambda$  exc: 360 nm,  $\lambda$  em: 465 nm) se midió en un lector de microplacas SPECTRAFluor (Teca Group Ltd. Männedorf, Suiza).

### 3.2. Toxicidad en el desarrollo de animales

Los embriones de *Danio rerio* se distribuyeron individualmente en placas de 48 pocillos y los embriones muertos se descartaron y reemplazaron. Los embriones se incubaron en 1 ml de agua fluvial o sintética durante 90 minutos a 26° C en oscuridad. Se incubaron 16 embriones por cada concentración. Tras la incubación, se eliminó el agua y se mantuvieron los embriones a -80° C hasta la medida de MDA (malondialdehído). La evaluación de la peroxidación lipídica se realiza por el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico descrito por Reilly and Aust (1999) y modificado por Feito et al. (2012, 2013). Los embriones expuestos individualmente se tomaron en pares y se homogeneizaron con un homogeneizador de tejidos de vidrio en etanol 80% suplementado con 2% de hidroxitolueno butilado (BHT) como antioxidante. Al homogeneizado se le añadió una mezcla de ácido tricloroacético (TCA)-ácido tiobarbitúrico (TBA)-ácido clorhídrico (HCl) solución ácida (9,18 x 10<sup>-1</sup> M de TCA, 2,57 x 10<sup>-2</sup> M de TBA y 3,20 M de HCl) en una ratio de 500:900 muestra, y después se incubó a 70° C durante una hora. Después de la incubación, la absorbancia del complejo TBA-

MDA-TBA se midió a 532 nm (se restó la absorbancia inespecífica a 600 nm causada por la dispersión de luz). Los patrones de trabajo se prepararon mediante dilución de 2 mM de solución madre del precursor TEP malondialdehído con 80% de etanol suplementado con 2% del antioxidante BHT para suprimir la descomposición de los peróxidos lipídicos durante el ensayo. Se prepararon concentraciones de trabajo de 0-20  $\mu$ M.

### **3.3. Tests de toxicidad estándar**

Por otro lado, se llevó a cabo el estudio de toxicidad aguda con métodos estándar validados que utilizan un alga de agua dulce, *Scenedesmus subspicatus*, y el crustáceo cladócero *Daphnia magna*. Estos ensayos se efectuaron sólo para las muestras de agua tomadas en verano. El estudio se realizó siguiendo los criterios del sistema de garantía de calidad en un laboratorio acreditado con los requisitos de la UNE-EN ISO/IEC 17025.

#### **3.3.1. Test de inhibición del crecimiento en el alga *Scenedesmus subspicatus***

El objetivo de este estudio fue determinar la concentración efectiva  $EC_{50}$ , tras 72 horas de exposición, en el crecimiento de un cultivo de algas verdes unicelulares de agua dulce (método EN 28692 y OECD n° 201, 2012). Para ello se realizó la prueba con todas las muestras a una concentración del 90% (V/V) de la muestra en el medio de ensayo, por triplicado, además de un control. El ensayo se realizó en una cámara de crecimiento a  $21 \pm 2^\circ$  C y 7000 lx, en un sistema estático. El crecimiento de las algas se midió a diario en términos de incremento o decrecimiento de la densidad celular (número de células/ml). Los valores de inhibición del crecimiento de las algas se midieron también mediante fluorescencia (435 nm excitación, 686 nm emisiones) alcanzándose los mismos resultados.

#### **3.3.2. Test de inhibición de la movilidad *Daphnia magna***

El objetivo de este estudio es determinar la concentración efectiva  $EC_{50-24}$  h y  $EC_{50-48}$  h (método ISO 6341:1996/co.1:1998). El test se realizó con todas las muestras a una concentración del 90% (V/V) de la muestra en el medio de ensayo, con 20 individuos por concentración divididos en cuatro contenedores con cinco dafnias cada uno. El grupo control estuvo formado por 20 dafnias. El ensayo se realizó en un sistema estático y en una cámara de crecimiento a  $20 \pm 2^\circ$  C en oscuridad.

#### **4. Análisis de los datos de toxicidad**

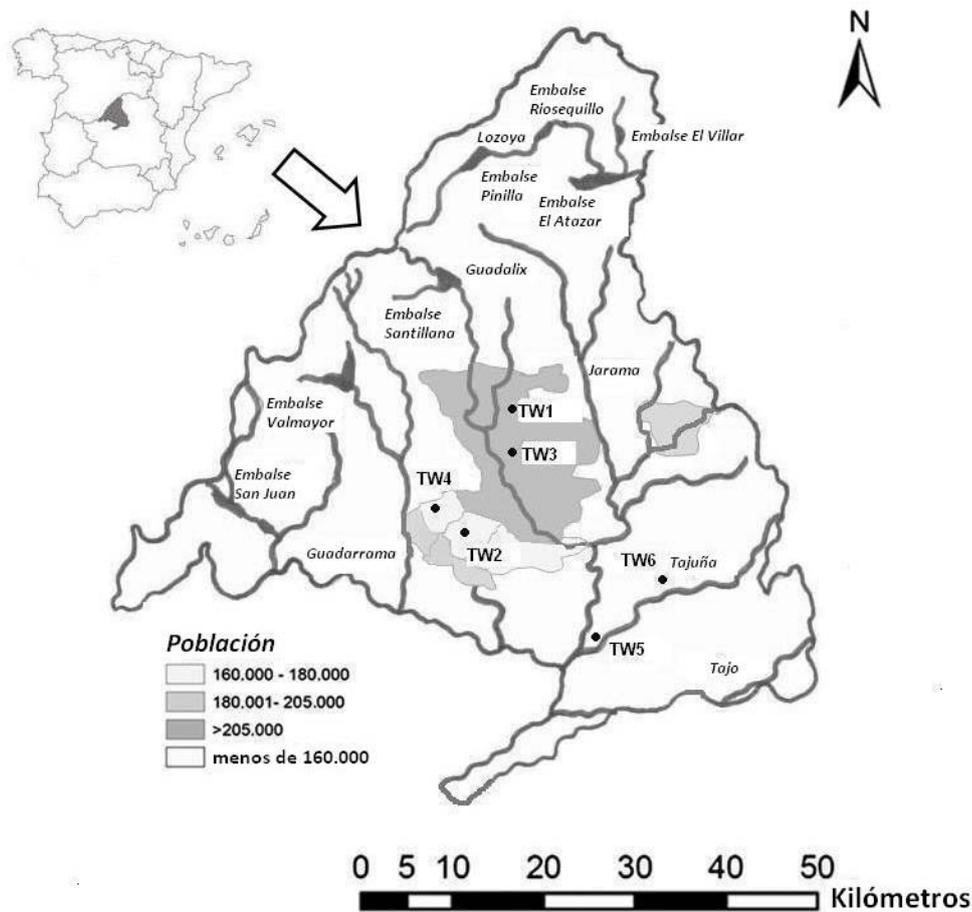
Las diferencias se evaluaron mediante un ANOVA y un test post-hoc Tukey-b con el programa SPSS. Este análisis permitió separar las muestras en subconjuntos con diferencias significativas. La significancia estadística se estableció con un pvalor  $< 0,05$ .

## ***Estudio 4: Monitorización de disruptores endocrinos y actividad estrogénica en el agua de grifo de la Comunidad de Madrid***

### **1. Puntos de muestreo**

Se realizó un muestreo puntual compuesto en el mes de agosto de 2012, donde se recogieron 6 muestras de agua de grifo (TW1, TW2, TW3, TW4, TW5 y TW6) de las principales zonas de abastecimiento de agua potable de la Comunidad de Madrid (Figura 5). Las muestras fueron recogidas del grifo de residencias privadas. El agua de grifo de las muestras TW1, TW2, TW3 y TW4 proceden de los principales embalses de la Comunidad de Madrid. Por otro lado, el agua de grifo de las muestras TW5 y TW6 proviene de agua fluvial potabilizada en la ETAP de Colmenar de Oreja. En este caso, la ETAP recoge el agua procedente del río Tajuña (afluente del río Tago) y proporciona agua potable a más de 1 millón de habitantes del Sureste de la Comunidad Autónoma de Madrid. Su capacidad de tratamiento es de 63.000.000 m<sup>3</sup> por año e incluye las siguientes tecnologías de tratamiento: pre-ozonización, pre-cloración, decantación lamelar, ultrafiltración, ósmosis inversa y desinfección.

Las muestras de agua de grifo se tomaron en botellas (0,5 l) ámbar de terelftalato de polietileno (PET) y se les añadió 60 µl de tiosulfato sódico, que actúa como bloqueante del cloro que habitualmente contiene el agua potable, con el objetivo de evitar posibles interferencias en el análisis. Asimismo, las muestras se mantuvieron congeladas para su posterior transporte y análisis.



### Características agua de grifo

Código muestra	Zona abastecimiento agua potable	Población servida	Ciudad	Distrito	Punto de muestreo
TW1	Colmenar Viejo	1.724.029	Madrid	Tetuán	Residencia privada
TW2	Retamares	433.627	Leganes	-	Residencia privada
TW3	Islas Filipinas	739.708	Madrid	Chamberi	Residencia privada
TW4	Valmayor	846.406	Alcorcón	-	Residencia privada
TW5	ETAP Colmenar Oreja	594.744	Titulcia	-	Residencia privada
TW6	ETAP Colmenar Oreja	594.744	Morata de Tajuña	-	Residencia privada

**Figura 5. Localización de los puntos de muestreo y características de las muestras de agua de grifo**

## 2. Compuestos analizados

Se analizaron las mismas sustancias que en el Estudio 2 (30 sustancias con posible actividad estrogénica y el marcador químico cafeína), y que se recogen en la Tabla 10: estrógenos naturales y sintéticos y sus conjugados, antimicrobianos, conservantes, plastificante BPA, alquilfenoles y sus metabolitos, anticorrosivos y retardantes de llama organofosforados.

### **3. Método analítico**

El método analítico utilizado para el tratamiento de las muestras se describe con detalle en el artículo de Gorga et al. (2013) y en el Estudio 2 de este trabajo sobre presencia de disruptores endocrinos en aguas superficiales.

### **4. Estrogenicidad**

La actividad estrogénica total de las muestras tomadas en las aguas de grifo de la Comunidad de Madrid se estimó tal y como se especifica en la sección de material y métodos del Estudio 2 de este trabajo.

### **5. Evaluación de riesgos**

La evaluación de riesgos es un proceso cualitativo y cuantitativo válido para caracterizar la naturaleza y magnitud del riesgo sobre la salud derivado de la exposición a sustancias químicas peligrosas presentes en el medio ambiente. Esta herramienta desarrollada por la “*United States Environmental Protection Agency (USEPA)*” (USEPA 2013) durante la década de los 70, tiene como objetivo predecir los efectos adversos sobre la salud humana causados por la presencia en el medio ambiente de diferentes compuestos químicos y es un requisito previo para la comercialización de cualquier nuevo compuesto con el objetivo de garantizar la seguridad de las sustancias químicas en los nuevos productos, en el medio ambiente y en la salud humana (USEPA 2013). Esta metodología se desarrolla en 4 etapas, de las cuales 3 se aplicarán en este estudio.

#### **1. Identificación del riesgo**

En esta etapa se determina si la exposición a dicho contaminante químico puede causar un aumento en la incidencia de determinados problemas para la salud y si es probable que dicho efecto adverso pueda producirse en los seres humanos. Se examinan los datos científicos disponibles para el compuesto químico y se identifica a la posible población expuesta.

Para la exposición a disruptores endocrinos en aguas de grifo se consideran dos escenarios: uno para adultos y otro para niños. Para ambos escenarios la exposición será

el consumo oral de agua de grifo en las zonas estudiadas y la “*frecuencia de exposición (FE)*” de 365 días/año. Según la USEPA (2013) los parámetros de exposición serán:

a) Adultos:

a. *Tasa de contacto (TC)* = 2 l/día.

b. *Peso corporal (PC)* = 70 kg.

b) Niños:

a. *Tasa de contacto (TC)* = 1 l/día

b. *Peso corporal (PC)* = 10 kg.

## 2. Evaluación de la exposición

En esta etapa se identificó la intensidad y la frecuencia de exposición de los disruptores endocrinos analizados a los que estaban expuestos los habitantes de la Comunidad de Madrid, a través del consumo de agua de grifo. Para ello se calculó el “*Índice de Exposición (IDE)*” mediante la ecuación:

$$IDE = C \cdot \frac{TC \cdot FE \cdot DE}{PC \cdot TM}$$

Donde:

*IDE* = *Índice de exposición* expresado en mg compuesto · kg<sup>-1</sup> peso corporal · día<sup>-1</sup>.

*C* = *Concentración de Exposición* para el medio de contacto considerado (mg/l o mg/kg).

*TC* = *Tasa de Contacto*. Expresa la cantidad de medio contaminado en contacto con el receptor por unidad de tiempo. Sus unidades dependen del medio contaminado. Para este estudio, líquidos l/día.

*FE* = *Frecuencia de Exposición* (días/años).

*DE* = *Duración de la Exposición* (años).

*PC* = *Peso Corporal*, correspondiente al peso corporal medio durante el periodo de exposición (kg).

***TM= periodo en el que se promedia la exposición.***

En este estudio, el efecto que se quiere evaluar es diferente al cáncer, por lo que, de acuerdo con la metodología de la USEPA (2013): **TM = DE**.

### 3. Caracterización del riesgo

Asimismo, como se evalúa un efecto diferente al del cáncer, el riesgo queda definido por el llamado “***Coficiente de Peligrosidad***” (***CP***), que se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$CP = \frac{IDE}{DfR}$$

Donde:

***IDE= Índice de Exposición*** (mg/kg·día).

***DfR= Dosis de referencia*** (mg/kg·día). Mediante la ***Dosis de Referencia (DfR)*** se estableció la relación cuantitativa entre la dosis y la respuesta a los disruptores endocrinos. Ninguno de los disruptores endocrinos evaluados es cancerígeno para el ser humano según la USEPA (2013) y la “***International Agency for Research on Cancer (IARC)***” (IARC 2013), aunque los compuestos TCEP y BPA se incluyen en el grupo 3 (no clasificable según su carcinogenicidad para humanos) de la IARC. La ***DfR*** determina la exposición oral diaria a la que puede estar expuesta la población humana, incluyendo grupos sensibles como los niños, para la cual es probable que no exista riesgo apreciable durante toda la vida. La USEPA (2013) sólo recoge valor de ***DfR*** para el BPA, siendo ésta de 0,05 mg/Kg · día. Por tanto, sólo se ha podido realizar evaluación de riesgos para el plastificante BPA.

Para poder interpretar los resultados obtenidos se tomará en consideración (USEPA 2013):

- **CP < 1: Coeficiente de Peligrosidad aceptable**
- **CP > 1: Coeficiente de Peligrosidad de no aceptable**

-

## RESULTADOS

### *Estudio 1: Residuos farmacéuticos psicoactivos en las cuencas de Galicia*

El porcentaje de las muestras con concentraciones detectables y las concentraciones medias a la entrada y salida de las EDARs, aguas abajo de los ríos y en las muestras de aguas de grifo se recogen en la Tabla 14.

**Tabla 14. Porcentaje (%) de las muestras con concentraciones detectables y concentración media (ng/l) a la entrada (I) y salida (E) de las EDARs, aguas abajo de los ríos (DSSTP) y en aguas de grifo de las cuencas de Galicia en 2008-2009**

	N	I (%)	Media (ng/l)	N	E (%)	Media (ng/l)	N	DSSTP (%)	Media (ng/l)	N	Agua de grifo	Media (ng/l)
<b>Antidepresivos</b>												
Amitriptilina	15	20	24	15	27	22	6	-	-	75	-	-
Citalopram	15	33	114	15	73	149	6	33	10	75	-	-
Clomipramina	15	-	-	15	7	4	6	-	-	75	1	27
Fluoxetina	15	7	16	15	60	28	6	-	-	75	-	-
Nortriptilina	15	-	-	15	13	11	6	-	-	75	-	-
Sertralina	15	13	113	15	27	33	6	-	-	75	-	-
Venlafaxina	15	47	401	15	67	317	6	50	67	75	1	44
<b>Antiepilépticos</b>												
Carbamazepina	15	30	73	15	40	181	6	33	63	75	-	-
<b>Ansiolíticos</b>												
$\alpha$ -Alprazolam	15	13	20	15	-	-	6	-	-	75	-	-
Alprazolam	15	20	27	15	20	17	6	17	17	75	1	11
Lorazepam	15	87	10598	15	67	689	6	50	167	75	3	562
Nordiazepam	15	13	16	15	40	17	6	-	-	75	-	-
Oxazepam	15	47	83	15	67	84	6	-	-	75	-	-
Tetrazepam	15	40	92	15	53	64	6	-	-	75	-	-

### 1. Aguas residuales

De los 14 fármacos psicoactivos analizados en el estudio, 12 se detectaron en las aguas residuales de las EDARs estudiadas. Sin embargo, en algunas muestras las concentraciones de algunos fármacos se situaron por debajo del límite de cuantificación.

#### 1.1. *Agua residual de entrada en la depuradora*

De las 15 muestras de agua recogidas a la entrada de la EDAR, la venlafaxina se detectó en el 47% de ellas, con una concentración media de 401 ng/l. A continuación se sitúa el citalopram detectado en el 33% de las muestras con una concentración media de 114 ng/l. Le sigue la amitriptilina encontrada en el 20% de las muestras, pero a concentraciones de 24 ng/l, mientras que la sertralina sólo se detectó en el 13% de las

muestras, pero a concentraciones más altas (113 ng/l). En este estudio la fluoxetina se encontró en el 7% de las muestras con una concentración media de 16 ng/l. Los antidepresivos clomipramina y nortriptilina no se hallaron en ninguna de las 15 muestras analizadas.

En cuanto al grupo de los ansiolíticos, cabe destacar el lorazepam encontrado en el 87% de las muestras de entrada a la EDAR a una concentración media elevada de 10.598 ng/l. Alejados de estos valores se encuentran el oxazepam y tetrazepam detectados en el 47% y 40% de las muestras con concentraciones medias de 83 ng/l y 92 ng/l, respectivamente. Finalmente, el alprazolam y el nordiazepam se detectaron en el 20% y 13% de las muestras con concentraciones medias de 27 ng/l y 16 ng/l, respectivamente.

El antiepiléptico carbamazepina se encontró en el 30% de las muestras con una concentración media de 73 ng/l.

## 1.2. ***Agua residual de salida de la depuradora***

En las muestras recogidas a la salida de la EDAR se encontraron los siguientes resultados. Dentro del grupo de los antidepresivos, el citalopram fue el que se detectó en más muestras, concretamente, en el 73% de las mismas con una concentración media (149 ng/l) superior a la de entrada en la EDAR. A continuación se sitúa la venlafaxina que se encontró en el 67% de las muestras con una concentración media de 317 ng/l. Por otro lado, se observó un aumento en el porcentaje de muestras (60%) en las que se detecta la fluoxetina con respecto a las muestras tomadas a la entrada de la depuradora, al igual que en cuanto a la concentración media detectada (28 ng/l). Lo mismo ocurre para los compuestos clomipramina y nortriptilina, que, si bien no se detectaron en las muestras de entrada, en las de la salida de la depuradora se hallaron en el 7% y 13% de las muestras con concentraciones de 4 ng/l y 11 ng/l, respectivamente. En cuanto a la amitriptilina y la sertralina también se detectaron en un mayor porcentaje de muestras (27% en ambos casos) con concentraciones de 22 ng/l y 33 ng/l, respectivamente.

Dentro del grupo de los ansiolíticos, los compuestos que se detectaron en el mayor porcentaje de las muestras (67% en ambos) fueron el lorazepam y el oxazepam con concentraciones medias de 689 ng/l y 84 ng/l, respectivamente. El tetrazepam apareció en el 53% de las muestras con una concentración media de 64 ng/l, mientras que el nordiazepam se halló en el 40% de las muestras con una concentración media de 17 ng/l.

En último lugar se sitúa el alprazolam que se detectó en el 20% de las muestras con una concentración media de 17 ng/l.

Finalmente, la carbamazepina se detectó en el 40% de las muestras a la salida de la EDAR con una concentración media (181 ng/l) superior a la de entrada en la EDAR.

## 2. Agua superficial

En las muestras de agua superficial analizadas en el estudio, el ansiolítico lorazepam y el antidepresivo venlafaxina se detectaron en el 50% de las muestras con concentraciones de 167 ng/l y 67 ng/l, respectivamente. A continuación se sitúan el antidepresivo citalopram y el antiépiléptico carbamazepina, detectados ambos en el 33% de las muestras analizadas con concentraciones medias de 10 ng/l y 63 ng/l, respectivamente. Por último, el ansiolítico alprazolam se detectó en el 17% de las muestras con una concentración media de 17 ng/l. El resto de fármacos analizados no se encontraron en ninguna de las muestras analizadas en el estudio.

## 3. Agua de grifo

Las concentraciones máximas y mínimas de los fármacos detectados en alguna de las 75 muestras de aguas de grifo recogidas en las cinco ciudades gallegas se muestran en la Tabla 15.

**Tabla 15. Concentraciones (ng/l) máxima-mínima de los fármacos detectados en las aguas de grifo de las ciudades Gallegas seleccionadas**

	Alprazolam min-max	Clomipramina min-max	Fluoxetina min-max	Lorazepam min-max	Venlafaxina min-max
Ciudad 1	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC
Ciudad 2	< LC	< LC	< LC-2	< LC	< LC
Ciudad 3	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC-44
Ciudad 4	< LC	< LC-27	< LC	< LC-546	< LC
Ciudad 5	< LC-11	< LC	< LC	< LC-578	< LC

LC: Por debajo del límite de cuantificación

De entre las 75 muestras totales de agua de grifo recogidas en las cinco ciudades, el lorazepam se detectó en el 3% de las mismas, con una concentración media de 562 ng/l (Tabla 14). Los antidepresivos clomipramina y venlafaxina y el ansiolítico alprazolam se detectaron en el 1% de las muestras con concentraciones medias de 27 ng/l, 44 ng/l y 11 ng/l, respectivamente.

Como se observa en la Tabla 15, excepto las muestras de agua de grifo de la ciudad 1, el resto de ciudades presentaron alguno de los fármacos analizados en alguna de las muestras recogidas. Destacan las elevadas concentraciones de lorazepam que se detectaron en algunas de las muestras recogidas en las ciudades 4 y 5.

## ***Estudio 2: Análisis y presencia de disruptores endocrinos y actividad estrogénica en las aguas superficiales del centro de España***

Este estudio evalúa la presencia de 30 compuestos clasificados como disruptores endocrinos o sospechosos de serlo, y el marcador químico antropogénico cafeína en siete puntos de muestreo localizados a lo largo de los ríos Jarama y Manzanares de la Comunidad Autónoma de Madrid.

En las Tablas 16A y 16B se resumen las concentraciones de las sustancias analizadas en cada uno de los ríos estudiados, con los valores medios, mínimo y máximo y desviación estándar. La frecuencia de detección en las muestras de agua superficial se recoge en la Figura 6 para cada una de las campañas de muestreo. Con el fin de comparar los resultados obtenidos en nuestro estudio con los datos publicados hasta el momento se ha elaborado la Tabla 17 en la que se recogen los niveles de concentración encontrados en las aguas superficiales de los estudios publicados en la última década.

Tabla 16A. Concentraciones (ng/l) de disruptores endocrinos en el río Manzanares en ambas campañas de muestreo

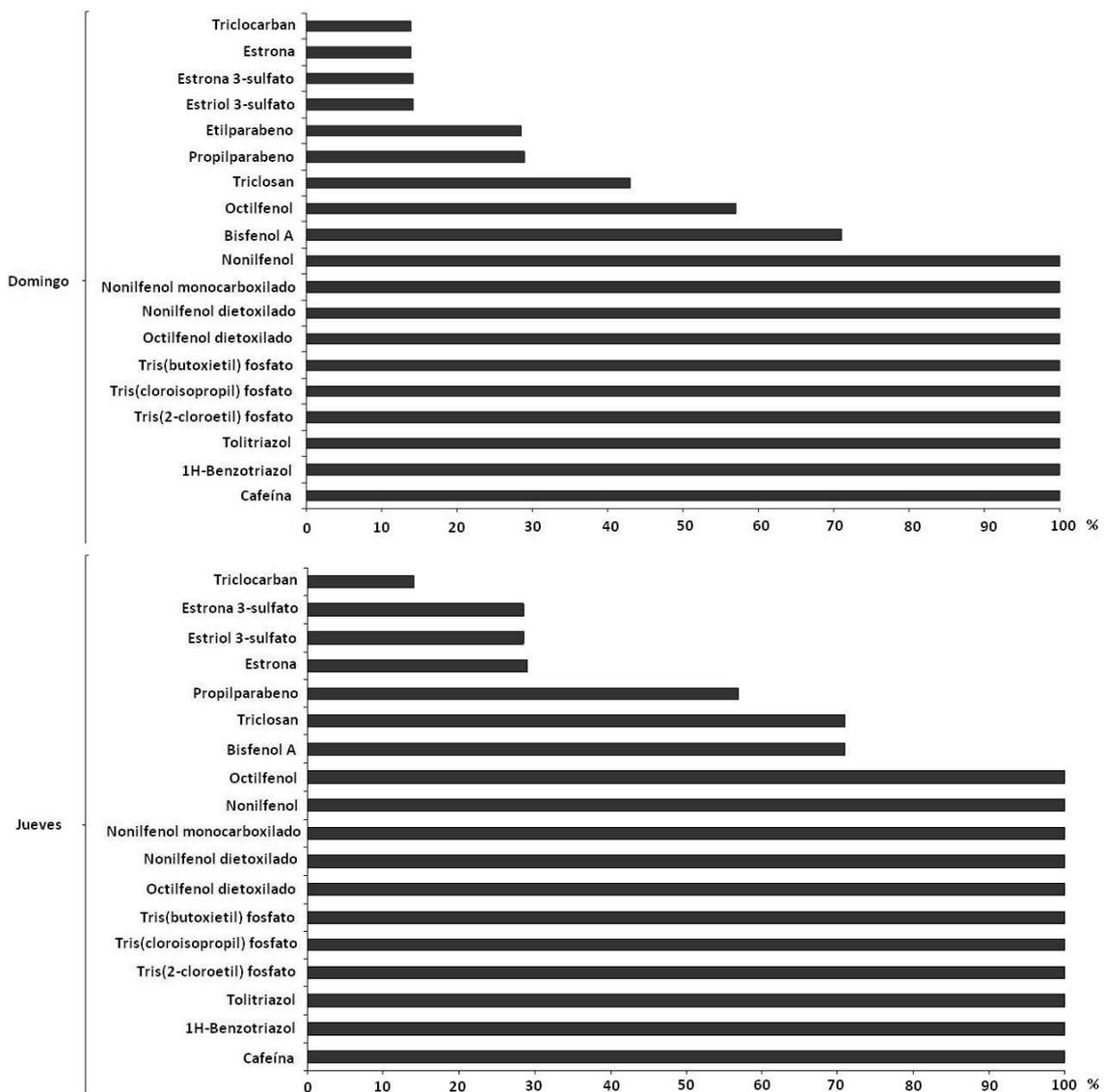
		RÍO MANZANARES									
		DOMINGO					JUEVES				
FAMILIA	COMPUESTOS	RSP-1	RSP-5	RSP-6	RSP-7	Mediana (min <sup>a</sup> -max)	RSP-1	RSP-5	RSP-6	RSP-7	Mediana (min <sup>a</sup> -max)
Estrógenos naturales y sintéticos y sus conjugados	Estradiol	<0,037	<0,037	<0,037	<0,037	-	<0,037	<0,037	<0,037	<0,037	-
	Estrona	17	<0,050	<0,050	<0,050	17	10	<0,050	4,5	<0,050	7,5 (4,5-10)
	Estriol	<0,17	<0,17	<0,17	<0,17	-	<0,17	<0,17	<0,17	<0,17	-
	Etinilestradiol	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14	-	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14	-
	Dietilestilbestrol	<0,043	<0,043	<0,043	<0,043	-	<0,043	<0,043	<0,043	<0,043	-
	Estrona 3-sulfato	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	-	10	<0,003	<0,003	10	10
	Estriol 3-sulfato	<0,030	<0,030	<0,030	<0,030	-	<0,030	8,9	<0,030	1,2	5 (1-9)
	Estradiol 17-glucurónido	<0,46	<0,46	<0,46	<0,46	-	<0,46	<0,46	<0,46	<0,46	-
	Estrona 3-glucurónido	<0,056	<0,056	<0,056	<0,056	-	<0,056	<0,056	<0,056	<0,056	-
	Estriol 16-glucurónido	<0,059	<0,059	<0,059	<0,059	-	<0,059	<0,059	<0,059	<0,059	-
Antimicrobianos/Desinfectantes	Triclosán	184	<0,17	66	<0,17	125 (66-184)	57	172	59	<0,17	59 (57-172)
	Triclocarban	<0,036	<0,036	<0,036	<0,036	-	<0,036	<0,036	11	<0,036	11
Conservantes	Metilparabeno	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20	-	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20	-
	Etilparabeno	<0,27	16	11	<0,27	13,5 (11-16)	<0,27	<0,27	<0,27	<0,27	-
	Propilparabeno	<0,021	<0,021	32	<0,021	32	6,1	<0,021	6,8	<0,021	6,5 (6-7)
	Benzilparabeno	<0,031	<0,031	<0,031	<0,031	-	<0,031	<0,031	<0,031	<0,031	-
Plastificante	Bisfenol A	56	<0,11	17	<0,11	36,5 (17-56)	71	12	<0,11	37	37 (12-71)
Alquilfenoles	Octilfenol	118	<0,14	101	<0,14	109,5 (101-118)	42	342	114	136	125 (42-342)
	Nonilfenol	217	185	1637	1483	850 (185-1483)	267	1180	436	809	622.5 (267-1180)
	Octilfenol monocarboxilado	<0,065	<0,065	<0,065	<0,065	-	<0,065	<0,065	<0,065	<0,065	-
	Nonilfenol monocarboxilado	691	1484	1666	1201	1342.5 (691-1666)	444	2013	1037	839	938 (839-2013)
	Octilfenol monoetoxilado	<17	<17	<17	<17	-	<17	<17	<17	<17	-
	Nonilfenol monoetoxilado	<62	<62	<62	<62	-	<62	<62	<62	<62	-
	Octilfenol dietoxilado	40	234	31	53	46,5 (31-234)	19	45	12	9	15,5 (9-45)
	Nonilfenol dietoxilado	272	312	211	287	279,5 (211-312)	173	255	163	156	168 (156-255)
Anticorrosivos	1H- Benzotriazol	506	469	370	263	419,5 (263-506)	1184	749	569	427	659 (427-1184)
	Toliltriazol	1052	840	477	445	658,5 (445-1052)	930	454	299	848	651 (299-930)
Retardantes de llama organofosforados	Tris(butoxietil) fosfato	2028	1931	619	372	1275 (372-2028)	1289	2308	1206	1991	1640 (1206-2308)
	Tris(cloroisopropil) fosfato	909	795	700	867	831 (700-909)	1260	784	809	768	796.5 (768-1260)
	Tris(2-cloroetil) fosfato	37	43	32	40	38,5 (32-43)	52	33	35	41	38 (33-52)
Marcador químico	Cafeína	12	118	290	369	204 (12-369)	22	22	101	406	61,5 (22-406)

Mínimo-Máximo: primer valor por encima del límite de detección.

Tabla 16B. Concentraciones (ng/l) de disruptores endocrinos en el río Jarama en ambas campañas de muestreo

		RÍO JARAMA							
		DOMINGO				JUEVES			
FAMILIA	COMPUESTOS	RSP-2	RSP-3	RSP-4	Mediana (min <sup>a</sup> -max)	RSP-2	RSP-3	RSP-4	Mediana (min <sup>a</sup> -max)
Estrógenos naturales y sintéticos y sus conjugados	Estradiol	<0,037	<0,037	<0,037	-	<0,037	<0,037	<0,037	-
	Estrona	<0,050	<0,050	<0,050	-	<0,050	<0,050	<0,050	-
	Estriol	<0,17	<0,17	<0,17	-	<0,17	<0,17	<0,17	-
	Etinilestradiol	<0,14	<0,14	<0,14	-	<0,14	<0,14	<0,14	-
	Dietilestilbestrol	<0,043	<0,043	<0,043	-	<0,043	<0,043	<0,043	-
	Estrona 3-sulfato	<0,003	<0,003	8,1	8,1	<0,003	<0,003	<0,003	-
	Estriol 3-sulfato	<0,030	<0,030	1,7	1,7	<0,030	<0,030	<0,030	-
	Estradiol 17-glucurónido	<0,46	<0,46	<0,46	-	<0,46	<0,46	<0,46	-
	Estrona 3-glucurónido	<0,056	<0,056	<0,056	-	<0,056	<0,056	<0,056	-
Estriol 16-glucurónido	<0,059	<0,059	<0,059	-	<0,059	<0,059	<0,059	-	
Antimicrobianos/ Desinfectantes	Triclosán	223	<0,17	<0,17	223	166	46	<0,17	106 (46-166)
	Triclocarban	10	<0,036	<0,036	10	<0,036	<0,036	<0,036	-
Conservantes	Metilparabeno	<0,20	<0,20	<0,20	-	<0,20	<0,20	<0,20	-
	Etilparabeno	<0,27	<0,27	<0,27	-	<0,27	<0,27	<0,27	-
	Propilparabeno	<0,021	<0,021	4,2	4,2	22	38	<0,021	30 (22-38)
	Benzilparabeno	<0,031	<0,031	<0,031	-	<0,031	<0,031	<0,031	-
Plastificante	Bisfenol A	126	106	87	106 (87-126)	6,5	<0,11	89	47,5 (6-89)
Alquilfenoles	Octilfenol	70	<0,14	50	60 (50-70)	474	50	96	96 (50-474)
	Nonilfenol	344	96	123	123 (96-344)	869	405	813	813 (405-869)
	Octilfenol monocarboxilado	<0,065	<0,065	<0,065	-	<0,065	<0,065	<0,065	-
	Nonilfenol monocarboxilado	1551	596	734	734 (596-1551)	3374	369	926	926 (369-3374)
	Octilfenol monoetoxilado	<17	<17	<17	-	<17	<17	<17	-
	Nonilfenol monoetoxilado	<62	<62	<62	-	<62	<62	<62	-
	Octilfenol dietoxilado	68	97	19	68 (19-97)	27	96	49	49 (27-96)
Nonilfenol dietoxilado	345	616	298	345 (298-616)	260	721	637	637 (260-721)	
Anticorrosivos	1H- Benzotriazol	185	205	97	185 (97-205)	345	261	164	261 (164-345)
	Toliltriazol	805	718	272	718 (272-805)	753	597	418	597 (418-753)
Retardantes de llama organofosforados	Tris(butoxietil) fosfato	2563	5288	712	2563 (712-5288)	1986	2599	1048	1986 (1048-2599)
	Tris(cloroisopropil) fosfato	793	637	441	637 (441-793)	893	389	414	414 (389-893)
	Tris(2-cloroetil) fosfato	57	38	24	38 (24-57)	64	29	22	29 (22-64)
Marcador químico	Cafeína	510	5928	357	510 (357-5928)	77	5452	1048	1048 (77-5452)

<sup>a</sup> Mínimo-Máximo: primer valor por encima del límite de detección.



**Figura 6. Frecuencia de detección de los disruptores endocrinos analizados en las muestras de agua superficial durante las dos campañas de muestreo (domingo-jueves)**

**Tabla 17. Niveles de concentración (ng/l) de disruptores endocrinos encontrados en las aguas superficiales de los estudios publicados en la última década**

FAMILIA	COMPUESTO	ESPAÑA	ALEMANIA	REINO UNIDO	CHINA	EEUU
<b>Estrógenos</b>	E2	71.1 <sup>b</sup> ; 130 <sup>b</sup>			7.4 <sup>k</sup> ; 2.3 <sup>k</sup> ; 7.7 <sup>l</sup>	17 <sup>o</sup> ; 3.76 <sup>p</sup>
	E1	560 <sup>b</sup> ; 5.81 <sup>b</sup> ; 1.68 <sup>b</sup> ;			55.8 <sup>k</sup> ; 15.61 <sup>k</sup> ; 79 <sup>l</sup>	3.71 <sup>p</sup>
	E3	4.41 <sup>b</sup>				
	EE2	170 <sup>b</sup> ; 11.60 <sup>b</sup>				1.4 <sup>o</sup> ; ND <sup>p</sup>
	DES					
	E1-3S					
	E3-3S	0.44 <sup>b</sup> ; 1.46 <sup>b</sup> ; 0.44 <sup>b</sup>				
	E2-17G E1-3G E3-16G					
<b>Antimicrobianos</b>	TCC			95 <sup>g</sup>	81.3 <sup>k</sup> ; 49.9 <sup>k</sup> ; 355 <sup>l</sup>	2300 <sup>o</sup>
	TCS	45 <sup>b</sup> ; 700 <sup>b</sup> ; 57 <sup>d</sup>				
<b>Conservantes</b>	MeP	37 <sup>b</sup>		150 <sup>g</sup>		
	EtP	ND <sup>b</sup>		12 <sup>g</sup>		
	BeP	ND <sup>b</sup>				
	PrP	ND <sup>b</sup>		11 <sup>g</sup>		
<b>Plastificante</b>	BPA	ND <sup>a</sup> ; 2970 <sup>b</sup> ; 100 <sup>c</sup>		68 <sup>g</sup>	2990 <sup>l</sup> ; 755.6 <sup>k</sup> ; 171.5 <sup>k</sup> ; 1040 <sup>l</sup>	81 <sup>o</sup> ; 14 <sup>o</sup> ; 57 <sup>p</sup>
<b>Alquilfenoles</b>	NP	1320 <sup>a</sup> ; 530 <sup>b</sup> ; 6200 <sup>b</sup>	770 <sup>f</sup> ; 723 <sup>f</sup> ; 618 <sup>f</sup> ; 717 <sup>f</sup>		8540 <sup>h</sup> ; 65770 <sup>h</sup> ; 1582 <sup>n</sup> ; 2065.7 <sup>k</sup> ; 577.9 <sup>k</sup> ; 14.5 <sup>k</sup> ; 11.300 <sup>l</sup>	130 <sup>o</sup>
	OP	520 <sup>a</sup> ; 880 <sup>b</sup>		536 <sup>g</sup>	63.2 <sup>j</sup> ; 52.1 <sup>k</sup> ; 3150 <sup>l</sup>	
	OP <sub>1</sub> EC	2430 <sup>b</sup>				
	NP <sub>1</sub> EC	6110 <sup>b</sup>				
	OP <sub>1</sub> EO					
	NP <sub>1</sub> EO	2700 <sup>b</sup>				
	OP <sub>2</sub> EO NP <sub>2</sub> EO	270 <sup>b</sup> ; 1600 <sup>b</sup>				1380 <sup>i</sup>
<b>Anticorrosivos</b>	BT	1120 <sup>a</sup>	472 <sup>c</sup> ; 1474 <sup>c</sup> ; 38 <sup>e</sup>			
	TT					
<b>Retardantes de llama</b>	TBEP	47 <sup>d</sup>				720 <sup>o</sup>
	TCCP	5 <sup>d</sup>				530 <sup>o</sup>
	TCEP		2019 <sup>f</sup> ; 1190 <sup>f</sup> ; 561 <sup>f</sup> ; 464 <sup>f</sup>			

ND: No Detectado;

<sup>a</sup> Río Ter (Céspedes et al. 2006); <sup>b</sup> Río Llobregat y otros ríos de España (Petrovic et al., 2001; Petrovic et al., 2004; Céspedes et al., 2005; Pedrouzo et al. 2007; Kuster et al., 2008; Blanco et al., 2009; Montes et al., 2009; López-Roldán et al., 2010; Brix et al. 2010; Pelayo et al. 2011); <sup>c</sup> Río Guadalquivir (Ballesteros-Gómez et al. 2007); <sup>d</sup> Río Mero de Galicia (Rodil et al., 2012); <sup>e</sup> Río Main, río Hengstbach y río Hegbach (Kiss et al. 2009); <sup>f</sup> Río Schwarzbach, río Modau y río Weschnitz (Quednow et al. 2009); <sup>g</sup> Ríos Taff y Ely (Kasprzyk-Hordern et al., 2008); <sup>h</sup> Ríos Qiantang y Tiesha (Lou et al. 2012); <sup>i</sup> Ríos de Tianjin (Yu et al. 2009); <sup>j</sup> Río Jialu (Zhang et al. 2011); <sup>k</sup> Ríos Liao y Yellow (Wang et al. 2011); <sup>l</sup> Río Pearl (Zhao et al. 2009); <sup>o</sup> Ríos de Norte América (Kolpin et al., 2002; Palmer et al., 2008; Klecka et al., 2009; Benotti et al., 2009; Knee et al. 2010); <sup>p</sup> Río Mississippi (Wang et al. 2012).

## **1. Estrógenos naturales y sintéticos y sus conjugados**

Siete de los 10 estrógenos analizados no se encontraron en ninguna de las muestras recogidas en este estudio. Sin embargo, el E3-3S, el E1 y su metabolito E1-3S se detectaron con una frecuencia del 14% y del 29% en las muestras del domingo y del jueves, respectivamente. Las concentraciones de E1 encontradas oscilan entre valores por debajo del límite de cuantificación y 17 ng/l (RSP-1, domingo). El E1-3S y el E3-3S se hallaron en concentraciones similares (10 ng/l y 9 ng/l, respectivamente).

## **2. Conservantes (parabenos)**

Dentro del grupo de los parabenos, el PrP se encontró en las dos campañas de muestreo, con frecuencias de detección de 57% (jueves) y 29% (domingo). La concentración máxima encontrada fue de 38 ng/l (RSP-3, jueves). El EtP se detectó con una frecuencia del 29% en el muestreo del domingo pero no se encontró en la muestra del jueves. La concentración máxima de EtP fue 16 ng/l (RSP-5, domingo). Los otros dos parabenos analizados (MeP y BeP) no se hallaron en ninguna de las muestras recogidas.

## **3. Antimicrobianos/desinfectantes (triclosán y triclocarban)**

El TCS se encontró en la mitad de las muestras tomadas el domingo y en el 71% de las muestras recogidas el jueves. La concentración máxima fue de 223 ng/l (RSP-2, domingo). Por otro lado, el TCC se detectó con una frecuencia del 14% en ambas campañas de muestreo, aunque las concentraciones encontradas son inferiores a los 20 ng/l.

## **4. Plastificante (bisfenol A)**

En este estudio el BPA se encontró en el 71% de las muestras recogidas en ambas campañas con una concentración máxima de 126 ng/l (RSP-2, domingo).

## **5. Alquilfenoles (nonilfenol y octilfenol)**

Dentro del grupo de los alquilfenoles, el NP se detectó en todas las muestras tomadas en ambas campañas, con una concentración máxima de 1637 ng/l (RSP-6, domingo). Por otro lado, el OP se encontró en todas las muestras tomadas el jueves, con una

concentración máxima de 474 ng/l (RSP-2, jueves), mientras que sólo en el 57% de las muestras del domingo con una concentración máxima de 118 ng/l (RSP-1, domingo).

Los metabolitos NP<sub>1</sub>EC, NP<sub>2</sub>EO y OP<sub>2</sub>EO se encontraron en todas las muestras tomadas durante las dos campañas, con concentraciones máximas de 3374 ng/l (RSP-2, jueves), 721 ng/l (RSP-3, jueves) y 234 ng/l (RSP-5, domingo), respectivamente.

## **6. Retardantes de llama organofosforados**

Todos los compuestos organofosforados analizados en este estudio se detectaron en todas las muestras de agua recogidas, siendo TBEP y el TCPP aquellos con concentraciones máximas más elevadas. Para el TBEP de 5288 ng/l en el punto RSP-3 del muestreo efectuado el domingo, y en el caso del TCPP de 1260 ng/l en el punto RSP-1 de las muestras del jueves. El TCEP se halló a concentraciones más bajas alcanzando una concentración máxima de 64 ng/l (RSP-2, jueves).

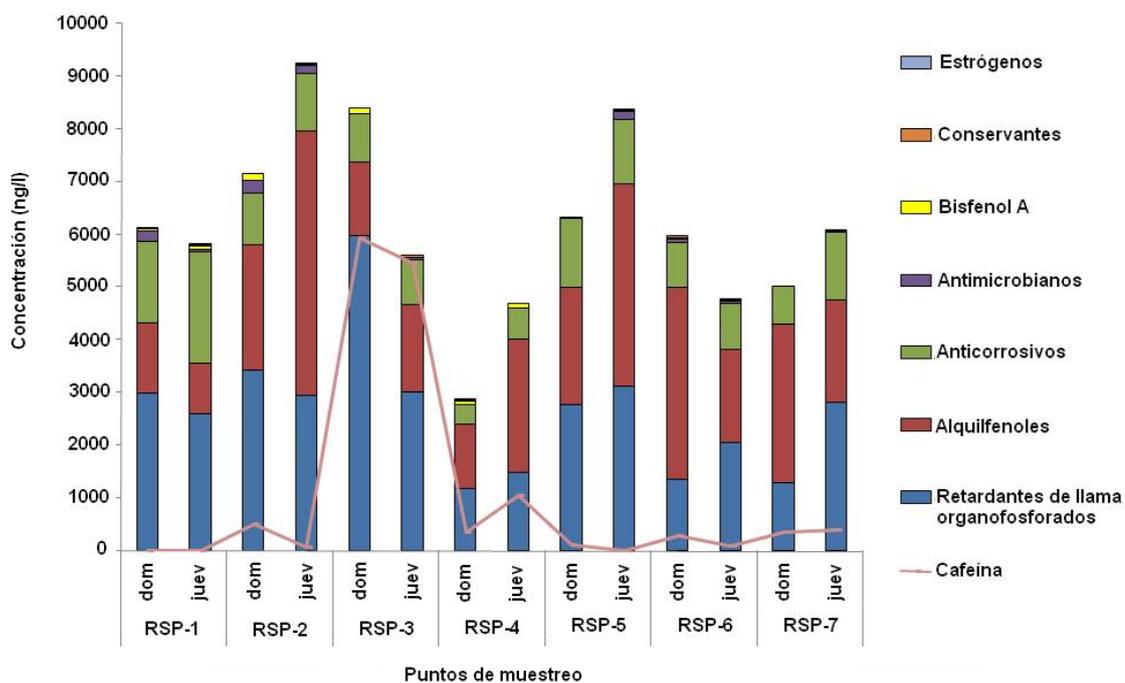
## **7. Anticorrosivos (benzotriazol y tolitriazol)**

El grupo de compuestos anticorrosivos analizados aparece a elevadas concentraciones en todas las muestras de agua recogidas durante las dos campañas de muestreo. El BT se encontró con una concentración máxima de 1184 ng/l (RSP-1, jueves) y el TT con valores de hasta 1052 ng/l (RSP-1, domingo).

## **8. Contribución de cada compuesto analizado a la contaminación detectada**

El análisis de las aguas superficiales detectó la presencia de 19 de los 31 disruptores endocrinos analizados, a concentraciones que varían entre los 2 y los 5928 ng/l.

Los retardantes de llama organofosforados, alquilfenoles y anticorrosivos se encontraron a concentraciones más elevadas que el resto de compuestos durante las dos campañas de muestreo. El TBEP (retardante de llama organofosforado) fue el que se detectó a los mayores niveles, con una concentración máxima de 5288 ng/l, seguido del NP<sub>1</sub>EC (alquilfenol), con una concentración de 3374 ng/l, y del BT (anticorrosivo), con un valor máximo de 1184 ng/l (Figura 7).



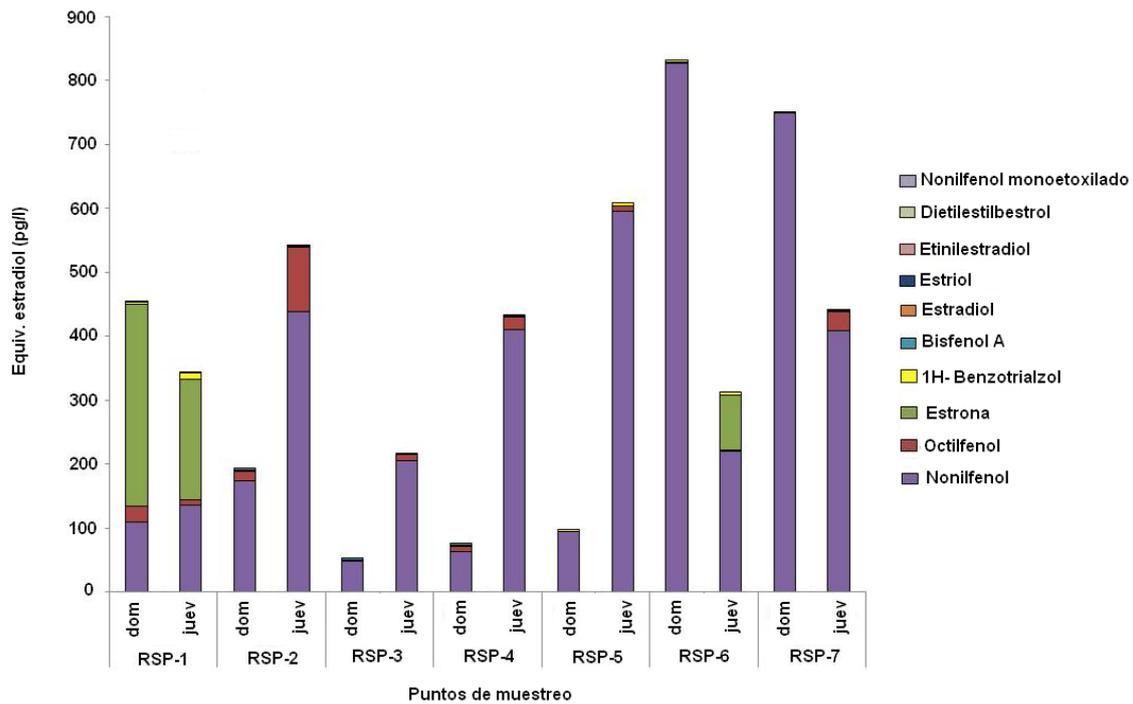
**Figura 7. Niveles acumulados (ng/l) de los grupos de disruptores endocrinos en las aguas superficiales analizadas durante las dos campañas de muestreo (domingo-jueves)**

La concentración total detectada en el río Manzanares fue de 6252 y 5854 ng/l en los muestreos del jueves y del domingo, respectivamente, mientras que en el río Jarama las concentraciones fueron de 6505 y 6136 ng/l en cada una de las campañas.

Por puntos de muestreo, las mayores concentraciones de disruptores endocrinos se encontraron en el punto RSP-2 (EDAR Rejas, Jarama, Norte) para el muestreo del jueves y en el punto RSP-3 (EDAR Valdebebas, Jarama, noreste) para el muestreo del domingo, y las más bajas en el punto RSP-4 (EDAR La Poveda, Jarama, Sur) para ambas campañas de muestreo (Figura 7). Por campaña de muestreo, la concentración total detectada en las muestras tomadas el jueves fue mayor que la registrada en las muestras recogidas el domingo. El punto RSP-2 es el más contaminado para las muestras tomadas el jueves.

## 9. Estrogenicidad

La actividad estrogénica se evaluó para los siguientes grupos de disruptores endocrinos: estrógenos naturales y sintéticos y sus conjugados, alquilfenoles, anticorrosivos y BPA. Los niveles acumulados de equivalentes de estradiol (EEQ) para cada compuesto se recogen en la Figura 8 y se expresan en unidades de pg/l (1 pg/l=10<sup>-3</sup> ng/l).



**Figura 8. Niveles acumulados (pg/l) de equivalentes de  $\beta$ -estradiol (EEQ) para cada compuesto analizado**

Las muestras RSP-6 y RSP-7 (domingo), tomadas en el río Manzanares, son las que presentaron la mayor actividad estrogénica con valores de EEQ de 831,6 y 750,7 pg/l, respectivamente. Por otro lado, la muestra RSP-3 (domingo), recogida en el río Jarama, presentó la menor actividad estrogénica (valor de EEQ de 52,6 pg/l). De acuerdo con la evaluación de estrogénicidad realizada en las muestras de agua analizadas, el río Manzanares presenta mayor contaminación estrogénica que el río Jarama.

Los EEQs del estrógeno E1 varían entre 315,3 y 189,3 pg/l en el punto RSP-1 (domingo y jueves, respectivamente) y 85,6 pg/l en el punto RSP-6 (jueves). El NP presentó EEQs muy elevados en el punto RSP-6 (domingo: 826,8 pg/l) y en el punto RSP-7 (domingo: 748,7 pg/l). Los valores de equivalentes de estradiol (EEQ) obtenidos para el grupo de anticorrosivos y para el plastificante BPA se situaron por debajo del límite de detección (< LD).

### ***Estudio 3: Sensibilidad de nuevos bioensayos basados en biomarcados a la microcontaminación del agua fluvial***

Este estudio evalúa la toxicidad aguda del agua fluvial del río Tajo en el desarrollo de las esporas del helecho *Polystichum setiferum* y de los embriones del pez cebra *Danio rerio* tras 24 horas o 90 minutos de exposición. Para ello se han utilizado dos biomarcadores en el desarrollo del helecho: actividad mitocondrial y cantidad de DNA como medidas de la energía de las células y de letalidad/crecimiento, respectivamente. Por otro lado, se ha evaluado la peroxidación lipídica como biomarcador de daño subletal en las membranas celulares del pez cebra. Asimismo, para las muestras tomadas en verano, se realizaron dos ensayos de ecotoxicidad validados (inhibición del crecimiento del alga *Scenedesmus subspicatus* e inhibición de la movilidad de *Daphnia magna*) con el fin de poder evaluar la sensibilidad de ambos métodos.

#### **1. Muestras tomadas en verano**

##### ***1.1. Test de toxicidad estándar***

Tras 72 horas de observación, no se apreció inhibición en el crecimiento de las algas expuestas a las muestras de agua fluvial, lo que indica ausencia de toxicidad, ya que la  $EC_{50-72\text{ h}}$  para las algas se situó en un valor por encima del 90% (V/V) para todas las muestras analizadas. Para dafnia, los resultados no muestran toxicidad en ninguna de las muestras estudiadas, de manera que, la  $EC_{50-24\text{ h}}$  y la  $EC_{50-48\text{ h}}$  se situaron en un valor por encima del 90% (V/V) para todas las muestras analizadas. Por tanto, de acuerdo con los métodos estándar validados las muestras de agua fluvial no inducen toxicidad aguda. No hay evidencia de que se produzca el fenómeno de hormesis en las muestras durante el ensayo de inhibición del crecimiento en algas. La evaluación se llevó a cabo en las muestras a una concentración del 90% (V/V) y no se encontró inhibición del crecimiento, por lo que no se realizó el ensayo a concentraciones más bajas (Tabla 18).

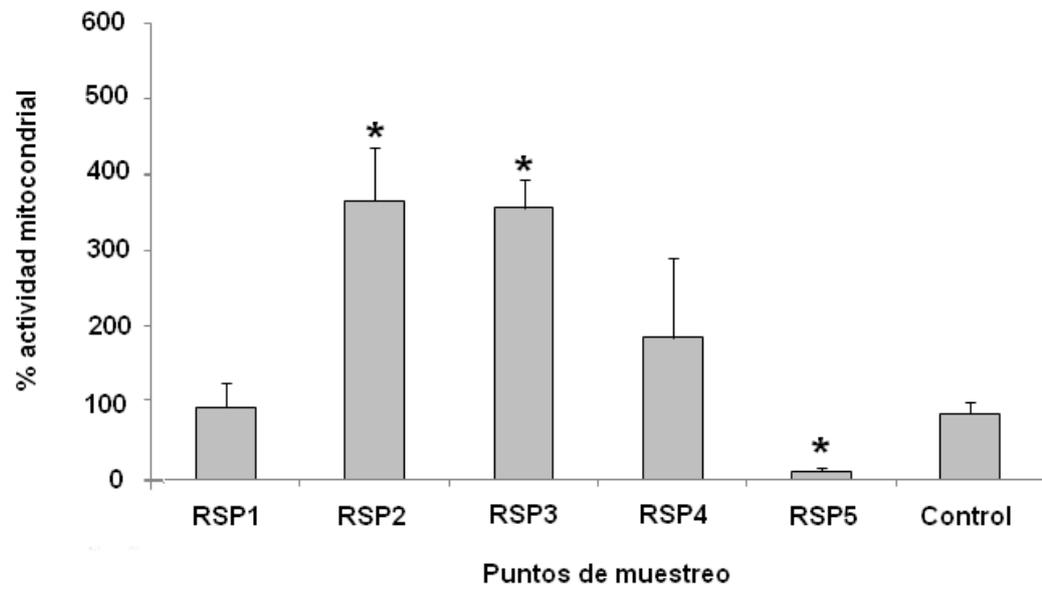
**Tabla 18. Valores de EC<sub>50</sub> de *Scenedesmus subspicatus* y *Daphnia magna* tras 72 horas de exposición en % (V/V) para las muestras tomadas en verano**

Periodo de observación (Horas)	<i>Scenedesmus subspicatus</i>		<i>Daphnia magna</i>	
	Inhibición del crecimiento (%)	IC <sub>50i</sub> % (V/V)	Mortalidad (%)	EC <sub>50i</sub> % (V/V)
24 H	0	> 90	0	> 90
48 H	0	> 90	0	> 90
72 H	0	> 90	-	-

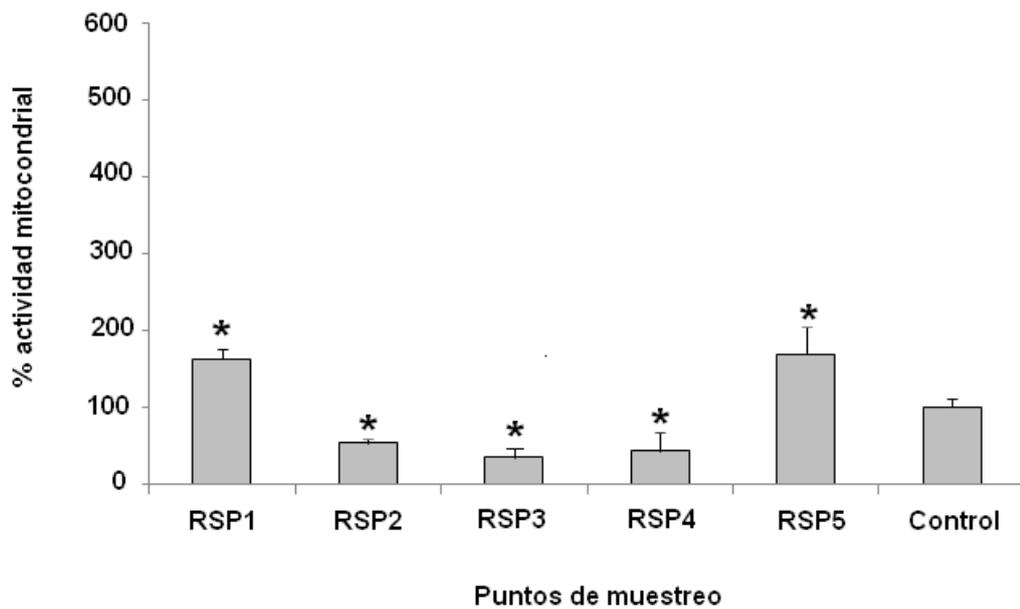
### **1.2. Bioensayo de toxicidad en plantas**

Los efectos agudos de las muestras de agua fluvial tomadas en verano son remarcables en el bioensayo con esporas de helecho. Tras 24 horas de exposición, se observó un incremento significativo de la actividad mitocondrial en las muestras RSP-2 y RSP-3, y una disminución drástica de este biomarcador en la muestra RSP-5 (Figura 9A). En cuanto al otro biomarcador (cantidad de DNA), no se observaron diferencias significativas para ninguna de las muestras (Figura 10A). Se midieron cantidades de DNA similares en células tratadas en comparación con los controles, es decir, el mismo número de células.

### A) VERANO



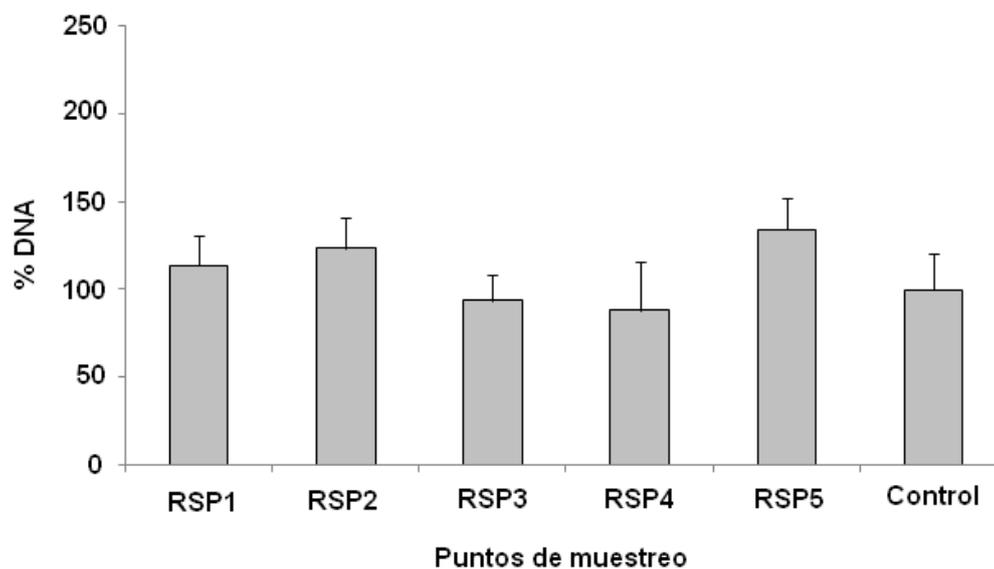
### B) INVIERNO



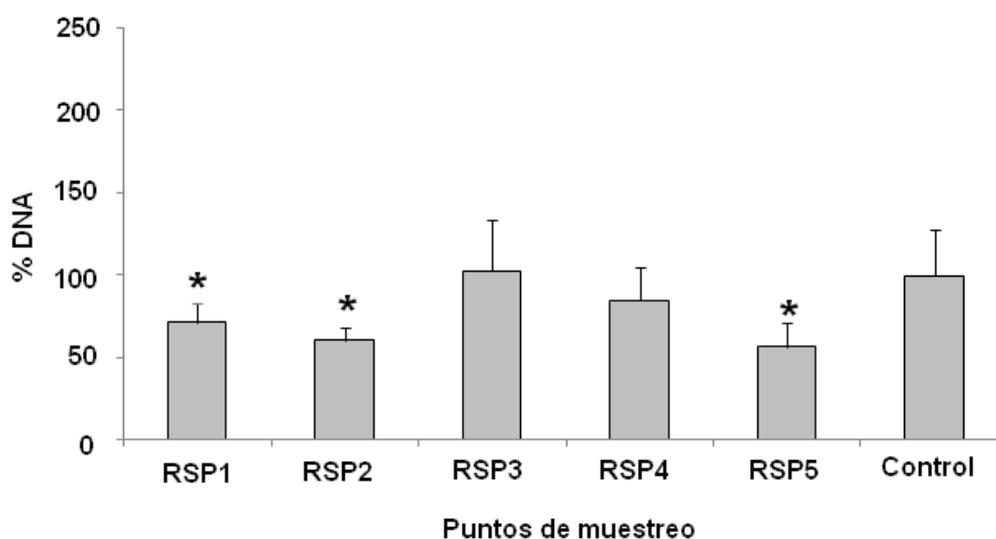
**Figura 9. Porcentaje de variación de la actividad mitocondrial tras 24 horas de exposición de las esporas de *Polystichum setiferum* con respecto al control en los cinco puntos de muestreo del río Tajo tomadas en verano (A) e invierno (B)**

El asterisco (\*) indica una diferencia significativa de  $p < 0,05$  con respecto a los controles.

### A) VERANO



### B) INVIERNO



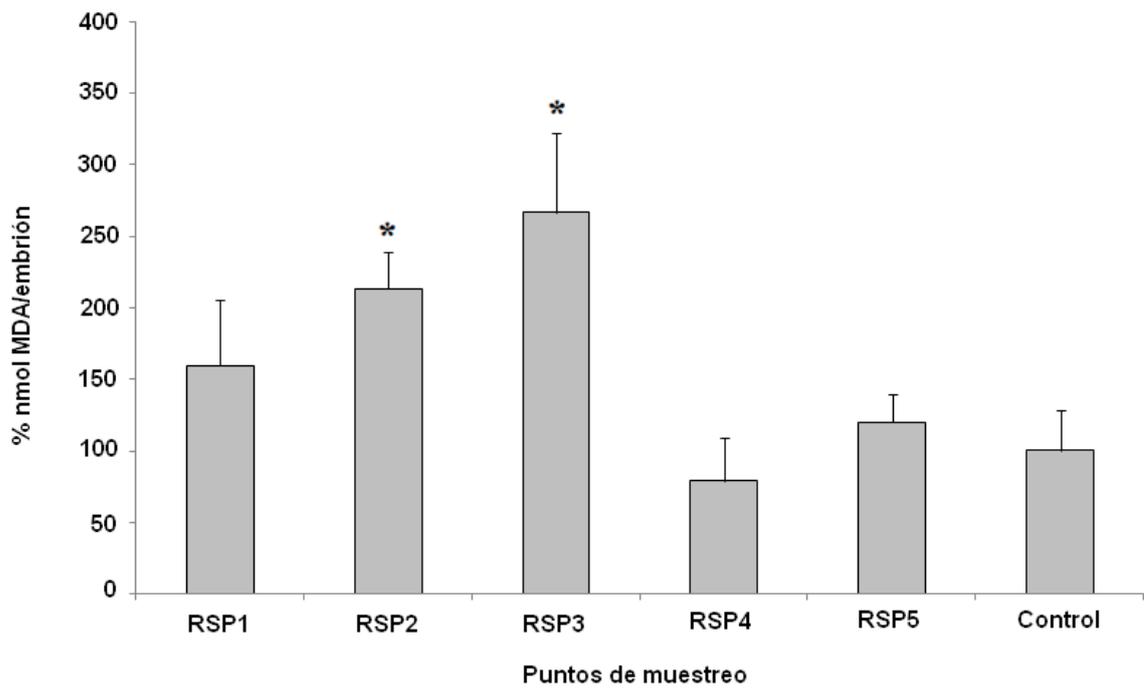
**Figura 10. Porcentaje de variación en la cantidad de DNA tras 24 horas de exposición de las esporas de *Polystichum setiferum* con respecto al control en los cinco puntos de muestreo del río Tajo en verano (A) e invierno (B)**

El asterisco (\*) indica una diferencia significativa de  $p < 0,05$  con respecto a los controles.

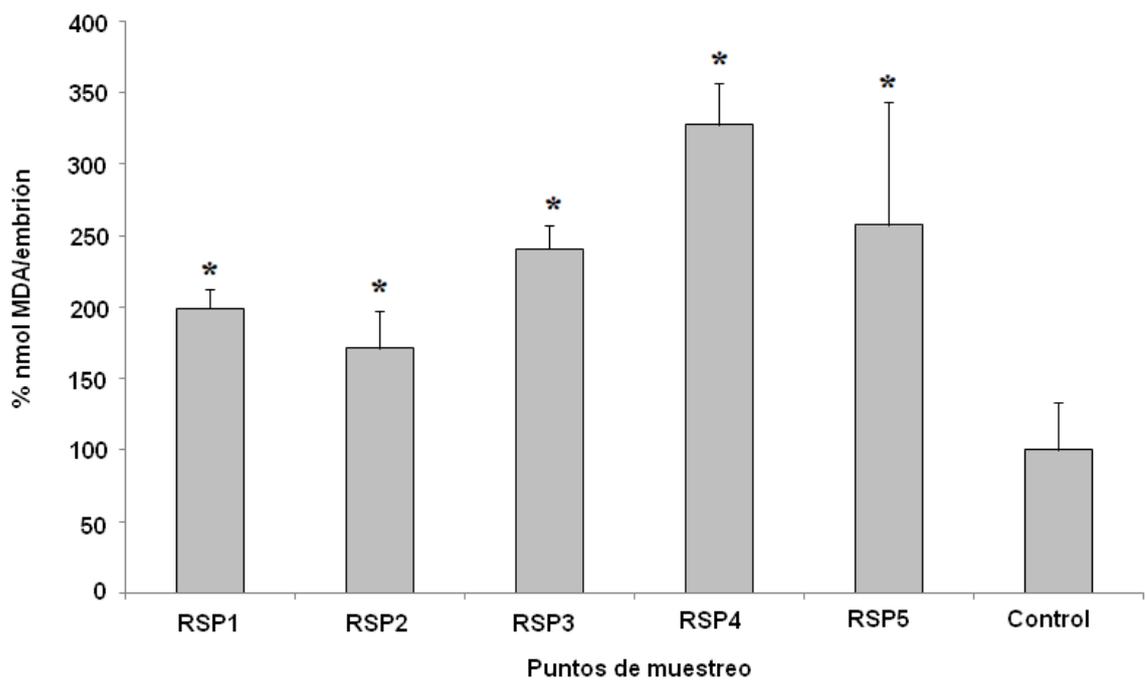
### ***1.3. Bioensayo de toxicidad en animales***

Los resultados del ensayo con embriones de pez cebra se muestran en la Figura 11. Para las muestras RSP-2 y RSP-3 tomadas en verano (Figura 11A), la peroxidación lipídica aumenta de manera significativa, mientras que en el resto de muestras no se observa este aumento con respecto a los controles.

### A) VERANO



### B) INVIERNO



**Figura 11. Peroxidación lipídica de los embriones de *Danio rerio* expuestos al agua fluvial durante 90 min en verano (A) e invierno (B)**

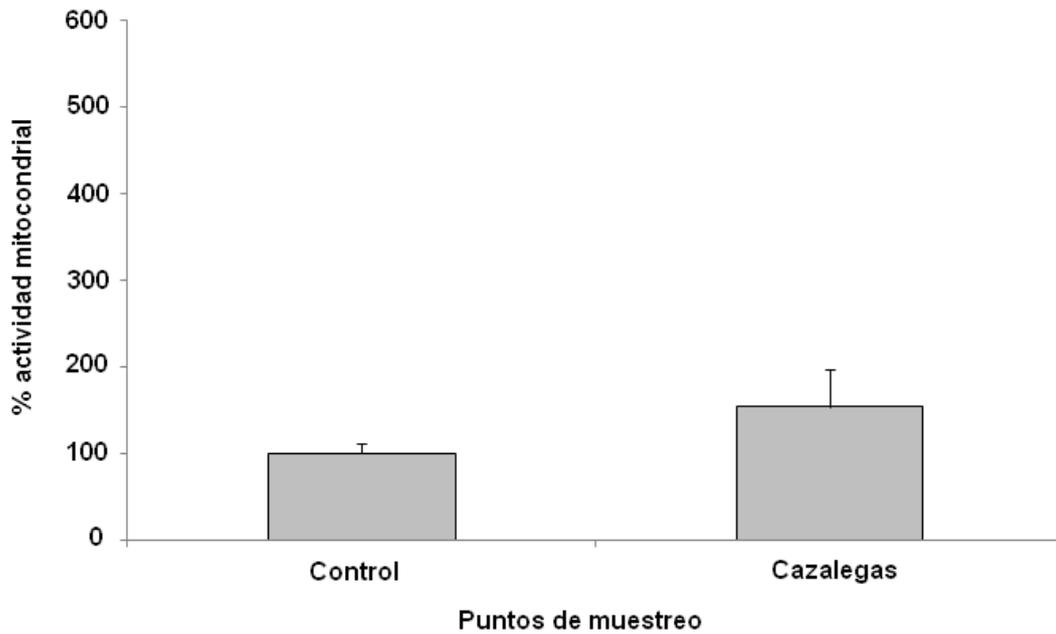
El asterisco (\*) indican una diferencia significativa de  $p < 0,05$  con respecto a los controles.

## **2. Muestras tomadas en invierno**

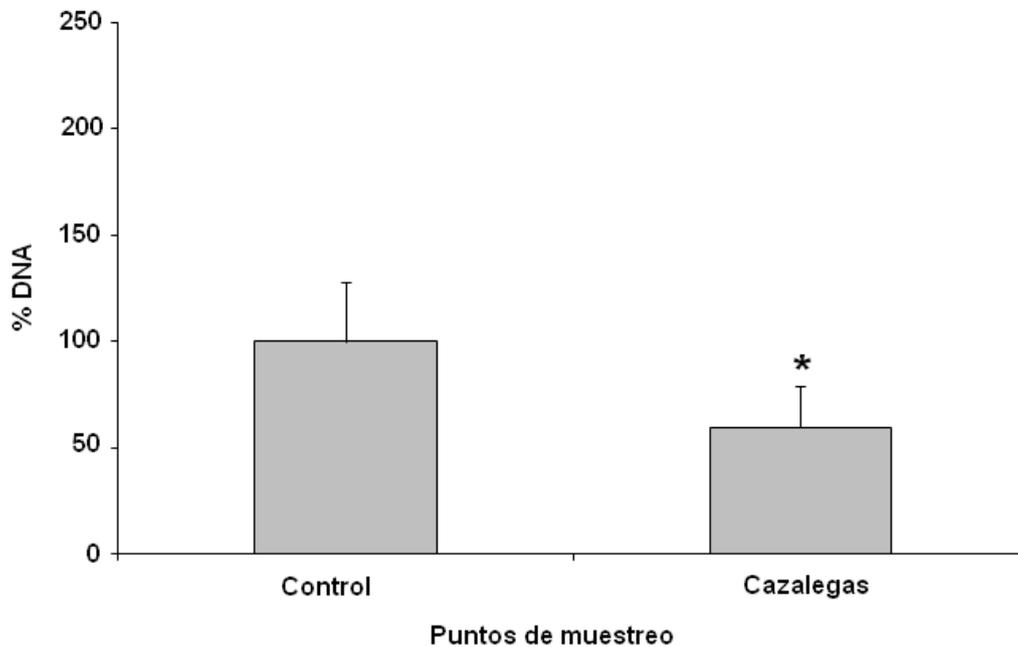
### ***2.1. Bioensayo de toxicidad en plantas***

Tras 24 horas de exposición, el microbioensayo de esporas de helecho revela un aumento hormético significativo en la actividad mitocondrial para las muestras RPS-1 y RSP-5. Sin embargo, para las muestras RSP-2, RSP-3 y RSP-4 se observa una importante toxicidad (Figura 9B). Por otro lado, en las muestras RSP-1, RSP-2 y RSP-5 se observa una fuerte disminución de la cantidad de DNA causada por la toxicidad detectada (Figura 10B). Finalmente, para la muestra tomada en el embalse de Cazalegas los resultados no muestran diferencias significativas en la actividad mitocondrial (Figura 12A), aunque sí que se observa una reducción de la cantidad de DNA (Figura 12B).

### A) ACTIVIDAD MITOCONDRIAL



### B) CUANTIFICACIÓN DNA



**Figura 12. Porcentaje de variación de la actividad mitocondrial (A) y la cantidad de DNA (B) tras 24 horas de exposición de las esporas de *Polystichum setiferum* con respecto al control en las aguas potables del embalse de Cazalegas tomadas en invierno**

El asterisco (\*) indica una diferencia significativa de  $p < 0,05$  con respecto a los controles.

## ***2.2. Bioensayo de toxicidad en animales***

En las muestras de invierno el bioensayo con embriones de pez cebra muestra un incremento significativo de la peroxidación lipídica para todos los puntos de muestreo (Figura 11B).

## ***Estudio 4: Monitorización de disruptores endocrinos y actividad estrogénica en el agua de grifo de la Comunidad de Madrid***

### **1. Disruptores endocrinos en el agua de grifo**

En la Tabla 19 se recogen las concentraciones detectadas, la mediana y el rango de concentración para cada disruptor endocrino en los diferentes puntos de muestreo de agua de grifo. La Figura 13 muestra los diferentes niveles de concentración de cada uno de los compuestos estudiados en cada una de las muestras de aguas de grifo.

Los estrógenos naturales y sintéticos no se detectaron en ninguna de las seis muestras de agua de grifo analizadas. Los antimicrobianos TCS, TCC, el conservante BeP, los alquifenoles monocarboxilados (OP1EC y NP1EC), y los monoetoxilados (OP1EO y NP1EO) tampoco se encontraron en ninguna de las muestras de agua analizadas.

Por el contrario, el conservante EtP se detectó únicamente en la muestra TW6 con una concentración de 0,97 ng/l, mientras que el PrP se encontró en todas las muestras de agua de grifo analizadas a niveles que oscilan entre los 7,1 ng/l (TW4) y los 13,5 ng/l (TW6).

Los alquifenoles NP, OP y NP<sub>2</sub>EO se detectaron en el 100% de las muestras de agua con concentraciones máximas de 11,7 ng/l (TW1), 9,7 ng/l (TW6), y 15 ng/l (TW2), respectivamente. Sin embargo, el OP<sub>2</sub>EO se halló en el 83% de las muestras de agua de grifo con una concentración máxima de 3,9 ng/l en el punto TW1.

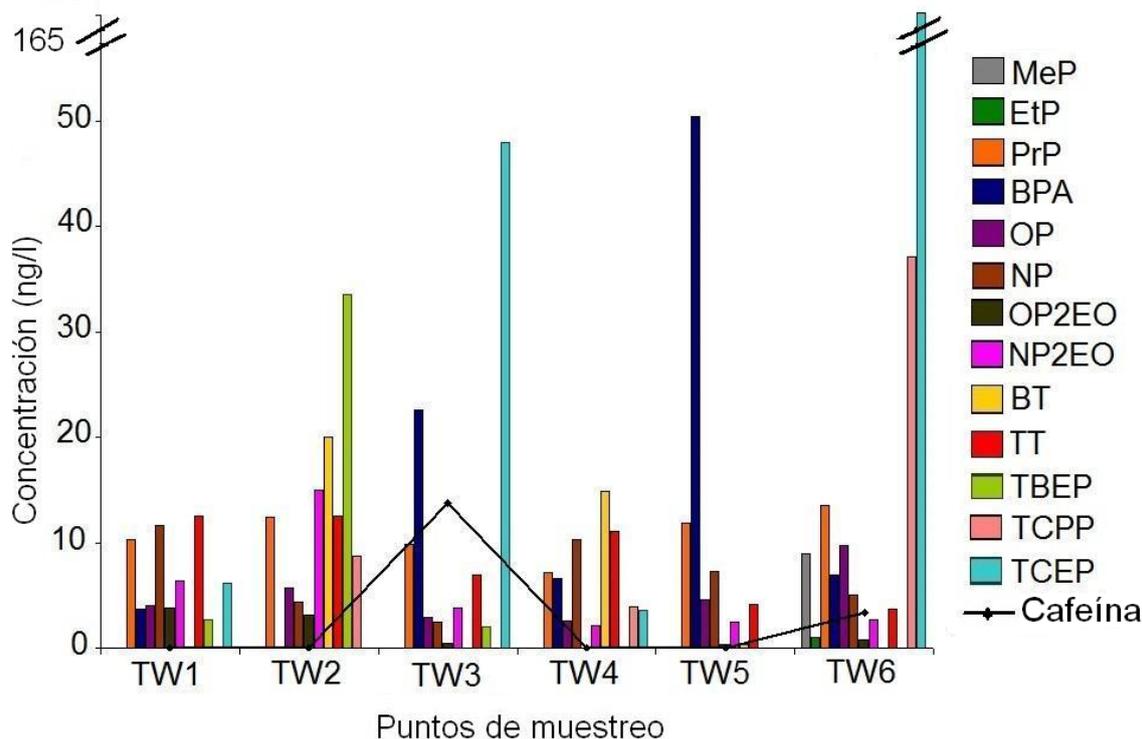
El plastificante BPA se encontró en el 83% de las muestras con concentraciones que varían entre los 3,7 ng/l en el punto TW1 y los 50,3 ng/l en el punto TW5.

Los anticorrosivos BT y TT se hallaron en el 50% y en el 100% de las muestras con niveles de 20 ng/l (TW2) y de 12,5 ng/l (TW1 y TW2), respectivamente.

Finalmente, las concentraciones más altas corresponden al grupo de los retardantes de llama organofosforados. Concretamente, el retardante TCEP alcanza concentraciones de 165,4 ng/l en el punto TW6.

**Tabla 19. Concentraciones, mediana y rango (ng/l) de disruptores endocrinos detectados en las muestras de agua de grifo**

FAMILIA	COMPUESTO	TW1	TW2	TW3	TW4	TW5	TW6	Mediana (ng/l)	Rango (ng/l)
Estrógenos naturales y sintéticos y sus conjugados	Estradiol	<0,037	<0,037	<0,037	<0,037	<0,037	<0,037	-	-
	Estrona	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	-	-
	Estriol 3-sulfato	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	-	-
	Estriol 16-glucoronido	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	-	-
	Estrona 3-glucoronido	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	-	-
	Estradiol 17-glucoronido	<0,46	<0,46	<0,46	<0,46	<0,46	<0,46	-	-
	Estrona 3-sulfato	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	-	-
	Estriol	<0,17	<0,17	<0,17	<0,17	<0,17	<0,17	-	-
	Etinilestradiol	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14	-	-
	Dietilestilbestrol	<0,043	<0,043	<0,043	<0,043	<0,043	<0,043	-	-
Alquilfenoles	Octilfenol	4	5,6	3	2,6	4,6	9,7	4,3	2,6-9,7
	Nonilfenol	11,7	4,3	2,5	10,2	7,3	5	7,3	2,5-20,5
	Octilfenol monoetoxilado	<17	<17	<17	<17	<17	<17	-	-
	Nonilfenol monoetoxilado	<62	<62	<62	<62	<62	<62	-	-
	Octilfenol dietoxilado	3,9	3,1	0,4	<0,01	0,3	0,8	1,9	0,3-3,9
	Nonilfenol dietoxilado	6,3	15	3,8	2,1	2,4	2,6	2,6	2,1-15
	Nonilfenol monocarboxilado	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	-	-
	Octilfenol monocarboxilado	<0,065	<0,065	<0,065	<0,065	<0,065	<0,065	-	-
Conservantes	Metilparabeno	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20	8,9	13,2	8,9-17,5
	Etilparabeno	<0,27	<0,27	<0,27	<0,27	<0,27	0,97	0,97	0,97
	Benzilparabeno	<0,031	<0,031	<0,031	<0,031	<0,031	<0,031	-	-
	Propilparabeno	10,3	12,4	9,9	7,1	11,9	13,5	11,9	7,12-17,2
Antimicrobianos/Desinfectantes	Triclosán	<0,17	<0,17	<0,17	<0,17	<0,17	<0,17	-	-
	Triclorocarban	<0,036	<0,036	<0,036	<0,036	<0,036	<0,036	-	-
Retardantes de llama organofosforados	Tris(cloroisopropil) fosfato	<0,002	8,8	<0,002	3,8	<0,002	37,1	8,8	3,8-37,1
	Tris(2-cloroetil) fosfato	6,1	<0,034	48	3,6	<0,034	165,4	6,1	2-165,4
	Tris(butoxietil) fosfato	2,6	33,5	2	<0,002	<0,002	<0,002	7,3	2-33,5
Anticorrosivos	1H-Benzotriazol	<0,072	20	<0,072	14,8	0,4	<0,072	14,8	0,4-20
	Toliltriazol	12,5	12,5	6,9	11	4,1	3,7	6,9	3,7-12,5
Plastificante	Bisfenol A	3,7	<0,11	22,6	6,6	50,3	6,9	14,8	3,7-50,3
Marcador químico	Cafeína	<0,02	<0,02	13,7	<0,02	<0,02	3,4	13,7	3,4-184,3



**Figura 13. Niveles de concentración de disruptores endocrinos en cada uno de las muestras de aguas de grifo (ng/l)**

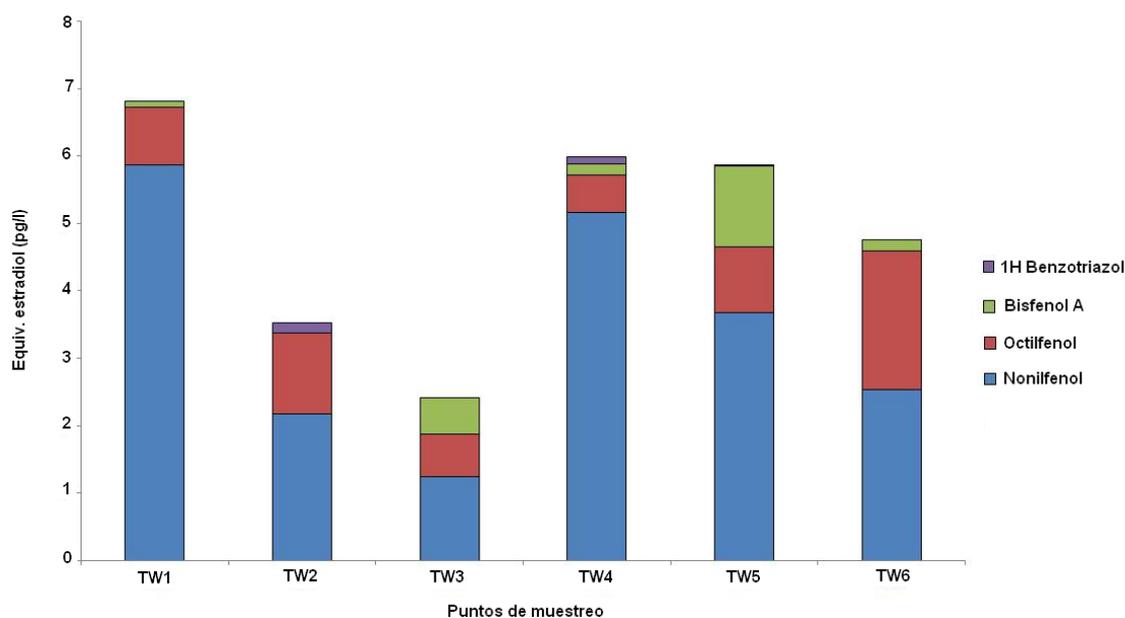
La cafeína se ha representado como una línea en la figura ya que se considera un marcador de contaminación antropogénica y no un alterador hormonal. La cafeína se detectó en el 33% de las muestras con concentraciones de 3,4 ng/l en el punto TW6 y 13,7 ng/l en el punto TW3.

## 2. Diferencias entre puntos de muestreo

Por puntos de muestreo, el más contaminado es el punto TW6 (254,26 ng/l) seguido de los puntos TW2 (115,17 ng/l), TW3 (112,58 ng/l) y TW5 (81,28 ng/l). El agua de grifo del punto TW6 procede de la ETAP de Colmenar de Oreja (594.744 h-e), siendo el retardante de llama organofosforados TCEP (165,4 ng/l) el máximo responsable de la contaminación detectada en dicho punto. El punto TW2 pertenece a la zona de abastecimiento de Retamares (433.627 h-e) siendo el máximo responsable de la contaminación encontrada el TBEP (33,5 ng/l). El punto TW3 forma parte de la zona de abastecimiento de Islas Filipinas (739.708 h-e), y el máximo responsable de la contaminación encontrada en el mismo es también el TCEP (48 ng/l). Finalmente, el punto TW5 corresponde también a la ETAP de Colmenar de Oreja (594.744 h-e) y en él la principal fuente de contaminación es el BPA (50,3 ng/l).

### 3. Estrogenicidad

En la Figura 14 se recogen los niveles acumulados de equivalentes de estradiol (EEQ) para cada uno de los compuestos expresados en pg/l ( $1 \text{ pg/l} = 10^{-3} \text{ ng/l}$ ). La actividad estrogénica se evaluó para los siguientes grupos de disruptores endocrinos: estrógenos naturales y sintéticos y sus conjugados, alquilfenoles, anticorrosivos y BPA.



**Figura 14. Niveles acumulados (pg/l) de equivalentes de  $\beta$ -estradiol (EEQ) para cada compuesto analizado**

El punto de muestreo TW1 es el que presenta mayor actividad estrogénica con un valor de EEQ de 6,8 pg/l, seguido de los puntos TW4 y TW5 con valores de 5,9 y 5,8 pg/l, respectivamente.

Los valores de actividad estrogénica no se corresponden necesariamente con la composición química de las muestras analizadas, ya que no se ha evaluado la estrogenicidad de todos los disruptores endocrinos, y además, la contribución de cada compuesto a la estrogenicidad total no es equivalente. El compuesto que más contribuye a la estrogenicidad detectada en las muestras es el NP con valores desde los 1,2 pg/l en TW3 a los 5,8 pg/l en TW1, seguido del OP, el BPA y el BT.

### 4. Evaluación de riesgos para la salud humana

En la Tabla 20 se recoge la evaluación de riesgos para cada una de las sustancias detectadas en las muestras de aguas de grifo, mientras que en la Tabla 21 se muestra la

caracterización del riesgo para el plastificante BPA, ya que es el único del que se dispone de información sobre dosis de referencia, según la USEPA (2013). Todavía es escaso el conocimiento sobre concentraciones de referencia para la mayoría de las sustancias con capacidad o sospecha de perturbar el sistema endocrino, por lo que no es posible aplicar la metodología de evaluación de riesgos para la mayoría de estos compuestos.

La evaluación de riesgos muestra que la mayor exposición a disruptores endocrinos, tanto en adultos como en niños se corresponde con los puntos TW3, TW5 y TW6.

Por otro lado, la caracterización del riesgo efectuada para el BPA muestra unos *Cocientes de Peligrosidad* para cada una de las muestras de aguas de grifo inferiores a 1 ( $CP < 1$ ).

**Tabla 20. Evaluación del riesgo en las muestras de aguas de grifo**

Punto de muestreo	Compuesto	Concentración (mg/l)	Frecuencia de exposición (días/año)	ADULTOS			NIÑOS		
				Tasa de contacto (l/día)	Peso (kg)	Ingestión (mg/kg · día)	Tasa de contacto (l/día)	Peso (kg)	Ingestión (mg/kg · día)
TW1	OP	$4 \times 10^{-6}$	365	2	70	$1,14 \times 10^{-7}$	1	10	$4 \times 10^{-7}$
TW2		$5,6 \times 10^{-6}$				$1,6 \times 10^{-7}$			$5,6 \times 10^{-7}$
TW3		$3 \times 10^{-6}$				$8,5 \times 10^{-8}$			$3 \times 10^{-7}$
TW4		$2,6 \times 10^{-6}$				$7,4 \times 10^{-8}$			$2,6 \times 10^{-7}$
TW5		$4,6 \times 10^{-6}$				$1,3 \times 10^{-7}$			$4,6 \times 10^{-7}$
TW6		$9,7 \times 10^{-6}$				$2,7 \times 10^{-7}$			$9,7 \times 10^{-7}$
TW1	NP	$11,7 \times 10^{-6}$	365	2	70	$3,3 \times 10^{-7}$	1	10	$1,1 \times 10^{-6}$
TW2		$4,3 \times 10^{-6}$				$1,2 \times 10^{-7}$			$4,3 \times 10^{-7}$
TW3		$2,5 \times 10^{-6}$				$7 \times 10^{-8}$			$2,5 \times 10^{-7}$
TW4		$10,2 \times 10^{-6}$				$2,9 \times 10^{-7}$			$1,02 \times 10^{-6}$
TW5		$7,3 \times 10^{-6}$				$2 \times 10^{-7}$			$7,3 \times 10^{-7}$
TW6		$5 \times 10^{-6}$				$1,4 \times 10^{-7}$			$5 \times 10^{-7}$
TW1	OP <sub>2</sub> EO	$3,9 \times 10^{-6}$	365	2	70	$1,1 \times 10^{-7}$	1	10	$3,9 \times 10^{-7}$
TW2		$3,1 \times 10^{-6}$				$8,8 \times 10^{-8}$			$3,1 \times 10^{-7}$
TW3		$4 \times 10^{-7}$				$1,1 \times 10^{-8}$			$4 \times 10^{-8}$
TW4		ND				-			-
TW5		$3 \times 10^{-7}$				$8,5 \times 10^{-9}$			$3 \times 10^{-8}$
TW6		$8 \times 10^{-7}$				$2,2 \times 10^{-8}$			$8 \times 10^{-8}$
TW1	NP <sub>2</sub> EO	$6,3 \times 10^{-6}$	365	2	70	$1,8 \times 10^{-7}$	1	10	$6,3 \times 10^{-7}$
TW2		$15 \times 10^{-6}$				$4,2 \times 10^{-7}$			$15 \times 10^{-8}$
TW3		$3,8 \times 10^{-6}$				$1,08 \times 10^{-7}$			$3,8 \times 10^{-7}$
TW4		$2,1 \times 10^{-6}$				$6 \times 10^{-8}$			$2,1 \times 10^{-7}$
TW5		$2,4 \times 10^{-6}$				$6,8 \times 10^{-8}$			$2,4 \times 10^{-7}$
TW6		$2,6 \times 10^{-6}$				$7,4 \times 10^{-8}$			$2,6 \times 10^{-7}$
TW1	PrP	$10,3 \times 10^{-6}$	365	2	70	$2,9 \times 10^{-7}$	1	10	$10,3 \times 10^{-7}$
TW2		$12,4 \times 10^{-6}$				$3,5 \times 10^{-7}$			$12,4 \times 10^{-7}$
TW3		$9,9 \times 10^{-6}$				$2,8 \times 10^{-7}$			$9,9 \times 10^{-7}$
TW4		$7,1 \times 10^{-6}$				$2,02 \times 10^{-7}$			$7,1 \times 10^{-7}$
TW5		$11,9 \times 10^{-6}$				$3,4 \times 10^{-7}$			$11,9 \times 10^{-7}$
TW6		$13,5 \times 10^{-6}$				$3,8 \times 10^{-7}$			$13,5 \times 10^{-7}$
TW1	MeP	ND	365	2	70	-	1	10	-
TW2		ND				-			-
TW3		ND				-			-
TW4		ND				-			-
TW5		ND				-			-
TW6		$8,9 \times 10^{-6}$				$2,5 \times 10^{-7}$			$8,9 \times 10^{-7}$
TW1	TCEP	$6,1 \times 10^{-6}$	365	2	70	$1,7 \times 10^{-7}$	1	10	$6,1 \times 10^{-7}$
TW2		ND				-			-
TW3		$48 \times 10^{-6}$				$1,3 \times 10^{-6}$			$48 \times 10^{-7}$
TW4		$3,6 \times 10^{-6}$				$1,02 \times 10^{-7}$			$3,6 \times 10^{-7}$
TW5		ND				-			-
TW6		$165,4 \times 10^{-6}$				$4,7 \times 10^{-6}$			$165,4 \times 10^{-7}$
TW1	TT	$12,5 \times 10^{-6}$	365	2	70	$3,5 \times 10^{-7}$	1	10	$12,5 \times 10^{-7}$
TW2		$12,5 \times 10^{-6}$				$3,5 \times 10^{-7}$			$12,5 \times 10^{-7}$
TW3		$6,9 \times 10^{-6}$				$1,9 \times 10^{-7}$			$6,9 \times 10^{-7}$
TW4		$11 \times 10^{-6}$				$3,1 \times 10^{-7}$			$11 \times 10^{-7}$
TW5		$4,1 \times 10^{-6}$				$1,1 \times 10^{-7}$			$4,1 \times 10^{-7}$
TW6		$3,7 \times 10^{-6}$				$1,05 \times 10^{-7}$			$3,7 \times 10^{-7}$
TW1	BPA	$3,7 \times 10^{-6}$	365	2	70	$1,05 \times 10^{-7}$	1	10	$3,7 \times 10^{-7}$
TW2		ND				-			-
TW3		$22,6 \times 10^{-6}$				$6,4 \times 10^{-7}$			$22,6 \times 10^{-7}$
TW4		$6,6 \times 10^{-6}$				$1,8 \times 10^{-7}$			$6,6 \times 10^{-7}$
TW5		$50,3 \times 10^{-6}$				$14,3 \times 10^{-7}$			$50,3 \times 10^{-7}$
TW6		$6,9 \times 10^{-6}$				$1,9 \times 10^{-7}$			$6,9 \times 10^{-7}$

**Tabla 21. Caracterización del riesgo en las muestras de aguas de grifo**

Puntos de muestreo	Compuesto	DfR (mg/kg · día)	ADULTOS	NIÑOS
			Cociente de Peligrosidad	Cociente de Peligrosidad
TW1	BPA	0,05	$2,11 \times 10^{-6}$	$7,4 \times 10^{-6}$
TW2			-	-
TW3			$1,29 \times 10^{-5}$	$4,52 \times 10^{-5}$
TW4			$3,77 \times 10^{-6}$	$1,32 \times 10^{-5}$
TW5			$2,87 \times 10^{-5}$	$10,06 \times 10^{-5}$
TW6			$3,94 \times 10^{-6}$	$1,38 \times 10^{-5}$



## DISCUSIÓN

### ***Estudio 1: Residuos farmacéuticos psicoactivos en las cuencas de Galicia***

Hoy en día está bien documentada la contribución de las EDARs en la descarga de fármacos en el medio ambiente acuático a través de los efluentes de aguas residuales (Kolpin et al. 2002, Gros et al. 2007, Kuster et al. 2008, Miege et al. 2009, Zhou et al. 2010a). Este estudio demuestra la presencia de fármacos psicoactivos en las aguas residuales, fluviales y de grifo de Galicia.

En todas las muestras de agua analizadas, las mayores concentraciones detectadas corresponden al grupo terapéutico de los ansiolíticos y al antidepresivo venlafaxina. En particular, el ansiolítico lorazepam se encontró a elevadas concentraciones en las muestras tomadas a la salida de la EDAR, en las aguas fluviales y en las de grifo. La detección medioambiental del antidepresivo venlafaxina y del grupo de los ansiolíticos no ha sido ampliamente estudiada, aportando este trabajo una información casi inexistente sobre estos compuestos.

#### **1. Aguas residuales y aguas fluviales**

Gros et al. (2010) indican que la presencia de fármacos a la salida de las EDARs puede deberse a una baja tendencia de absorción al fango activado o bien a que la degradación microbiana de los mismos no es lo suficientemente rápida como para completarse en el tiempo de retención hidráulica de la planta de tratamiento. Esto es lo que podría estar ocurriendo en el caso de los antidepresivos citalopram y venlafaxina los cuáles han sido detectados en este estudio a niveles de concentración superiores al resto de antidepresivos analizados tanto en a la salida de la EDAR como en aguas fluviales. Además, cabe añadir que estos fármacos se encuentran entre los medicamentos más comúnmente prescritos. La concentración media de venlafaxina detectada en las muestras recogidas a la salida de la EDAR fue relativamente similar a la informada en otros estudios. Martínez-Bueno et al. (2010) obtuvieron concentraciones de venlafaxina entre 1-195 ng/l y concentraciones de citalopram entre 4-19 ng/l en aguas fluviales españolas. Sin embargo, el estudio de Valcárcel et al. (2011a) detectó en las aguas de los principales ríos de Madrid (Jarama, Manzanares, Guadarrama, Henares y Tajo)

concentraciones medias de venlafaxina (395,5 ng/l) similares a las de este estudio, y de citalopram (54 ng/l) inferiores al mismo.

En cuanto al antiepiléptico carbamazepina las concentraciones detectadas en el estudio son muy inferiores a las encontradas en otros estudios alemanes tanto aguas residuales a su salida de la EDAR (2,1 µg/l) como en aguas fluviales (0,25 µg/l) (Ternes 1998). Los diferentes niveles de concentración detectados podrían relacionarse con la estimación de recetas anuales de este medicamento, que en España es de 20,0 ton/año y en Alemania es de 80 ton/año (Ternes 1998, Daughton 2011). En otros trabajos realizados en España, las concentraciones de carbamazepina son diferentes en función de las áreas geográficas de estudio. En los estudios de González et al. (2010) y Valcárcel et al. (2011a), realizados en aguas fluviales de la Comunidad de Madrid, las concentraciones de carbamazepina fueron superiores (82 ng/l y 455,5 ng/l, respectivamente) a las de este estudio probablemente debido a la alta densidad de población de Madrid. Sin embargo, las concentraciones detectadas en este estudio se encuentran dentro del rango de las concentraciones detectadas (22-2340 ng/l) en el estudio de Carballa et al. (2008b) realizado también en aguas fluviales de Galicia.

Por otro lado, la investigación sobre presencia medioambiental de ansiolíticos es todavía limitada, aunque hay algunos estudios sobre presencia de nordiazepam, oxazepam, alprazolam y lorazepam en el agua fluvial como los de Rabiet et al. (2006), Carballa et al. (2008b) y Daughton (2011). El lorazepam es un potente sedante, agente hipnótico y ansiolítico perteneciente al grupo de las benzodiazepinas (Elliott 1976). En este estudio el lorazepam se encontró tanto en aguas residuales como fluviales a concentraciones más altas que las registradas en otros trabajos. Concretamente, Coetsier et al. (2009) detectaron niveles de lorazepam de hasta 200 ng/l en las aguas residuales a la salida de la EDAR que descarga en el río Gardon (Francia), frente a los 689 ng/l hallados en este estudio. Lo mismo ocurre con las concentraciones de lorazepam halladas en las aguas fluviales de este estudio, las cuales son más elevadas a las registradas en el estudio de Gros et al. (2010) (40 ng/l).

Cabe destacar un fenómeno importante, conocido como desconjugación, que se puede estar produciendo en las EDARs estudiadas a la vista de los resultados del análisis de las muestras. En algunas de ellas, el incremento de fármacos encontrado a la salida de la depuradora con respecto a la entrada a la misma puede ser debido a la

conversión de los glucurónidos y otros metabolitos conjugados en sus compuestos parentales por procesos enzimáticos y químicos que pueden tener lugar en las plantas de tratamiento de aguas residuales (Vieno et al. 2007). De hecho, varias investigaciones observaron que las concentraciones de compuestos parentales encontrados en el agua de salida de las EDARs eran considerablemente mayores que las concentraciones de las formas conjugadas (Ternes 1998, Calisto and Esteves 2009).

## 2. Aguas de grifo

La presencia de lorazepam en las muestras de agua de grifo no ha sido estudiada en otros trabajos. Las elevadas concentraciones detectadas en algunas de las muestras indican que con toda probabilidad el lorazepam no es eliminado por los tratamientos avanzados de agua potable. Los ansiolíticos son uno de los grupos terapéuticos más frecuentemente recetado en todo el mundo, particularmente en los países occidentales. Estos fármacos suelen ser consumidos principalmente por mujeres y personas de edad avanzada. Sin embargo, también pueden ser objeto de usos ilícitos por parte de la población debido a sus propiedades (hipnótico, sedativo, amnésico, antiepiléptico y relajante muscular) (Daughton 2011) y también se utilizan habitualmente en tratamiento veterinarios (Calisto and Esteves 2009). En especial, el grupo de las benzodiazepinas se utilizan en ganadería, un sector importante en la economía gallega, y por tanto, debe considerarse esta posible fuente de contaminación. Sería interesante llevar a cabo un estudio más exhaustivo que permita confirmar la elevada presencia de lorazepam en el agua potable analizada, centrándonos en sus fuentes, y realizando una vigilancia continuada.

Varios estudios han demostrado que la probabilidad de sufrir una intoxicación aguda por la presencia de bajas concentraciones de fármacos en el agua potable son bajas (Jones et al. 2005, Valcárcel et al. 2011b). Sin embargo, poco se conoce sobre los posibles efectos de exposiciones prolongadas a bajas concentraciones de productos farmacéuticos y sus mezclas, tal como asegura la OMS en su informe sobre “*Productos farmacéuticos en el agua potable*” (OMS 2013) (*Más información: Introducción. Riesgos para la salud*). Algunos autores sugieren que aunque las consecuencias para los adultos podrían ser insignificantes, en población susceptible o vulnerable, como embarazadas, niños, pacientes inmunodeprimidos o ancianos los efectos podrían ser más importantes debido a su menor capacidad para eliminar los compuestos tóxicos del

cuerpo por la inmadurez de su sistema inmunitario, como es el caso de los niños. Además, en condiciones particulares como alergias a determinados compuestos o en etapas vulnerables de la vida como durante el embarazo los posibles efectos podrían ser más importantes (Jones et al. 2005, Collier 2007, González Alonso et al. 2012). Sin embargo, estas afirmaciones todavía no han podido probarse ya que no existen suficientes estudios de exposición a fármacos a partir del agua de grifo.

Los resultados obtenidos en este estudio son representativos de las cuencas de la Comunidad Autónoma de Galicia pero pueden no ser extrapolables a las aguas fluviales y de grifo de otras regiones. Otra limitación del estudio son las mediciones puntuales realizadas. Para poder conocer las concentraciones reales a las que está expuesta la población gallega habría que realizar un sistema de vigilancia continuado y compuesto durante un tiempo determinado, involucrando para ello a las autoridades competentes. Asimismo, la implantación de un sistema de descontaminación adecuado en el caso de que las concentraciones puedan suponer riesgo para la población. Realmente la información es escasa, por lo que hay que seguir trabajando desde la cautela, y monitorizar estos contaminantes para poder establecer conclusiones definitivas. Finalmente es importante resaltar que el diseño de esta investigación no permite la evaluación de riesgos potenciales para la salud pública, aspecto que será el punto de partida de las futuras investigaciones del grupo de investigación al que pertenezco.

### **3. Conclusión**

Este estudio demuestra la presencia de fármacos psicoactivos en las cuencas de la Comunidad Autónoma de Galicia y muestra la conversión de los metabolitos a sus compuestos parentales en las EDARs. Concretamente se demuestra la presencia de elevadas concentraciones del ansiolítico lorazepam en las aguas fluviales analizadas y en el agua potable de las diferentes ciudades estudiadas. La presencia de lorazepam en las aguas de grifo debe tomarse con especial cautela, ya que hay algunos estudios que asocian su uso con algunos riesgos (dependencia, amnesia, psicosis, depresión, fallo renal, etc.) que podrían ser más pronunciados en determinados grupos de población, a pesar de ello, las concentraciones obtenidas no suponen un riesgo de intoxicación aguda para la población, aunque los efectos a largo plazo de dichas concentraciones todavía se desconocen. Asimismo, destaca la necesidad de incrementar la monitorización medioambiental de las cuencas españolas y de mejorar los procesos de tratamiento de

aguas residuales y potables con el fin de disminuir la presencia de estas sustancias, e involucrar a la población en el uso y eliminación responsable de los medicamentos. Igualmente importante sería trasladar estos estudios a las sociedades médicas, ya que son los que finalmente prescriben los medicamentos, con el fin de que entre todos se haga uso de aquellos medicamentos menos contaminantes, y menos tóxicos para el medio ambiente.

## ***Estudio 2: Análisis y presencia de disruptores endocrinos y actividad estrogénica en las aguas superficiales del centro de España***

### **1. Estrógenos naturales y sintéticos y sus conjugados**

Los estrógenos E1, E2, E3 son hormonas sexuales naturales mientras que el EE2 es un estrógeno sintético y el DES es un estrógeno artificial (carece de la estructura tetracíclica de las hormonas naturales, pero su comportamiento simula a los estrógenos naturales). Los estrógenos naturales y sintéticos alcanzan el medio ambiente acuático a través de las descargas de aguas residuales urbanas e industriales. Las formas conjugadas (sulfatos y glucurónidos) en las cuáles suelen excretarse los estrógenos, pueden sufrir el proceso de desconjugación, observado para los fármacos del Estudio 1, durante el tratamiento de las aguas residuales volviendo a sus compuestos parentales (Petrovic et al. 2004). Los más monitorizados en estudios nacionales e internacionales son la hormona natural E2 y el estrógeno sintético EE2 debido a su elevada potencia estrogénica. Sin embargo, ambos compuestos son frecuentemente los menos detectados en las aguas, mientras que el E3, E1 y los principales metabolitos del estradiol suelen ser los más frecuentes (Petrovic et al. 2004).

Las concentraciones de E1 y sus metabolitos encontradas en este estudio son más altas que las encontradas en el río Llobregat en los estudios de Brix et al. (2010) y López-Roldán et al. (2010) (E1: 4,41-5,81 ng/l y E1-3S: 0,44-1,46 ng/l) pero más bajas que las encontradas por Pelayo et al. (2011) en el mismo río (concentraciones de 560 ng/l). Fuera de España, las concentraciones de E1 oscilan entre 15,6-79 ng/l en ríos de China (Zhao et al. 2009, Wang et al. 2011, Wang et al. 2012) y 3,71 ng/l en ríos de Estados Unidos (Wang et al. 2012).

### **2. Conservantes (parabenos)**

Los parabenos se utilizan frecuentemente como conservantes de un gran número de productos cosméticos y de higiene personal (champú, desodorantes, cremas para el cuidado de la piel y pasta de dientes), normalmente en forma de mezclas. El MeP y el PrP son los que más se utilizan en estos productos de consumo. Aunque ambos son biodegradables en condiciones aerobias, su elevado consumo y su continua introducción

en el medio ambiente hace que estén presentes de forma continua en los ecosistemas (Jonkers et al. 2010).

En España, el estudio realizado por Blanco et al. (2009) en ríos del Noroeste de la Península (Galicia) encontró bajas concentraciones de los parabenos MeP y BeP (37 ng/l y < LC, respectivamente). Sin embargo, no se detectaron en dicho estudio los parabenos PrP y EtP. En Europa, las investigaciones sobre presencia de parabenos en las aguas todavía son escasas. En ríos de Portugal Jonkers et al. (2010) encontraron el parabeno PrP a concentraciones (64 ng/l) más altas que las de este estudio. En ríos del Reino Unido (Kasprzyk-Hordern et al. 2008), las concentraciones de PrP fueron inferiores a las de nuestro estudio mientras que el EtP se encontró en similares concentraciones. Además, el estudio de Kasprzyk-Hordern et al. (2008) detectó concentraciones de MeP por encima de 150 ng/l.

### **3. Antimicrobianos/desinfectantes (triclosán y triclocarban)**

El TCS es un agente antimicrobiano de amplio espectro y un conservante utilizado en productos de cuidado personal (jabones, desodorantes, cremas y pasta de dientes). Por ello, la presencia de estos compuestos en las aguas indica contaminación por aguas residuales urbanas en los dos ríos estudiados (Jarama y Manzanares).

En otros estudios españoles, el TCS se encontró a concentraciones más bajas que las de este estudio. Por ejemplo, en los ríos Llobregat (Kuster et al. 2010) y Mero (Noroeste de España) (Rodil et al. 2012), las concentraciones detectadas fueron de 45 y 57 ng/l, respectivamente. En otros ríos españoles las concentraciones registradas fueron de hasta 700 ng/l (Montes et al. 2009). En los ríos europeos, como por ejemplo, los ríos Taff y Ely (Reino Unido), el TCS se encontró a concentraciones de 95 ng/l (Kasprzyk-Hordern et al. 2008), mientras que en Estados Unidos fueron muy superiores (2300 ng/l) (Kolpin et al. 2002).

### **4. Plastificante (bisfenol A)**

El BPA se utiliza como materia prima en la producción de muchos plásticos policarbonados utilizados en conservas de alimentos. Asimismo, se utiliza en la síntesis de las resinas epoxi, retardantes de llama, antioxidantes y como aditivo en papel térmico y en revestimientos de papel (Voutsas et al. 2006). La presencia de este

compuesto en el medio ambiente acuático se debe fundamentalmente a la descarga de aguas industriales procedentes de industrias de fabricación de plásticos.

En otros estudios españoles se han encontrado concentraciones similares a las de este trabajo. Este es el caso del estudio de Ballesteros-Gómez et al. (2007) en el río Guadalquivir y sus afluentes con valores medios de 100 ng/l. Sin embargo, en el río Llobregat las concentraciones detectadas fueron superiores a las obtenidas en este estudio (2970 ng/l) (Céspedes et al. 2005). Otros estudios internacionales, como el de Voutsas et al. (2006) en el río Glatt (Suiza), el de Kasprzyk-Hordern et al. (2008) en los ríos Taff y Ely, y el de Wang et al. (2012) en el río Mississippi, encontraron niveles de concentración de BPA más bajos que los de nuestro estudio.

## **5. Alquilfenoles (nonilfenol y octilfenol)**

Los alquilfenoles (NP y OP) son tensioactivos no-iónicos que se utilizan habitualmente en la producción de pinturas, tejidos y papel, así como en detergentes, emulsionantes para pesticidas, agentes humectantes, dispersantes y solubilizantes (Voutsas et al. 2006). Su degradación en condiciones anaerobias da lugar a productos intermedios, entre los que se incluyen el NP<sub>2</sub>EO y NP<sub>1</sub>EO y el OP<sub>2</sub>EO y OP<sub>1</sub>EO. Estos compuestos a su vez pueden oxidarse en condiciones aerobias formando los alquilfenoles carboxilados (NP<sub>2</sub>EC, NP<sub>1</sub>EC, OP<sub>1</sub>EC). La presencia de estos compuestos en el medio ambiente acuático se debe principalmente a la descarga de aguas residuales de origen urbano e industrial.

Las concentraciones de NP y OP halladas en nuestro estudio son similares a las encontradas en otros estudios españoles. En el trabajo de Céspedes et al. (2006) llevado a cabo en el río Ter (Noroeste de España), el NP y OP se encontraron a concentraciones de 1320 y 520 ng/l, respectivamente. Sin embargo, la contaminación por NP en el río Llobregat alcanzó hasta los 6200 ng/l en el estudio de Pelayo et al. (2011), mientras que el estudio de Brix et al. (2010) en el mismo río reveló una concentración máxima de NP de 530 ng/l. Los niveles de OP encontrados en el río Llobregat son superiores a los hallados en nuestro estudio (880 ng/l). En estudios europeos e internacionales las concentraciones NP y OP son similares, aunque la contaminación por NP es algo más baja (en torno a 700 ng/l) en ríos alemanes (Sur de Frankfurt) (Quednow and Puttmann 2009).

En relación con los metabolitos analizados en este estudio, cabe destacar que en el río Llobregat la concentración de NP<sub>1</sub>EC encontrada fue dos veces más alta que la de nuestro estudio (6110 ng/l) (Brix et al. 2010), mientras que las concentraciones de NP<sub>2</sub>EO en el mismo río varían entre los 270 ng/l detectados por Brix et al. (2010) y los 1600 ng/l encontrados por Pelayo et al. (2011).

Por otro lado, cabe recordar que los alquilfenoles NP y OP son sustancias peligrosas que forman parte de la **lista de sustancias prioritarias** establecida en el ámbito de la política de aguas a través de la *Decisión n° 2455/2001/CE*. En este sentido, las concentraciones de NP detectadas en todas las muestras analizadas en el estudio son más bajas que la **concentración máxima admisible (NCA-CMA)** de 2000 ng/l establecida para dicha sustancia en el agua superficial a través de la *Directiva 2008/105/CE, relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas* (Tabla 1). A pesar de ello, es necesario continuar investigando y establecer un sistema de monitorización de este tipo de compuestos, ya que la concentración máxima de NP hallada en el punto RSP-6 del muestreo efectuado el domingo (1637 ng/l) se encuentra próxima a la NCA-CMA establecida en la Directiva. En cuanto al OP, la Directiva establece que el valor de NCA-CMA “**no es aplicable**”, proporcionando un **valor de concentración medio anual (NCA-MA)** de 100 ng/l. Así la normativa considera que el valor NCA-MA es suficiente para proteger contra los picos de contaminación a corto plazo en el caso de vertidos continuos, ya que éstos son significativamente inferiores a los valores calculados sobre la base de la toxicidad aguda. Sin embargo, en este estudio no se dispone de suficientes datos como para calcular una concentración media en el tiempo, aunque los resultados preliminares de este estudio muestran la necesidad de monitorizar las aguas de ambos ríos. Con el fin de poder determinar concentraciones medias anuales de estas sustancias en los ríos de la Comunidad Autónoma de Madrid, y poder así, compararlas con los valores de NCA-MA establecidos en la Directiva, es necesario llevar a cabo investigaciones que permitan una vigilancia continuada de las mismas.

## **6. Retardantes de llama organofosforados**

Los compuestos organofosforados TBEP, TCPP y TCEP se utilizan como retardantes de llama en cloruro de polivinilo (PVC) y en cojines de espuma, plásticos, tejidos, pinturas industriales y adhesivos (Jackson and Sutton 2008).

Son escasos los estudios sobre presencia de retardantes de llama organofosforados en las aguas superficiales españolas. Rodil et al. (2012) informaron recientemente sobre la presencia de bajas concentraciones de TCPP y TCEP (47 y 5 ng/l, respectivamente) en ríos de Galicia, con respecto a las registradas en este estudio. En investigaciones europeas, como la realizada por Quednow and Puttmann (2009) en diferentes ríos alemanes se hallaron concentraciones máximas de TCEP de 464 a 2019 ng/l. En ríos de Estados Unidos, Benotti et al. (2009) detectaron concentraciones de 530 ng/l de TCEP y de 720 ng/l de TCPP. Estudios recientes como el de Matamoros et al. (2012) en Dinamarca halló concentraciones de TCEP similares a las de nuestro estudio (80 ng/l).

Las bajas concentraciones de TCEP detectadas en este trabajo podrían deberse a la adherencia de España a las recomendaciones realizadas en 1990 por los Productores Europeos de Isocianato (ISOPA) sobre el reemplazamiento de este compuesto en los procesos industriales (Quednow and Puttmann 2009). Sin embargo, la presencia de este compuesto en todas las muestras evidencia un escaso seguimiento de dichas recomendaciones y su todavía uso como retardante de llama en muchos productos de consumo.

## **7. Anticorrosivos (benzotriazol y tolitriazol)**

El BT y el TT son compuestos ampliamente utilizados como agentes anticorrosivos en los productos de limpieza para lavavajillas y como intermediarios en colorantes, fármacos y fungicidas. El BT se utiliza además en la industria de neumáticos, como fungicida en la producción de cuero y papel, y como líquido de deshielo en aeronaves.

Céspedes et al. (2006) encontraron en el río Ter niveles de BT similares a las de este estudio, con una concentración máxima de 1120 ng/l. Salvo el estudio de Céspedes la investigación en España de este grupo de compuestos es muy limitada. En Europa, Voutsas et al. (2006) analizaron ambos compuestos en el río Glatt y encontró concentraciones de BT de hasta 3690 ng/l. Sin embargo, el TT se detectó a concentraciones más bajas (6280 ng/l) que las de nuestro estudio. Otras investigaciones en ríos alemanes, como por ejemplo la de Kiss and Fries (2009) hallaron niveles del mismo orden de magnitud (1474 ng/l).

## **8. Contribución de cada compuesto analizado a la contaminación detectada**

La contaminación por disruptores endocrinos encontrada en el río Jarama fue mayor a la registrada en el río Manzanares. Además, la concentración total encontrada en el muestreo efectuado el jueves es relativamente mayor a la detectada en el muestreo del domingo. Esto puede ser debido a que los jueves el funcionamiento de las instalaciones industriales es a pleno rendimiento y las descargas de aguas residuales pueden ser mayores que las efectuadas los domingos.

En cuanto a las diferencias encontradas entre puntos de muestreo es importante comentar la posible relación con la ubicación de cada uno de ellos. El punto RSP-2, con la mayor contaminación por disruptores endocrinos en el muestreo efectuado el jueves, se sitúa aguas abajo de los efluentes descargados por la EDAR de Rejas (río Jarama) con una población equivalente de 500.000 h-e. El punto RSP-3, con la mayor contaminación en el muestreo del domingo, se sitúa aguas abajo de la descarga de los efluentes procedentes de la EDAR de Valdebebas con una población equivalente de 200.000 h-e. Tanto el punto RSP-2 como el RSP-3 se sitúan en dos de las áreas con mayor crecimiento de los últimos años. Por tanto, la contaminación encontrada en estos puntos puede ser debida a la utilización de estos compuestos en multitud de actividades domésticas, en especial los conservantes y antimicrobianos (utilizados como productos de cuidado personal), y los compuestos alquilfenoles (usados como detergentes). De hecho, en el punto RSP-3 se observa la mayor concentración del marcador químico cafeína, lo cuál puede indicar que la elevada contaminación registrada en este punto sea fundamentalmente de origen urbano.

Otros disruptores endocrinos como los anticorrosivos, se utilizan en la producción de metales y en diversos procesos industriales. Lo mismo ocurre con los alquilfenoles, los retardantes de llama organofosforados, antimicrobianos y conservantes utilizados en la industria química. En este sentido, las industrias manufactureras, en especial la industria química, es relativamente importante en las regiones de los alrededores de los puntos de muestreo RSP-2 y RSP-3 (Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes, PRTR España). Por tanto, la actividad industrial en estas zonas podría ser la responsable de parte de la contaminación encontrada en dichos puntos. Sin embargo, la actividad industrial en la Comunidad de Madrid es menor que en otras

comunidades autónomas de España (p.ej. alrededor de Barcelona). Otras localizaciones (RSP-1, RSP-5, RSP-6 y RSP-7) con elevados niveles de contaminación se localizan a lo largo del río Manzanares a su paso por el área metropolitana de la ciudad de Madrid recibiendo las aguas residuales procedentes de la ciudad.

## **9. Estrogenicidad**

Para poder evaluar la relevancia de las concentraciones detectadas en las muestras de agua superficial para los organismos acuáticos no es suficiente con examinar los niveles de las sustancias encontradas en las mismas, sino que es igualmente importante tener en cuenta los posibles efectos de las mezclas y la persistencia de los compuestos estrogénicamente activos. Por esta razón, resulta esencial estimar la actividad estrogénica total de las muestras de agua, y de los compuestos detectados en las mismas, con el fin de evaluar la calidad de dichas aguas.

Los valores de estrogenicidad encontrados en las muestras analizadas son más bajos que los informados en otros estudios internacionales y españoles (Céspedes et al. 2004, Yang et al. 2011, Wang et al. 2012). Cabe destacar que las estimaciones de actividad estrogénica obtenidas en este estudio no necesariamente se corresponden con la composición química de las muestras analizadas, ya que no se estimó la actividad estrogénica de todos los compuestos detectados en las muestras, y por otra parte, la contribución de cada compuesto a la actividad estrogénica total no es equivalente.

A pesar de la contaminación estrogénica encontrada en los ríos estudiados, ninguna de las muestras tomadas en ambos excedió un nivel de equivalente de estradiol de 1 ng/l con efectos estrogénicos para los ecosistemas acuáticos (López-Roldán et al. 2010). Por tanto, las aguas de estos ríos no representan, en principio, ningún potencial riesgo estrogénico para el medio acuático. Sin embargo, dadas las elevadas concentraciones de estas sustancias detectadas en ambos ríos es necesario realizar más estudios al respecto.

De los estrógenos naturales y sintéticos y sus conjugados estudiados en este trabajo, los que presentan mayor potencia estrogénica son el E2, EE2 y el DES. Sin embargo, ninguno de ellos se encontró a concentraciones detectables en las muestras de agua analizadas. Por el contrario, el E1 resultó ser el responsable de parte de la estrogenicidad encontrada en las muestras de los puntos RSP1 y RSP6. Por otro lado, dentro del grupo de los alquilfenoles el OP y, especialmente el NP, debido a su elevada

concentración, contribuyeron significativamente a la actividad estrogénica detectada en todas las muestras analizadas. Sin embargo, de acuerdo con Brix et al. (2010), no debe pasarse por alto la contribución a la contaminación estrogénica de los alquilfenoles etoxilados y carboxilados. La actividad estrogénica de los alquilfenoles ya se observó en otros estudios llevados a cabo en el río Llobregat (Céspedes et al. 2005, Brix et al. 2010) y en ríos de Portugal y China (Céspedes et al. 2004, Wang et al. 2012).

Para futuras investigaciones sería importante poder añadir la estrogenicidad aportada por otros compuestos, como los retardantes de llama organofosforados, ya que en este estudio han sido encontrados a elevadas concentraciones en ambos ríos.

## **10. Conclusión**

Este estudio es el primero que analiza un número tan elevado de compuestos con actividad disruptora endocrina, así como otros compuestos emergentes o sospechosos de actividad estrogénica, en las aguas superficiales de la Comunidad Autónoma de Madrid. La presencia de estos contaminantes en las aguas de los dos ríos estudiados corrobora la necesidad de mantener e incrementar la vigilancia y control medioambiental en las cuencas españolas. Asimismo, merecen una atención especial los retardantes de llama organofosforados, los alquilfenoles y los anticorrosivos ya que son los compuestos detectados con las mayores concentraciones.

El potencial riesgo estrogénico para los ecosistemas acuáticos es bajo en ambos ríos, aunque los retardantes de llama organofosforados podrían incrementar dicho riesgo ya que se encontraron a elevadas concentraciones en todas las muestras de agua analizadas. No obstante, en este estudio no se ha podido calcular la estrogenicidad de estos compuestos debido a la falta de información sobre actividad estrogénica de los mismos. Es importante que en futuras investigaciones los retardantes de llama organofosforados puedan incluirse en el cálculo de la estrogenicidad total de las muestras. A la luz de las concentraciones detectadas en ambos ríos, es necesario diseñar en posteriores estudios muestreos más representativos y continuos, a lo largo de los diferentes días de la semana, con el fin de poder observar variaciones en las concentraciones de estos compuestos y posibles incrementos en la actividad estrogénica de los mismos.

### ***Estudio 3: Sensibilidad a la microcontaminación del agua fluvial de nuevos bioensayos basados en biomarcados***

#### **1. Bioensayo de toxicidad en plantas**

##### ***1.1. Actividad mitocondrial***

El incremento en la actividad mitocondrial de las esporas registrado en las muestras RSP-2 y RSP-3 tomadas durante el verano y en las muestras RSP-1 y RSP-5 tomadas en invierno puede ser debido a un fenómeno, documentado en varios estudios, conocido como hormesis. En este fenómeno, niveles moderados de compuestos tóxicos inducen una respuesta compensatoria en los individuos, que favorece la activación de mecanismos de defensa y reparación (Calabrese 2008) y cuyo efecto ha sido muy estudiado en plantas (Calabrese and Blain 2009). Los efectos horméticos detectados en la actividad mitocondrial han sido casi siempre considerados como ausencia de toxicidad para las células, sin embargo, estos mecanismos compensatorios pueden agotar los recursos de los organismos y comprometer su capacidad para hacer frente al estrés natural abiótico o biótico (Feito et al. 2012, Feito et al. 2013). Por tanto, es posible que los efectos horméticos en la actividad mitocondrial de las esporas de helecho puedan estar enmascarando letalidad y otros efectos adversos. Es por ello, que la cantidad de DNA puede ayudar a desenmascarar los incrementos observados en la actividad mitocondrial ya que tiene una elevada sensibilidad y relevancia biológica.

Por otro lado, la disminución observada en la actividad mitocondrial de las esporas para la muestra RSP-5 tomada en verano implica toxicidad severa. La mitocondria es la principal fuente de energía en las células eucariotas y cualquier daño tóxico a este orgánulo podría afectar a todo el organismo (Catalá et al. 2010a, Catalá et al. 2010b). La actividad mitocondrial puede verse directamente inhibida por sustancias que reaccionan con los citocromos de los complejos de respiración (por ejemplo, el cianuro) o que alteran la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna (por ejemplo, peroxidación lipídica). Sin embargo, el daño tóxico a otros sistemas celulares que evitan el transporte en la mitocondria de sustratos, cofactores o enzimas también puede dar lugar a una reducción de la actividad mitocondrial. Por tanto, la actividad mitocondrial es utilizada por los biólogos celulares como un marcador no específico de toxicidad celular.

La muestra RSP-5 se recogió en un embalse para el riego situado en una zona agrícola. Es importante resaltar que, de acuerdo con el informe “*Estrategia Nacional de Restauración de los Ríos (2007)*” (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente 2007), la región donde se sitúa dicho embalse se corresponde con una zona de presión media-alta por la agricultura. La aplicación de pesticidas, como por ejemplo herbicidas se realiza habitualmente en los meses de Mayo, Junio, Julio y Septiembre. Por esta razón, la toxicidad detectada en esta muestra podría estar relacionada con la escorrentía de los productos agrícolas aplicados durante estos meses en éste área, pudiendo alcanzar el embalse y contaminando dichas aguas. Recientemente en otros países varias investigaciones sugieren que los herbicidas como la atrazina presente en la escorrentía agrícola podrían tener efectos adversos en las plantas vasculares y en otros organismos (Schuler and Rand 2008, Olivier and Moon 2010, Teodorovic et al. 2012). A pesar, de que este punto se sitúe en una zona agrícola, la *Red Integrada de Calidad del Agua de la Confederación Hidrográfica del Río Tajo* no monitoriza contaminantes orgánicos como los pesticidas y tampoco hemos encontrado ningún estudio sobre la presencia de este tipo de contaminantes en el río Tajo.

### **1.2. Cantidad de DNA**

La reducción de la cantidad de DNA detectada para las muestras de invierno RSP-1, RSP-2, RSP-5 y en el embalse de Cazalegas solo puede deberse a la muerte de parte de la población. El contenido de DNA es un biomarcador de la perturbación que el compuesto tóxico produce en el desarrollo y crecimiento del gametofito. Este biomarcador es rápido, sensible y fiable y se usa frecuentemente en biología celular habiendo sido aplicado con éxito en las esporas y gametofitos (Catalá et al. 2010b). Además, la cantidad de DNA combina las ventajas de detección de efectos letales así como de toxicidad aguda subletal en el desarrollo de organismos y es muy útil complementando biomarcadores fisiológicos, como la actividad mitocondrial. De hecho, como se observa en las muestras RSP1 y RSP5 desenmascara el incremento observado en la actividad mitocondrial de las esporas.

## **2. Bioensayo de toxicidad en animales**

El incremento significativo de la peroxidación lipídica detectado en las muestras RSP-2 y RSP-3 tomadas en verano, así como en todas las muestras tomadas en invierno

indica daño por estrés oxidativo el cual podría tener efectos negativos en el desarrollo de los embriones. Este daño puede deberse a la acción de un tóxico, ya que éste podría inducir la oxidación de lípidos de la membrana produciendo deterioro en las funciones de la misma. Esto puede producirse bien por las propiedades físico-químicas o intrínsecas del tóxico (como por ejemplo, prooxidantes orgánicos liposolubles) o bien por biotransformación por el metabolismo de la célula. Las funciones de la membrana que pueden deteriorarse abarcan desde la transducción de señales, la estabilidad osmótica o la comunicación y coordinación intercelular. El daño oxidativo de la membrana puede conducir, entre otros efectos, a la perturbación de la comunicación celular durante el crecimiento y la organización de los tejidos produciendo malformaciones y cambios en el desarrollo. Además, la peroxidación lipídica puede utilizarse como un indicador temprano y práctico de la teratogenicidad potencial.

### **3. Embalse de Cazalegas**

El embalse de Cazalegas es un punto de extracción de agua potable utilizado además con fines recreativos. La toxicidad detectada en el mismo puede afectar al ecosistema natural y a la calidad del agua potable destinada al consumo humano. A pesar de que no se conocen descargas de estaciones depuradoras aguas arriba del embalse existen dos poblaciones ubicadas en sus alrededores (Serranillos del Valle y el área residencial Atalaya del Alberche) que podrían descargar aguas residuales sin tratar.

De acuerdo con Bergek et al. (2012), alteraciones en etapas tempranas de la vida de los organismos, resultado de la contaminación medioambiental, pueden tener efectos importantes en las poblaciones naturales conduciendo a pérdidas en las poblaciones e incluso posibilidad de extinción de las mismas. Los cambios en la viabilidad y el crecimiento de las esporas producidos por la contaminación del agua fluvial podrían alterar las tasas de crecimiento de las poblaciones de helecho lo cual podría estar relacionado con la disminución de las poblaciones naturales de helecho en las riberas de los ríos europeos. Asimismo, no puede descartarse que estos efectos en el desarrollo se puedan producir en otras plantas vasculares ribereñas. Por último, es importante resaltar que dicha toxicidad implica una potencial exposición de los seres humanos por contaminación indirecta, ya que el embalse se utiliza para el suministro de agua potable. En la actualidad, poco se sabe sobre los posibles efectos que para la salud humana puede tener dicha exposición.

#### **4. Diferencias estacionales**

La respuesta tóxica medida en los organismos expuestos a las muestras de agua fluvial recogidas en invierno fue mayor si la comparamos con la exposición de dichos organismos en las muestras de verano. En el análisis químico realizado por Valcárcel et al. (2013) sobre las mismas muestras de agua fluvial, las mayores concentraciones de microcontaminantes se encontraron en las muestras tomadas en invierno. Dicha variación estacional podría estar relacionada con factores medioambientales (radiación solar, temperatura, biodegradación, etc.) o con variaciones temporales en la descarga de microcontaminantes en las aguas naturales ya que la cuenca del Tajo está estrictamente regulada por los embalses situados aguas arriba, y los caudales se mantienen relativamente constantes durante todo el año (Valcárcel et al. 2013).

#### **5. Diferencias entre puntos de muestreo**

La diferencia en la respuesta encontrada en los distintos puntos de muestreo podría estar relacionada con la localización de cada uno de ellos. La mayor toxicidad se encontró en los puntos RSP-2 y RSP-5, mientras que la toxicidad más baja corresponde a la muestra tomada aguas abajo de la EDAR de Talavera de la Reina (RSP-3). Esto es lo razonablemente esperado dada la naturaleza de las aguas en cada punto.

El punto RSP-1 se localiza a la entrada del río Tajo en la provincia de Toledo tras recibir las importantes descargas de agua residual del área metropolitana de Madrid, una de las regiones más densamente pobladas de Europa. El punto RSP-5 se localiza en un depósito para el riego situado en una zona agrícola. Los puntos RSP-2, RSP-3 y RSP-4 se sitúan aguas abajo de la descarga de aguas residuales procedentes de las principales EDARs de Toledo y Talavera de la Reina. La baja toxicidad detectada en las muestras recogidas en el punto RSP-4 podría indicar un mejor rendimiento de la estación de tratamiento situada aguas arriba, mientras que la planta situada aguas arriba del punto RSP-2 podría tener un rendimiento más deficiente.

#### **6. Comparación de bioensayos**

Como ya se especificó en la sección de resultados, los bioensayos estándar validados no mostraron toxicidad aguda en ninguna de las muestras de agua fluvial analizadas, mientras que en los bioensayos basados en biomarcadores si pudo

apreciarse toxicidad. Por tanto, los resultados obtenidos en este estudio demuestran que los bioensayos basados en biomarcadores son más sensibles a la contaminación que los bioensayos estándar validados y son incluso capaces de discriminar en diferencias locales.

El uso de esporas de helecho (*Polystichum setiferum*) como modelo de toxicidad celular es una herramienta costo-efectiva rápida y fiable y podría reducir los elevados costes de los bioensayos estándar manteniendo la relevancia biológica y ecológica de todos los tests en plantas (Feito et al. 2013). Aunque la diversidad y abundancia de los helechos del género *Polystichum* no es elevada y no es típico de los hábitas riparios mediterráneos, éstos son plantas vasculares y las conclusiones obtenidas en este estudio son relevantes para otros organismos como cultivos o plantas silvestres (Catalá et al. 2009). Las esporas de helecho son productos meióticos y cada una de ellas es genéticamente diferente, por lo que podrían presentar diferentes niveles de resistencia a la toxicidad de los contaminantes. Esto es importante para vincular los mecanismos y procesos mediante los cuales las sustancias químicas ejercen sus efectos sobre los ecosistemas y el impacto causado a la población o a nivel de la comunidad (Feito et al. 2012, Feito et al. 2013). Las muestras de agua podrían causar la muerte de una importante parte de la población no tolerante a dichas concentraciones de microcontaminantes lo que podría determinar el mantenimiento de la población natural de helechos. Asimismo, podría resultar interesante analizar periodos de exposición más largos que permitan observar si la población de esporas tolerantes se desarrolla en gametofitos viables y fértiles, ya que podría no ser el caso.

El modelo de embriones de pez cebra (*Danio rerio*) presenta múltiples ventajas como su fácil reproducción, transparencia y tamaño reducido (1 mm) lo cual permite su uso en microbioensayos. Por tanto, el uso de embriones de pez cebra en tests de toxicidad y en monitorización medioambiental es una herramienta alternativa y prometedora (Scholz et al. 2008, Feito et al. 2012, García-Camero et al. 2012, Feito et al. 2013) para la detección de efectos subletales y a largo plazo en los peces y en sus poblaciones.

Los bioensayos de ecotoxicidad estándar (inhibición del crecimiento de las algas e inhibición de la movilidad de dafnia) no muestran toxicidad aguda para ninguna de las muestras analizadas. Sin embargo, la mayor limitación de estos resultados es su incierta

relevancia ecológica debido a las importantes variaciones interespecíficas en la respuesta de las especies estándar de algas testadas y a lo poco realista que resultan las condiciones experimentales en las que se realiza el test. Además, la extrapolación de resultados a otros taxones diferentes, como plantas vasculares, no es posible ya que las algas son organismos unicelulares pertenecientes a un subreino biológicamente diferente. Las plantas vasculares se han utilizado muy poco en los bioensayos con respecto a las algas, y por ello resulta necesario desarrollar nuevos microbioensayos con mayor relevancia biológica y ecológica. Las plantas superiores son una parte importante de los ecosistemas saludables y equilibrados y el desarrollo de nuevos modelos de plantas es esencial para evaluar el potencial impacto de los contaminantes.

Los microbioensayos con esporas de helecho permiten medir varios efectos subletales aportando conocimientos sobre los mecanismos de toxicidad y los posibles impactos en las poblaciones naturales, si los comparamos con los bioensayos estándar validados. Por otro lado, la principal limitación de este microbioensayo es el todavía escaso conocimiento sobre la biología celular y la fisiología de las esporas de helecho y los gametofitos. Por tanto, aún es necesario llevar a cabo más investigaciones con el fin de poder extrapolar los resultados obtenidos en el laboratorio al campo y diseñar medidas apropiadas.

Podemos concluir que los nuevos bioensayos basados en esporas de helecho y embriones de pez cebra y el uso de biomarcadores como parámetros de toxicidad son herramientas útiles para evaluar los efectos ecotoxicológicos que las aguas fluviales con bajas concentraciones de contaminantes pueden producir, y además, presentan una sensibilidad mayor en comparación con los bioensayos estándar validados.

## **7. Toxicidad causada por el agua fluvial contaminada**

Los resultados extraídos de este estudio a través de los microbioensayos con esporas de helecho y embriones de pez cebra demuestran que las muestras de agua fluvial recogidas del río Tajo producen efectos tóxicos y subletales en el desarrollo de las esporas de helecho y de los embriones de pez cebra en exposiciones agudas.

Las esporas de helecho y los embriones de pez cebra son sensibles a la calidad del agua fluvial y estos hallazgos son similares a los obtenidos en otros estudios (Rodríguez-Gil et al. 2010). Sin embargo, estos resultados no permiten determinar qué

contaminantes específicos podrían ser los causantes de dicha toxicidad. A pesar de ello, en este estudio queda demostrada la existencia de toxicidad por parte del agua fluvial recogida en algunos puntos de muestreo. Las posibles sustancias que podrían ser los responsables de la contaminación detectada pueden ser varios ya que las aguas naturales están expuestas a muchos tipos de sustancias tóxicas a través de las descargas directas de aguas residuales procedentes de las EDARs. El análisis químico de las muestras de agua utilizadas en nuestro estudio confirma la presencia en las mismas de cantidades significativas de compuestos activos farmacéuticos (hormonas, antibacterianos, reguladores de lípidos en sangre, agentes analgésicos/antiinflamatorios, antidrepsivos, antiepilépticos, drogas citotóxicas y antihistamínicos) (Valcárcel et al. 2013). Además, estudios preliminares sugieren que determinados fármacos, como el antidrepsivo venlafaxina y el antiinflamatorio diclofenaco, detectados en las aguas naturales pueden estar relacionados con toxicidad en las esporas de helecho (Feito et al. 2012, Feito et al. 2013). En este sentido cabe mencionar que, recientemente, el antiinflamatorio diclofenaco fue propuesto para su inclusión en la **lista de sustancias prioritarias** en el ámbito de la política de aguas de la Unión Europea a través de la *Propuesta de Directiva de la Comisión Europea [COM (2011) 876 final]*, y actualmente se encuentra en la primera **lista de observación** de sustancias sobre las que deben recabarse datos de seguimiento, de acuerdo con la *Directiva 2013/39/CE, por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE* (Tabla 1). Por otro lado, aunque no se han encontrado datos en la literatura o en las bases de datos de la *Red de Vigilancia Hidrológica del Río Tajo* sobre la presencia de productos fitosanitarios en las aguas del río, las actividades agrícolas desarrolladas en las proximidades de algunos puntos de muestreo (especialmente, RSP-5, Azután) podrían estar relacionadas con la toxicidad detectada en las muestras de agua fluvial estudiadas (Gavel and Marsalek 2004, Saravanan et al. 2011, Duan et al. 2012). Por todas estas razones y dado que los organismos acuáticos están continuamente expuestos a la contaminación fluvial, son necesarias más investigaciones sobre ecotoxicidad con el fin de poder conocer qué contaminantes podrían estar relacionados con la toxicidad detectada. Asimismo es esencial proteger los ecosistemas naturales mediante la implementación de sistemas de vigilancia medioambiental que evalúen las concentraciones de nuevos contaminantes emergentes en las aguas naturales.

## **8. Conclusión**

Las esporas de helecho son extremadamente sensibles a la calidad del agua del río Tajo, la cuál induce toxicidad letal y subletal aguda en el desarrollo de los helechos. Adicionalmente, los embriones de pez cebra también son sensibles a la calidad de dichas aguas ya que las muestras de agua fluvial utilizadas producen un incremento en la peroxidación lipídica que podría conducir a una perturbación en la comunicación celular y en la organización de los tejidos. La toxicidad subletal encontrada es mayor en las muestras tomadas durante los meses de invierno. En conclusión, los microbioensayos basados en biomarcadores de esporas de helecho y embriones de pez cebra son herramientas útiles para la evaluación de los efectos ecotoxicológicos que pueden producir las bajas concentraciones de contaminantes presentes en las aguas naturales y además, son más sensibles que los bioensayos validados. Sin embargo, son necesarias más investigaciones, ya que las aguas naturales están expuestas a la contaminación por multitud de tipos de sustancias y es importante conocer cuáles de entre dichas sustancias son las que podrían ser las responsables de la toxicidad detectada por estos microbioensayos.

## ***Estudio 4: Monitorización de disruptores endocrinos y actividad estrogénica en el agua de grifo de la Comunidad de Madrid***

### **1. Disruptores endocrinos en el agua de grifo**

En la actualidad todavía son escasos los estudios sobre presencia de disruptores endocrinos en el agua potable. Las investigaciones publicadas se centran en la presencia de estos compuestos en las fuentes de agua potable (ríos, lagos, embalses, manantiales, etc) (Kim et al. 2007, Jafari et al. 2009, Yoon et al. 2010, Bono-Blay et al. 2012), aunque algunos han analizado este tipo de contaminantes en puntos finales de consumo de agua potable como a la salida de las ETAPs (Berryman et al. 2004, Kleywegt et al. 2011), en las aguas de grifo (Loos et al. 2007, Benotti et al. 2009, Li et al. 2010) y en agua embotellada (Li et al. 2010, Amiridou and Voutsas 2011). Los compuestos más estudiados son los estrógenos naturales y sintéticos, los alquilfenoles y el plastificante BPA. Sin embargo, ninguno de ellos estudió la presencia de tantos grupos de compuestos con capacidad o sospecha de perturbar el sistema endocrino como el presente estudio.

En Alemania, Kuch and Ballschmiter (2001) analizaron los alquilfenoles NP y OP en aguas de grifo procedentes tanto de fuentes de agua subterránea como de agua superficial obteniendo concentraciones máximas de NP (16 ng/l) y OP (4,9 ng/l) del mismo orden de magnitud a las de este estudio. En otras investigaciones realizadas en Europa, sin embargo, las concentraciones de NP se situán por debajo del límite de detección como ocurre en el estudio de Loos et al. (2007) en el que se analizaron aguas de grifo en puntos en los que la fuente de agua potable es el lago Maggiore situado en el Noreste de Italia. También en Italia Maggioni et al. (2013) estudiaron la presencia de NP en las aguas de grifo de varias ciudades italianas encontrándose concentraciones de NP inferiores a las de nuestro estudio en todas las ciudades salvo en la ciudad de Lecce con concentraciones más elevadas (84 ng/l). Por otro lado, algunos de los trabajos publicados fuera de Europa sobre presencia de alquilfenoles en las aguas de grifo muestran concentraciones superiores a las registradas en nuestro estudio. Este es el caso de la investigación de Li et al. (2010) en agua de grifo de la ciudad China de Guangzhou donde se han detectado concentraciones de NP de hasta 1987 ng/l.

El plastificante BPA es uno de los compuestos más analizados en la literatura científica tanto en aguas residuales, como en aguas superficiales y subterráneas. Asimismo, se han realizado algunos estudios sobre su presencia en agua potable, principalmente en las fuentes de agua potable y a la salida de las ETAPs, aunque algunos de ellos han analizado también su presencia en las aguas de grifo que bebe directamente la población. Este es el caso del trabajo de Kuch and Ballschmiter (2001) en el que se encontraron concentraciones de BPA inferiores a las de este estudio (2 ng/l), o el trabajo de Maggioni et al. (2013), en diversas ciudades italianas, con concentraciones similares a las de este trabajo a excepción de la ciudad de Ferrara donde se encontraron concentraciones de hasta 102 ng/l de BPA. Sin embargo, en otros continentes como el asiático, el estudio de Li et al. (2010) en la ciudad China de Guangzhou halló concentraciones mucho más elevadas de BPA (317 ng/l) que en los estudios europeos.

El grupo de compuestos antimicrobianos (TCS y TCC) estudiado en este trabajo no ha sido detectado en ninguna de las muestras de aguas de grifo analizadas al igual que en otros estudios como los españoles de Kuster et al. (2008) y Rodil et al. (2012) o el italiano de Loos et al. (2007). Otros estudios internacionales como el de Li et al. (2010) realizado en China detectó concentraciones de hasta 14,5 ng/l de TCS.

Al igual que con los antimicrobianos, los estrógenos naturales y sintéticos analizados no se han encontrado en concentraciones detectables en ninguna de las muestras. Sin embargo, el estudio de Kuster et al. (2008) encontró concentraciones de 11,6 ng/l del estrógeno E3 en la ETAP de Abrera que trata el agua procedente del río Llobregat (Barcelona).

El grupo de los retardantes de llama organofosforados todavía no ha sido muy estudiado en las aguas de grifo. Destaca el reciente estudio de Rodil et al. (2012) en la ciudad de A Coruña, donde se han encontrado concentraciones medias de TCPP y TCEP de 40 ng/l y 5 ng/l, respectivamente. En el presente estudio, la concentración media de TCPP es inferior a la del estudio de Rodil et al. (2012). Sin embargo, el TCEP se halla a concentraciones superiores en algunas de las muestras.

Las elevadas concentraciones de retardantes de llama organofosforados y BPA en las muestras de agua de grifo podrían indicar que los sistemas de tratamiento de agua

potable no eliminan suficientemente estos compuestos, o bien podría indicar una posible contaminación procedente de los actuales sistemas de suministro de agua potable, que incluyen, en muchos casos, tuberías de PVC y otros plásticos, que pueden contener estos productos químicos en su formulación (Rodil et al. 2012). En cualquier caso el resultado analítico final demuestra la presencia de estos posibles alteradores hormonales en el agua de grifo analizada.

Finalmente, no se han encontrado otros estudios internacionales, europeos y españoles en los que se hayan analizado parabenos y anticorrosivos en muestras de aguas de grifo.

En cuanto al marcador cafeína son también escasos los estudios publicados hasta el momento en agua de grifo. La mayoría de ellos se centran en el estudio de las concentraciones de cafeína en las ETAPs y en sus diferentes etapas de tratamiento, así como en tecnologías de tratamiento que permitan reducir su presencia en las aguas potables (Stackelberg et al. 2004, Stackelberg et al. 2007, Huerta-Fontela et al. 2008, Broseus et al. 2009, Boleda et al. 2011). La cafeína es un indicador de contaminación antropogénica por su elevada detección en el medio ambiente y porque puede ser un interesante indicador de la presencia de otros contaminantes relacionados con la actividad humana (Valcárcel et al. 2011a), como es el caso de los disruptores endocrinos analizados en este estudio. La frecuente presencia de cafeína en las aguas se debe principalmente a su naturaleza antropogénica y su elevado consumo así como a su estabilidad química que dificulta su total eliminación en las ETAPs con los tratamientos actuales llegando finalmente a los grifos de las ciudades. Las concentraciones de cafeína detectadas en este estudio son inferiores a las encontradas en el estudio de Valcárcel et al. (2011a) en aguas de grifo de las principales zonas de abastecimiento de la Comunidad de Madrid en las que se detectó cafeína en todas las muestras analizadas a concentraciones de entre 15 a 75 ng/l. Asimismo, otros estudios que analizaron cafeína en las aguas tratadas de las ETAPs mostraron concentraciones superiores (Stackelberg et al. 2004, Hua et al. 2006, Stackelberg et al. 2007, Togola and Budzinski 2008, Valcárcel et al. 2011b) a las de este estudio.

## **2. Diferencias entre puntos de muestreo**

Los puntos TW6 y TW5 se sitúan en la zona sur de la Comunidad de Madrid, y ambos reciben el agua procedente de la ETAP de Colmenar de Oreja que es la única que hasta el momento aporta agua potabilizada procedente del río Tajo a la población sur de Madrid. La contaminación registrada en ambos puntos puede ser debida a la insuficiencia de las tecnologías de tratamiento de agua potable aplicadas en la ETAP de Colmenar de Oreja para la eliminación completa de estos compuestos del agua, pero esta hipótesis debería ser confirmada con posteriores estudios. El resto de puntos (TW1, TW2, TW3 y TW4) pertenecen a zonas de abastecimiento que proporcionan agua potable procedente de embalses de la sierra de Madrid.

## **3. Estrogenicidad**

A pesar de los niveles de estrogenicidad encontrados en todas las muestras de agua de grifo ninguno de ellos supera el nivel de estradiol de 1 ng/l, con efectos estrogénicos para los ecosistemas acuáticos (López-Roldán et al. 2010). No hay valor disponible para la exposición a estos compuestos por parte del ser humano. Sin embargo, aún cuando los niveles de estrogenicidad sean relativamente bajos, la población de la Comunidad de Madrid está expuesta de manera continuada a estos bajos niveles de disruptores endocrinos, que como ya se ha indicado con anterioridad tienen la capacidad de actuar a bajas concentraciones y durante un periodo largo de tiempo, por lo que los efectos a largo plazo podrían ser importantes. Por tanto, la vigilancia de la presencia de estos contaminantes en el agua potable debe de ser continua y realizada desde las autoridades responsables de la vigilancia y control del agua potable.

## **4. Evaluación de riesgos**

Los puntos que muestran mayor exposición a disruptores endocrinos, tanto en adultos como en niños (TW3, TW5 y TW6) son los que registran los mayores valores de contaminación.

De acuerdo con los resultados de la caracterización de riesgos efectuada para el BPA, la exposición a este compuesto a través del agua de grifo es aceptable ( $CP < 1$ ), y no implica ningún riesgo para la salud humana. Para el resto de disruptores endocrinos

detectados en las aguas de grifo no fue posible llevar a cabo la caracterización del riesgo, ya que no se dispone de valores de dosis de referencia, según la USEPA (2013).

Cabe destacar que la metodología de evaluación de riesgos permite realizar una estimación, muchas veces cuestionada, por infravalorar el verdadero riesgo existente a la exposición de estas sustancias. En el caso de los disruptores endocrinos son contaminantes emergentes con capacidad de alterar el sistema hormonal y de actuar a dosis muy bajas ( $\mu\text{g/l}$  ó  $\text{ng/l}$ ). Los resultados evidencian la necesidad de monitorizar de forma continuada, durante largos periodos de tiempo, e incluso en diferentes estaciones meteorológicas, la presencia de estas sustancias en las aguas de nuestros grifos, especialmente en los puntos que abastecen a la población con agua potabilizada proveniente de río como ocurre en los puntos TW5 y TW6 de este estudio.

## **5. Conclusión**

El agua de grifo de la Comunidad de Madrid está contaminada por trazas ( $\text{ng/l}$ ) de compuestos con propiedades disruptoras endocrinas. Los resultados evidencian la necesidad de vigilar más estrechamente y de forma continuada la presencia de estos compuestos en el agua de grifo, especialmente en los puntos que abastecen a la población con agua potabilizada proveniente del río Tajo (TW5 y TW6), y durante las cuatro estaciones meteorológicas, así como en diferentes días de la semana llevando a cabo muestreos compuestos. Las concentraciones de disruptores endocrinos obtenidas son muy bajas como para poder afirmar que exista un riesgo para la salud pública, y no se ha constatado riesgo en la evaluación de los mismos, pero cabe recordar que los disruptores endocrinos actúan a dosis muy bajas y sus efectos pueden manifestarse a largo plazo, siendo especialmente importantes las exposiciones durante el embarazo, y las primeras etapas de vida. Además, se desconoce el efecto de la mezcla de estas sustancias.

## DISCUSIÓN GENERAL

Este trabajo ha analizado por un lado, la presencia de productos farmacéuticos psicoativos y otras sustancias químicas con capacidad o sospecha de alteración de la actividad hormonal y, por otro lado, las herramientas disponibles actualmente o de nuevo desarrollo para la detección y evaluación de posibles riesgos ecotoxicológicos y para la salud humana derivados de la presencia de este tipo de contaminantes en las aguas españolas. Concretamente el trabajo se ha llevado a cabo en aguas residuales, naturales y potables de las *Demarcaciones Hidrográficas de Galicia-Costa y Miño-Sil* en Galicia (Estudio 1), y en la *Demarcación Hidrográfica del Tajo* en Madrid y Toledo (Estudios 2, 3 y 4).

En relación con la detección de “*contaminantes emergentes*” en las aguas españolas los resultados obtenidos muestran la necesidad de incrementar el control y la vigilancia medioambiental de nuestras cuencas, mediante la continua monitorización de estos compuestos y la investigación de nuevas tecnologías de depuración que permitan eliminar estas sustancias del agua residual vertida de las depuradoras y así evitar su llegada a los cursos de agua naturales.

En particular, la benzodiazepina lorazepam ha sido detectada en aguas fluviales y de grifo procedentes de diferentes ciudades gallegas, por lo que sería interesante continuar investigando este tipo de fármacos, centrándonos en sus mecanismos de acción, su procedencia, el desarrollo de nuevas tecnologías de eliminación, así como en la evaluación de los posibles riesgos que las concentraciones de psicofármacos detectadas podrían tener para los organismos acuáticos y la salud humana, teniendo en cuenta que la exposición a éstos es continua y que sus posibles efectos dirigidos principalmente al sistema nervioso central serían permanentes e irreversibles.

Por otro lado, el estudio sobre sustancias con capacidad de perturbar el sistema endocrino revela su presencia a bajas concentraciones en las aguas de los ríos de la cuenca del Tajo a su paso por Madrid. Estos contaminantes están ampliamente presentes en nuestra vida cotidiana y todavía se dispone de poca información sobre ellos. De hecho, salvo los alquilfenoles, que se incluyen dentro de la **lista de sustancias prioritarias** en el ámbito de la política de aguas, y las hormonas 17- $\beta$ -estradiol y 17- $\alpha$ -etinilestradiol, actualmente en estudio y observación por parte de la Comisión Europea,

ninguno de los compuestos analizados está regulado. A pesar de que la estimación de estrogenicidad calculada en el presente trabajo releva, dadas las concentraciones detectadas, un bajo potencial estrogénico para los ecosistemas acuáticos, hay que tener en cuenta que todavía no ha sido posible incluir en esta estimación la contribución de los retardantes de llama organofosforados, ya que no se dispone de valores de factor de estrogenicidad para el método utilizado en este trabajo. Esta información sería interesante, ya que se han encontrado concentraciones relativamente elevadas de retardantes de llama en la cuenca del Tajo, por lo que constituye uno de los próximos objetivos de nuestras futuras investigaciones.

Cabe destacar que los resultados obtenidos en este trabajo son representativos de las aguas de las cuencas en las que se han llevado a cabo, y por tanto, no son extrapolables a las aguas de otras regiones. Además, las mediciones realizadas son puntuales, por lo que no permiten conocer las concentraciones reales a las que están expuestos tanto los organismos acuáticos como las poblaciones. Para poder obtener esta información tendrían que realizarse mediciones sistemáticas durante un tiempo determinado.

Para poder evaluar si los niveles de concentración de estos contaminantes detectados en nuestras aguas pueden producir toxicidad letal o subletal en los organismos acuáticos es necesario desarrollar nuevos bioensayos con elevada relevancia biológica y ecológica, que aporten mayores conocimientos sobre los mecanismos de toxicidad y los posibles impactos en las poblaciones naturales, ya que los actuales bioensayos validados se ha demostrado que no son capaces de evaluar efectos subletales como los ocasionados por los denominados disruptores endocrinos. Los bioensayos utilizados en este trabajo han permitido demostrar que, el agua fluvial procedente del río Tajo produce efectos tóxicos y subletales en el desarrollo de esporas de helecho y embriones de pez cebra para exposiciones agudas. Aunque ninguno de los estudios realizados haya analizado la presencia de microcontaminantes en las aguas del río Tajo a su paso por la provincia de Toledo, estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación han encontrado en los mismos puntos de muestreo concentraciones detectables de diferentes tipos de productos farmacéuticos (Valcárcel et al. 2013), y, además, investigaciones recientes, como las de Feito et al. (2012, 2013) sugieren que determinados fármacos como el antidrepsivo venlafaxina, encontrado en muchas de

las aguas analizadas, o el antiinflamatorio diclofenaco podrían estar relacionados con la toxicidad detectada en esporas de helecho. No obstante, resulta esencial continuar investigando en el desarrollo de nuevas herramientas que permitan evaluar posibles riesgos ecotoxicológicos a largo plazo y la extrapolación de los resultados obtenidos en el laboratorio a los ecosistemas naturales, con el objetivo de poder disponer de mayor información sobre los mecanismos de toxicidad de los contaminantes emergentes. Asimismo, el desarrollo de nuevos modelos animales y vegetales constituye la base esencial para poder trabajar en la investigación de los posibles riesgos que, la exposición a estos contaminantes, podría tener en la salud humana.

En este sentido, este trabajo ha encontrado concentraciones detectables de psicofármacos y perturbadores endocrinos en las aguas de grifo de diferentes ciudades gallegas y zonas de abastecimiento de la Comunidad de Madrid, respectivamente. Este hecho pone de manifiesto la necesidad de evaluar los posibles riesgos que las bajas concentraciones de contaminantes encontradas podrían tener para el ser humano, especialmente en aquellos grupos de población más vulnerables, como mujeres embarazadas, niños, pacientes inmunodeprimidos o ancianos, ya que su capacidad para eliminar dichos compuestos es menor, tal y como sugieren algunos autores (Jones et al. 2005, Collier 2007). La herramienta de evaluación de riesgos desarrollada por la USEPA (2013) es una metodología que puede utilizarse como una primera aproximación para poder determinar y caracterizar posibles riesgos de este tipo de contaminantes, pero es necesario el desarrollo de más estudios que tengan en cuenta la exposición continua de la población a estas sustancias y su capacidad para actuar a dosis muy bajas, así como la posibilidad de que sus efectos puedan manifestarse a largo plazo. Además, en la actualidad, todavía existe un elevado desconocimiento sobre los mecanismos de acción de estas sustancias, sus posibles efectos en combinación con otras, y sobre las dosis de referencia de muchas de ellas con las que poder determinar si las concentraciones encontradas en este trabajo podrían tener efectos adversos para la salud de las personas. Por tanto, a día de hoy no podemos afirmar que los niveles de contaminantes detectados en las muestras de agua analizadas supongan un riesgo de salud. Ahora bien, ante todo debe prevalecer el *principio de cautela*, y sólo nos cabe instar a las autoridades competentes a que realicen controles periódicos de la presencia de estas sustancias en el agua potable, y más específicamente en la zona sur de la Comunidad de Madrid, así como a que desarrollen acciones que minimizen su presencia

en el medio ambiente. En concreto, y en relación a los disruptores endocrinos, cuya toxicidad es alta a dosis muy bajas, y cuyos efectos pueden estar latentes durante tiempos prolongados, la definición de tóxico de hace ya 500 años no sería del todo acertada: “*Todo es veneno, nada es sin veneno. Sólo la dosis hace el veneno*” (Paracelso).

En resumen, nos encontramos ante una nueva generación de contaminantes, que no han emergido de golpe, sino que estaban presentes en nuestras aguas desde hace años, pero hasta ahora no se disponía de métodos de análisis precisos que pudieran detectarlos a las concentraciones tan bajas a las que se encuentran en las aguas naturales. Por tanto, se debe continuar analizando su presencia, “vigilarlas”, minimizar su existencia en el medio ambiente, y por supuesto exigir una colaboración entre todos los sectores implicados. Desgraciadamente en el medio ambiente no hay una *farmacovigilancia*, ni *ensayos en fase IV* como ocurre en los ensayos clínicos, por lo que en palabras de Kummerer and Velo (2006) hay que crear una *Ecofarmacovigilancia* entre todos los sectores implicados.

## CONCLUSIÓN GENERAL

Este trabajo aporta la siguiente información que puede servir de base para continuar investigando en este campo:

1. Las aguas fluviales de las cuencas hidrográficas analizadas en este trabajo presentan microcontaminantes, en particular, psicofármacos y otros “*contaminantes emergentes*” que pueden actuar perturbando el sistema hormonal de los organismos. Esto se debe a la ineficacia de los actuales sistemas de depuración de aguas residuales utilizados en las EDARs.
2. Las aguas fluviales contaminadas inducen ecotoxicidad letal y subletal (no detectada por los bioensayos validados en la actualidad) a través de microbioensayos más sensibles a la detección de efectos subletales en los organismos. Por tanto, es necesario continuar investigando en el desarrollo de nuevos métodos más sensibles en la evaluación de la ecotoxicidad y con elevada relevancia ecológica y biológica dentro de los ecosistemas naturales.
3. Por otro lado, este trabajo ha detectado también microcontaminación en las aguas de grifo de las zonas de abastecimiento analizadas, por lo que los sistemas de tratamiento de agua potable aplicados en las ETAPs tampoco consiguen eliminar por completo estos contaminantes, aunque también tendría que investigarse la posible contaminación que puede producirse a través de los actuales sistemas de distribución del agua potable.
4. La metodología de evaluación de riesgos desarrollada por la EPA es una herramienta que permite establecer prioridades en la gestión y protección medioambiental, pero su aplicabilidad depende de la disponibilidad de información sobre toxicidad y valores de referencia de los compuestos, así como el desarrollo de nuevos procedimientos que permitan evaluar posibles riesgos y efectos a largo plazo.

Los resultados de esta investigación deberían involucrar a las administraciones competentes en materia de aguas y de salud pública, así como al sector industrial (químico y farmacéutico) y a las diferentes asociaciones de médicos y población en general, para trabajar en la puesta en marcha de actuaciones y medidas encaminadas a

prevenir posibles riesgos ecotoxicológicos y para la salud de humana. Entre las acciones propuestas se encuentran:

- Poder evaluar y mejorar el estado químico de las aguas, mediante la adopción de medidas encaminadas a la utilización de productos alternativos inocuos para el medio ambiente o a la reducción en el uso de algunos de ellos.
- Acciones informativas dirigidas al sector médico, en el caso de los productos farmacéuticos, y a la población general.
- Incrementar la vigilancia y monitorización de nuestras masas de agua.
- El establecimiento de normas legislativas en materia de aguas que garanticen la calidad de las aguas, y en materia de control, evaluación y vigilancia de nuevos productos químicos que quieran comercializarse a las que deberá acogerse la industria química y la farmacéutica.
- El desarrollo de nuevas tecnologías de depuración de aguas residuales urbanas e industriales y de tratamiento de las aguas potables que permitan la eliminación de estos contaminantes.

Para poder efectuar dichas propuestas es necesario promover la actividad investigadora en cada una de estas actuaciones.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Europea de Medio Ambiente (2013). "The impacts of endocrine disrupters on wildlife, people and their environments 1996-2011". Disponible en: <http://www.eea.europa.eu/publications/the-impacts-of-endocrine-disrupters>. Último acceso: Noviembre 2013.
- Amiridou, D. and Voutsas, D. (2011). "Alkylphenols and phthalates in bottled waters." *J Hazard Mater* **185**(1): 281-286.
- An, B. S., Ahn, H. J., Kang, H. S., Jung, E. M., Yang, H., Hong, E. J. and Jeung, E. B. (2013). "Effects of estrogen and estrogenic compounds, 4-tert-octylphenol, and bisphenol A on the uterine contraction and contraction-associated proteins in rats." *Mol Cell Endocrinol* **375**(1-2): 27-34.
- Ballesteros-Gómez, A., Ruíz, F. J., Rubio, S. and Pérez-Bendito, D. (2007). "Determination of bisphenols A and F and their diglycidyl ethers in wastewater and river water by coacervative extraction and liquid chromatography-fluorimetry." *Anal Chim Acta* **603**(1): 51-59.
- Barceló, D. and López de Alda, M. (2011). "Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes." Disponible en: <http://www.unizar.es/fnca/varios/panel/15.pdf>. Último acceso: Noviembre 2013.
- Base de Datos On-line del Instituto Nacional de Estadística (INE) (2012). Disponible en: [http://www.ine.es/inebmenu/mnu\\_padron.htm](http://www.ine.es/inebmenu/mnu_padron.htm). Último acceso: Noviembre 2013.
- Benotti, M. J., Trenholm, R. A., Vanderford, B. J., Holady, J. C., Stanford, B. D. and Snyder, S. A. (2009). "Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water." *Environ Sci Technol* **43**(3): 597-603.
- Bergek, S., Ma, Q., Vetemaa, M., Franzen, F. and Appelberg, M. (2012). "From individuals to populations: impacts of environmental pollution on natural eelpout populations." *Ecotoxicol Environ Saf* **79**: 1-12.
- Bergman, A., Heindel, J., Jobling, S., Kidd, K. and Zoeller, R. (2012). "State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals 2012." Organización Mundial de la Salud (OMS). Disponible en: <http://www.who.int/ceh/publications/endocrine/en/>. Último acceso: Noviembre 2013.
- Berryman, D., Houde, F., DeBlois, C. and O'Shea, M. (2004). "Nonylphenolic compounds in drinking and surface waters downstream of treated textile and pulp and paper effluents: a survey and preliminary assessment of their potential effects on public health and aquatic life." *Chemosphere* **56**(3): 247-255.
- Bester, K., Theobald, N. and Schroder, H. F. (2001). "Nonylphenols, nonylphenol-ethoxylates, linear alkylbenzenesulfonates (LAS) and bis (4-chlorophenyl)-sulfone in the German Bight of the North Sea." *Chemosphere* **45**(6-7): 817-826.
- Blanco, E., Casais, M. C., Mejuto, M. C. and Cela, R. (2009). "Combination of off-line solid-phase extraction and on-column sample stacking for sensitive determination of parabens and p-hydroxybenzoic acid in waters by non-aqueous capillary electrophoresis." *Anal Chim Acta* **647**(1): 104-111.
- Boleda, M. A., Galceran, M. A. and Ventura, F. (2011). "Behavior of pharmaceuticals and drugs of abuse in a drinking water treatment plant (DWTP) using combined conventional and ultrafiltration and reverse osmosis (UF/RO) treatments." *Environ Pollut* **159**(6): 1584-1591.
- Bono-Blay, F., Guart, A., de la Fuente, B., Pedemonte, M., Pastor, M. C., Borrell, A. and Lacorte, S. (2012). "Survey of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and

- herbicides in Spanish source waters intended for bottling." Environ Sci Pollut Res Int.
- Brausch, J. M. and Rand, G. M. (2011). "A review of personal care products in the aquatic environment: environmental concentrations and toxicity." Chemosphere **82**(11): 1518-1532.
- Brix, R., Postigo, C., González, S., Villagrasa, M., Navarro, A., Kuster, M., López de Alda, M. and Barceló, D. (2010). "Analysis and occurrence of alkylphenolic compounds and estrogens in a European river basin and an evaluation of their importance as priority pollutants." Anal Bioanal Chem **396**(3): 1301-1309.
- Broseus, R., Vincent, S., Aboufadi, K., Daneshvar, A., Sauve, S., Barbeau, B. and Prevost, M. (2009). "Ozone oxidation of pharmaceuticals, endocrine disruptors and pesticides during drinking water treatment." Water Res **43**(18): 4707-4717.
- Calabrese, E. J. (2008). "Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists." Environ Toxicol Chem **27**(7): 1451-1474.
- Calabrese, E. J. and Blain, R. B. (2009). "Hormesis and plant biology." Environ Pollut **157**(1): 42-48.
- Calisto, V. and Esteves, V. I. (2009). "Psychiatric pharmaceuticals in the environment." Chemosphere **77**(10): 1257-1274.
- Camacho-Muñoz, D., Martín, J., Santos, J. L., Aparicio, I. and Alonso, E. (2010). "Occurrence, temporal evolution and risk assessment of pharmaceutically active compounds in Doñana Park (Spain)." J Hazard Mater **183**(1-3): 602-608.
- Caminada, D., Escher, C. and Fent, K. (2006). "Cytotoxicity of pharmaceuticals found in aquatic systems: comparison of PLHC-1 and RTG-2 fish cell lines." Aquat Toxicol **79**(2): 114-123.
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J. M., Llombart, M., García-Jares, C., Rodríguez, I., Gómez, M. and Ternes, T. (2004). "Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant." Water Res **38**(12): 2918-2926.
- Carballa, M., Fink, G., Omil, F., Lema, J. M. and Ternes, T. (2008a). "Determination of the solid-water distribution coefficient (K<sub>d</sub>) for pharmaceuticals, estrogens and musk fragrances in digested sludge." Water Res **42**(1-2): 287-295.
- Carballa, M., Omil, F. and Lema, J. M. (2008b). "Comparison of predicted and measured concentrations of selected pharmaceuticals, fragrances and hormones in Spanish sewage." Chemosphere **72**(8): 1118-1123.
- Carrasco, P., Astasio, P., Ortega, P., Jiménez, R. and Gil, A. (2001). "[Factors related to psychotropic drugs consumption among the Spanish adult population. Data from the Spanish National Health Surveys for 1993, 1995 and 1997]." Med Clin (Barc) **116**(9): 324-329.
- Catalá, M., Esteban, M., Rodríguez-Gil, J. L. and Quintanilla, L. G. (2009). "Development of a naturally miniaturised testing method based on the mitochondrial activity of fern spores: a new higher plant bioassay." Chemosphere **77**(7): 983-988.
- Catalá, M., Esteban, M. and Quintanilla, L. G. (2010a). "Mitochondrial Activity of Fern Spores for the Evaluation of Acute Toxicity in Higher Plant Development." En: Kumar, A.; Fernández, H. (eds.). Working with Ferns: issues and applications. pp. 237-247. Springer, New York.
- Catalá, M., Rodríguez-Gil, J. L. and Quintanilla, L. G. (2010b). "Chronic Phytotoxicity in Gametophytes: DNA as Biomarker of Growth and Chlorophyll Autofluorescence as Biomarker of Cell Function." En: Kumar, A.; Fernández, H. (eds.). Working with Ferns: issues and applications. pp. 249-260. Springer, New York.

- Céspedes, R., Petrovic, M., Raldua, D., Saura, U., Pina, B., Lacorte, S., Viana, P. and Barceló, D. (2004). "Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS." Anal Bioanal Chem **378**(3): 697-708.
- Céspedes, R., Lacorte, S., Raldua, D., Ginebreda, A., Barceló, D. and Piña, B. (2005). "Distribution of endocrine disruptors in the Llobregat River basin (Catalonia, NE Spain)." Chemosphere **61**(11): 1710-1719.
- Céspedes, R., Lacorte, S., Ginebreda, A. and Barceló, D. (2006). "Chemical monitoring and occurrence of alkylphenols, alkylphenol ethoxylates, alcohol ethoxylates, phthalates and benzothiazoles in sewage treatment plants and receiving waters along the Ter River basin (Catalonia, N. E. Spain)." Anal Bioanal Chem **385**(6): 992-1000.
- Coelho, S., Oliveira, R., Pereira, S., Musso, C., Domingues, I., Bhujel, R. C., Soares, A. M. and Nogueira, A. J. (2011). "Assessing lethal and sub-lethal effects of trichlorfon on different trophic levels." Aquat Toxicol **103**(3-4): 191-198.
- Coetsier, C. M., Spinelli, S., Lin, L., Roig, B. and Touraud, E. (2009). "Discharge of pharmaceutical products (PPs) through a conventional biological sewage treatment plant: MECs vs PECs?." Environ Int **35**(5): 787-792.
- Collier, A. C. (2007). "Pharmaceutical contaminants in potable water: potential concerns for pregnant women and children." EcoHealth **4**: 164-171.
- Comeau, F., Surette, C., Brun, G. L. and Losier, R. (2008). "The occurrence of acidic drugs and caffeine in sewage effluents and receiving waters from three coastal watersheds in Atlantic Canada." Sci Total Environ **396**(2-3): 132-146.
- Comunidad de Madrid (2013). "Plan Regional de Tratamiento de Fungos (2006-2016)." Disponible en: <http://www.madrid.org/cs>. Último acceso: Noviembre 2013.
- Chung, K. W., Fulton, M. H. and Scott, G. I. (2007). "Use of the juvenile clam, *Mercenaria mercenaria*, as a sensitive indicator of aqueous and sediment toxicity." Ecotoxicol Environ Saf **67**(3): 333-340.
- Dagher, Z., Borgie, M., Magdalou, J., Chahine, R. and Greige-Gerges, H. (2012). "p-Hydroxybenzoate esters metabolism in MCF7 breast cancer cells." Food Chem Toxicol **50**(11): 4109-4114.
- Daughton, C. G. (2011). "Illicit drugs: contaminants in the environment and utility in forensic epidemiology." Rev Environ Contam Toxicol **210**: 59-110.
- Deblonde, T., Cossu-Leguille, C. and Hartemann, P. (2011). "Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature." Int J Hyg Environ Health **214**(6): 442-448.
- Duan, Y. P., Meng, X. Z., Wen, Z. H. and Chen, L. (2012). "Acidic pharmaceuticals in domestic wastewater and receiving water from hyper-urbanization city of China (Shanghai): environmental release and ecological risk." Environ Sci Pollut Res Int **20**(1): 108-116.
- Elliott, H. W. (1976). "Metabolism of lorazepam." Br J Anaesth **48**(10): 1017-1023.
- European Chemicals Bureau (ECB) (2002). "4-nonylphenol (branched) and nonylphenol". Disponible en: <http://echa.europa.eu/documents/10162/6c460d8a-9f18-475f-823c-b8941e18fa3a>. Último acceso: Noviembre 2013.
- European Chemicals Bureau (ECB) (2009). "Draft risk assessment, tris(2-chloroethyl) phosphate, TCEP". Disponible en: <http://www.baua.de/cae/servlet/contentblob/852682/publicationFile/>. Último acceso: Noviembre 2013.

- Fatta-Kassinou, D., Meric, S. and Nikolaou, A. (2011). "Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research." Anal Bioanal Chem **399**(1): 251-275.
- Feito, R., Valcárcel, Y. and Catalá, M. (2012). "Biomarker assessment of toxicity with miniaturised bioassays: diclofenac as a case study." Ecotoxicology **21**(1): 289-296.
- Feito, R., Valcárcel, Y. and Catalá, M. (2013). "Preliminary data suggest that venlafaxine environmental concentrations could be toxic to plants." Chemosphere **90**(7): 2065-2069.
- Fent, K., Weston, A. A. and Caminada, D. (2006). "Ecotoxicology of human pharmaceuticals." Aquat Toxicol **76**(2): 122-159.
- Fram, M. S. and Belitz, K. (2011). "Occurrence and concentrations of pharmaceutical compounds in groundwater used for public drinking-water supply in California." Sci Total Environ **409**(18): 3409-3417.
- García-Camero, J. P., Catalá, M. and Valcárcel, Y. (2012). "River waters induced neurotoxicity in an embryo-larval zebrafish model." Ecotoxicol Environ Saf **84**: 84-91.
- Gavel, A. and Marsalek, B. (2004). "A novel approach for phytotoxicity assessment by CCD fluorescence imaging." Environ Toxicol **19**(4): 429-432.
- Gibert, Y., Sassi-Messai, S., Fini, J. B., Bernard, L., Zalko, D., Cravedi, J. P., Balaguer, P., Andersson-Lendahl, M., Demeneix, B. and Laudet, V. (2011). "Bisphenol A induces otolith malformations during vertebrate embryogenesis." BMC Dev Biol **11**: 4.
- Ginebreda, A., Muñoz, I., López de Alda, M., Brix, R., López-Doval, J. and Barceló, D. (2010). "Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain)." Environ Int **36**(2): 153-162.
- Glassmeyer, S. T., Kolpin, D., Furlong, E. T. and Focazio, M. J. (2008). "Environmental presence and persistence of pharmaceuticals. An overview. Fate of pharmaceuticals in the environment and inwater treatment systems." e. Aga DS, Boca Raton, FL (USA): CRC Press: 3-41.
- González Alonso, S., Valcárcel, Y., Montero, J. C. and Catalá, M. (2012). "Nicotine occurrence in bottled mineral water: analysis of 10 brands of water in Spain." Sci Total Environ **416**: 527-531.
- González, A. S., Catalá, M., Maroto, R. R., Gil, J. L., de Miguel, A. G. and Valcárcel, Y. (2010). "Pollution by psychoactive pharmaceuticals in the rivers of Madrid metropolitan area (Spain)." Environ Int **36**(2): 195-201.
- González, S., López-Roldán, R. and Cortina, J. L. (2012). "Presence and biological effects of emerging contaminants in Llobregat River basin: a review." Environ Pollut **161**: 83-92.
- Gorga, M., Petrovic, M. and Barceló, D. (2013). "Multi-residue analytical method for the determination of endocrine disruptors and related compounds in river and waste water using dual column liquid chromatography switching system coupled to mass spectrometry." J Chromatogr A **1295**: 57-66.
- Gros, M., Petrovic, M. and Barceló, D. (2007). "Wastewater treatment plants as a pathway for aquatic contamination by pharmaceuticals in the Ebro river basin (northeast Spain)." Environ Toxicol Chem **26**(8): 1553-1562.
- Gros, M., Petrovic, M., Ginebreda, A. and Barceló, D. (2010). "Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes." Environ Int **36**(1): 15-26.

- Halling-Sorensen, B., Nors, N. S., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Holten Lutzhoft, H. C. and Jorgensen, S. E. (1998). "Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment--a review." Chemosphere **36**(2): 357-393.
- Heberer, T. (2002). "Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data." Toxicol Lett **131**(1-2): 5-17.
- Hignite, C. and Azarnoff, D. L. (1977). "Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent." Life Sci **20**(2): 337-341.
- Hoebert, J., Laing, R. and Stephens, P. (2011). "The World Medicines Situation." Organización Mundial de la Salud (OMS). Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s20035en/s20035en.pdf>. Último acceso: Noviembre 2013.
- Hua, W., Bennett, E. R. and Letcher, R. J. (2006). "Ozone treatment and the depletion of detectable pharmaceuticals and atrazine herbicide in drinking water sourced from the upper Detroit River, Ontario, Canada." Water Res **40**(12): 2259-2266.
- Huerta-Fontela, M., Galceran, M. T. and Ventura, F. (2008). "Stimulatory drugs of abuse in surface waters and their removal in a conventional drinking water treatment plant." Environ Sci Technol **42**(18): 6809-6816.
- IMS Health (2004). "IMS World Review 2004." Disponible en: <http://www.imshealth.com>. Último acceso: Noviembre 2013.
- International Agency for Research on Cancer (2013). Disponible en: <http://www.iarc.fr/>. Último acceso: Noviembre 2013.
- ISO (1998). Water quality-Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* straus (*Cladocera crustacea*). Acute toxicity test 2012; ISO 6341:1996/cor 1:1998.
- Jackson, J. and Sutton, R. (2008). "Sources of endocrine-disrupting chemicals in urban wastewater, Oakland, CA." Sci Total Environ **405**(1-3): 153-160.
- Jafari, A. J., Pourkabir Abasabad, R. and Salehzadeh, A. (2009). "Endocrine disrupting contaminants in water resources and sewage in Hamadan city of Iran." Iranian J Environ Health Sci Eng **6**(2): 89-96.
- Jjemba, P. K. (2006). "Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment." Ecotoxicol Environ Saf **63**(1): 113-130.
- Jones, O. A., Lester, J. N. and Voulvoulis, N. (2005). "Pharmaceuticals: a threat to drinking water?" Trends Biotechnol **23**(4): 163-167.
- Jonkers, N., Sousa, A., Galante-Oliveira, S., Barroso, C. M., Kohler, H. P. and Giger, W. (2010). "Occurrence and sources of selected phenolic endocrine disruptors in Ria de Aveiro, Portugal." Environ Sci Pollut Res Int **17**(4): 834-843.
- Jordaan, M. S., Reinecke, S. A. and Reinecke, A. J. (2012). "Acute and sublethal effects of sequential exposure to the pesticide azinphos-methyl on juvenile earthworms (*Eisenia andrei*)." Ecotoxicology **21**(3): 649-661.
- Kapp, T., Kammann, U., Vobach, M. and Vetter, W. (2006). "Synthesis of low and high chlorinated toxaphene and comparison of their toxicity by zebrafish (*Danio rerio*) embryo test." Environ Toxicol Chem **25**: 2884-2889.
- Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R. M. and Guwy, A. J. (2008). "The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK." Water Res **42**(13): 3498-3518.
- Kim, S. D., Cho, J., Kim, I. S., Vanderford, B. J. and Snyder, S. A. (2007). "Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters." Water Res **41**(5): 1013-1021.

- Kiss, A. and Fries, E. (2009). "Occurrence of benzotriazoles in the rivers Main, Hengstbach, and Hegbach (Germany)." *Environ Sci Pollut Res Int* **16**(6): 702-710.
- Kleywegt, S., Pileggi, V., Yang, P., Hao, C., Zhao, X., Rocks, C., Thach, S., Cheung, P. and Whitehead, B. (2011). "Pharmaceuticals, hormones and bisphenol A in untreated source and finished drinking water in Ontario, Canada--occurrence and treatment efficiency." *Sci Total Environ* **409**(8): 1481-1488.
- Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B. and Buxton, H. T. (2002). "Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance." *Environ Sci Technol* **36**(6): 1202-1211.
- Kuch, H. M. and Ballschmiter, K. (2001). "Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range." *Environ Sci Technol* **35**(15): 3201-3206.
- Kummerer, K. and Velo, G. (2006). "Ecopharmacology: a new topic of importance in pharmacovigilance." *Drug Saf* **29**(5): 371-373.
- Kuster, M., López de Alda, M. J., Hernando, M. D., Petrovic, M., Martín-Alonso, J. and Barceló, D. (2008). "Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain)." *Journal of Hydrology* **358**: 112-123.
- Kuster, M., Díaz-Cruz, S., Rosell, M., López de Alda, M. and Barceló, D. (2010). "Fate of selected pesticides, estrogens, progestogens and volatile organic compounds during artificial aquifer recharge using surface waters." *Chemosphere* **79**(8): 880-886.
- Li, X., Ying, G. G., Su, H. C., Yang, X. B. and Wang, L. (2010). "Simultaneous determination and assessment of 4-nonylphenol, bisphenol A and triclosan in tap water, bottled water and baby bottles." *Environ Int* **36**(6): 557-562.
- Liu, X., Ji, K. and Choi, K. (2012). "Endocrine disruption potentials of organophosphate flame retardants and related mechanisms in H295R and MVLN cell lines and in zebrafish." *Aquat Toxicol* **114-115**: 173-181.
- Loos, R., Wollgast, J., Huber, T. and Hanke, G. (2007). "Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in Northern Italy." *Anal Bioanal Chem* **387**(4): 1469-1478.
- López-Roldán, R., López de Alda, M., Gros, M., Petrovic, M., Martín-Alonso, J. and Barceló, D. (2010). "Advanced monitoring of pharmaceuticals and estrogens in the Llobregat River basin (Spain) by liquid chromatography-triple quadrupole-tandem mass spectrometry in combination with ultra performance liquid chromatography-time of flight-mass spectrometry." *Chemosphere* **80**(11): 1337-1344.
- Lyche, J. L., Nourizadeh-Lillabadi, R., Karlsson, C., Stavik, B., Berg, V., Skare, J. U., Alestrom, P. and Ropstad, E. (2011). "Natural mixtures of POPs affected body weight gain and induced transcription of genes involved in weight regulation and insulin signaling." *Aquat Toxicol* **102**(3-4): 197-204.
- Maggioni, S., Balaguer, P., Chiozzotto, C. and Benfenati, E. (2013). "Screening of endocrine-disrupting phenols, herbicides, steroid estrogens, and estrogenicity in drinking water from the waterworks of 35 Italian cities and from PET-bottled mineral water." *Environ Sci Pollut Res Int* **20**(3): 1649-1660.

- Martínez-Bueno, M. J., Dolores Hernando, M., Herrera, S., Gómez, M. J., Fernández-Alba, A., Bustamante, I. and García-Calvo, E. (2010). "Pilot survey of chemical contaminants from industrial and human activities in river waters of Spain." Intern J Environ Anal Chem **90**(3-6): 321-343.
- Matamoros, V., Arias, C. A., Nguyen, L. X., Salvado, V. and Brix, H. (2012). "Occurrence and behavior of emerging contaminants in surface water and a restored wetland." Chemosphere **88**(9): 1083-1089.
- Metcalfé, C. D., Chu, S., Judt, C., Li, H., Oakes, K. D., Servos, M. R. and Andrews, D. M. (2010). "Antidepressants and their metabolites in municipal wastewater, and downstream exposure in an urban watershed." Environ Toxicol Chem **29**(1): 79-89.
- Miege, C., Choubert, J. M., Ribeiro, L., Eusebe, M. and Coquery, M. (2009). "Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants-- conception of a database and first results." Environ Pollut **157**(5): 1721-1726.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. (2007). "Estrategia Nacional de Restauración de Ríos 2007." Disponible en: <http://www.magrama.gob.es/es/agua/temas/delimitacion-y-restauracion-del-dominio-publico-hidraulico/estrategia-nacional-restauracion-rios/>. Último acceso: Noviembre 2013.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (2013). "Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes, PRTR España." Disponible en: <http://www.prtr-es.es/>. Último acceso: Noviembre 2013.
- Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (2013). "Encuesta sobre alcohol y drogas en la población general de España, EDADES 2011-2012." Disponible en: <http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/observa/pdf/EDADES2011.pdf>. Último acceso: Noviembre 2013.
- Moldovan, Z., Schmutzer, G., Tusa, F., Calin, R. and Alder, A. C. (2007). "An overview of pharmaceuticals and personal care products contamination along the river Somes watershed, Romania." J Environ Monit **9**(9): 986-993.
- Mompelat, S., Le, B. B. and Thomas, O. (2009). "Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water." Environ Int **35**(5): 803-814.
- Montes, R., Rodríguez, I., Rubí, E. and Cela, R. (2009). "Dispersive liquid-liquid microextraction applied to the simultaneous derivatization and concentration of triclosan and methyltriclosan in water samples." J Chromatogr A **1216**(2): 205-210.
- Muller, M., Rabenoelina, F., Balaguer, P., Patureau, D., Lemenach, K., Budzinski, H., Barceló, D., López de Alda, M., Kuster, M., Delgenes, J. P. and Hernández-Raquet, G. (2008). "Chemical and biological analysis of endocrine-disrupting hormones and estrogenic activity in an advanced sewage treatment plant." Environ Toxicol Chem **27**(8): 1649-1658.
- Muñoz, I., López-Doval, J. C., Ricart, M., Villagrana, M., Brix, R., Geiszinger, A., Ginebreda, A., Guasch, H., López de Alda, M., Romani, A. M., Sabater, S. and Barceló, D. (2009). "Bridging levels of pharmaceuticals in river water with biological community structure in the Llobregat River basin (northeast Spain)." Environ Toxicol Chem **28**(12): 2706-2714.
- OECD (2012). Guidelines for the Testing of Chemicals Alga growth inhibition test nº 201.
- OECD Health Data (2013). "Pharmaceutical consumption by DDDs. Definitions, sources and methods." Disponible en: <http://www.oecd.org/els/health->

- Okubo, T., Yokoyama, Y., Kano, K. and Kano, I. (2001). "ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ERalpha and PR." *Food Chem Toxicol* **39**(12): 1225-1232.
- Olivier, H. M. and Moon, B. R. (2010). "The effects of atrazine on spotted salamander embryos and their symbiotic alga." *Ecotoxicology* **19**(4): 654-661.
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2013). "Agua, Saneamiento y Salud (ASS): Productos farmacéuticos en el agua potable". Disponible en: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/emerging/info\\_sheet\\_pharmaceuticals/es/](http://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/info_sheet_pharmaceuticals/es/). Último acceso: Noviembre 2013.
- Pal, A., Gin, K. Y., Lin, A. Y. and Reinhard, M. (2010). "Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects." *Sci Total Environ* **408**(24): 6062-6069.
- Pelayo, S., López-Roldán, R., González, S., Casado, M., Raldua, D., Cortina, J. L. and Piña, B. (2011). "A zebrafish scale assay to monitor dioxin-like activity in surface water samples." *Anal Bioanal Chem* **401**(6): 1861-1869.
- Petersen, G., Rasmussen, D. and Gustavson, K. (2007). "Study on enhancing the endocrine disrupter priority list with a focus on low production volume chemicals. ENV.D.4/ETU/2005/0028r." Comisión Europea. Disponible en: [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/final\\_report\\_2007.pdf](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/final_report_2007.pdf). Último acceso: Noviembre 2013.
- Petrovic, M., Díaz, A., Ventura, F. and Barceló, D. (2003). "Occurrence and removal of estrogenic short-chain ethoxy nonylphenolic compounds and their halogenated derivatives during drinking water production." *Environ Sci Technol* **37**(19): 4442-4448.
- Petrovic, M., Eljarrat, E., López de Alda, M. and Barceló, D. (2004). "Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: a survey on new monitoring strategies and occurrence data." *Anal Bioanal Chem* **378**(3): 549-562.
- Quednow, K. and Puttmann, W. (2009). "Temporal concentration changes of DEET, TCEP, terbutryn, and nonylphenols in freshwater streams of Hesse, Germany: possible influence of mandatory regulations and voluntary environmental agreements." *Environ Sci Pollut Res Int* **16**(6): 630-640.
- Rabiet, M., Togola, A., Brissaud, F., Seidel, J. L., Budzinski, H. and Elbaz-Poulichet, F. (2006). "Consequences of treated water recycling as regards pharmaceuticals and drugs in surface and ground waters of a medium-sized Mediterranean catchment." *Environ Sci Technol* **40**(17): 5282-5288.
- Reilly, C. A. and Aust, S. D. (1999). Measurement of lipid peroxidation, in: Bus, J.S., et al. (Eds.), *Current Protocols in Toxicology*. Academic Press., San Diego.
- Rodil, R., Quintana, J. B., Concha-Grana, E., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S. and Prada-Rodríguez, D. (2012). "Emerging pollutants in sewage, surface and drinking water in Galicia (NW Spain)." *Chemosphere* **86**(10): 1040-1049.
- Rodríguez-Gil, J. L., Catalá, M., González Alonso, S., Maroto, R. R., Valcárcel, Y., Segura, Y., Molina, R., Melero, J. A. and Martínez, F. (2010). "Heterogeneous photo-Fenton treatment for the reduction of pharmaceutical contamination in Madrid rivers and ecotoxicological evaluation by a miniaturized fern spores bioassay." *Chemosphere* **80**(4): 381-388.
- Saravanan, M., Karthika, S., Malarvizhi, A. and Ramesh, M. (2011). "Ecotoxicological impacts of clofibric acid and diclofenac in common carp (*Cyprinus carpio*)

- fingerlings: hematological, biochemical, ionoregulatory and enzymological responses." J Hazard Mater **195**: 188-194.
- Schneider, H., Schuettpeitz, E., Pryer, K. M., Cranfill, R., Magallon, S. and Lupia, R. (2004). "Ferns diversified in the shadow of angiosperms." Nature **428**(6982): 553-557.
- Scholz, S., Fischer, S., Gundel, U., Kuster, E., Luckenbach, T. and Voelker, D. (2008). "The zebrafish embryo model in environmental risk assessment--applications beyond acute toxicity testing." Environ Sci Pollut Res Int **15**(5): 394-404.
- Schuler, L. J. and Rand, G. M. (2008). "Aquatic risk assessment of herbicides in freshwater ecosystems of South Florida." Arch Environ Contam Toxicol **54**(4): 571-583.
- Schultz, M. M., Furlong, E. T., Kolpin, D. W., Werner, S. L., Schoenfuss, H. L., Barber, L. B., Blazer, V. S., Norris, D. O. and Vajda, A. M. (2010). "Antidepressant pharmaceuticals in two U.S. effluent-impacted streams: occurrence and fate in water and sediment, and selective uptake in fish neural tissue." Environ Sci Technol **44**(6): 1918-1925.
- Simó Miñana, J. (2012). "[Use of prescription drugs in Spain and Europe]." Aten Primaria **44**(6): 335-347.
- Stackelberg, P. E., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Zaugg, S. D., Henderson, A. K. and Reissman, D. B. (2004). "Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant." Sci Total Environ **329**(1-3): 99-113.
- Stackelberg, P. E., Gibs, J., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Zaugg, S. D. and Lippincott, R. L. (2007). "Efficiency of conventional drinking-water-treatment processes in removal of pharmaceuticals and other organic compounds." Sci Total Environ **377**(2-3): 255-272.
- Teng, C., Goodwin, B., Shockley, K., Xia, M., Huang, R., Norris, J., Merrick, B. A., Jetten, A. M., Austin, C. P. and Tice, R. R. (2013). "Bisphenol A affects androgen receptor function via multiple mechanisms." Chem Biol Interact **203**(3): 556-564.
- Teodorovic, I., Knezevic, V., Tunic, T., Cucak, M., Lecic, J. N., Leovac, A. and Tumbas, I. I. (2012). "Myriophyllum aquaticum versus *Lemna minor*: sensitivity and recovery potential after exposure to atrazine." Environ Toxicol Chem **31**(2): 417-426.
- Terasaki, M., Kamata, R., Shiraishi, F. and Makino, M. (2009). "Evaluation of estrogenic activity of parabens and their chlorinated derivatives by using the yeast two-hybrid assay and the enzyme-linked immunosorbent assay." Environ Toxicol Chem **28**(1): 204-208.
- Ternes, T. (1998). "Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers." Water Res **32**(11): 3245-3260.
- Togola, A. and Budzinski, H. (2008). "Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples." J Chromatogr A **1177**(1): 150-158.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA) (2013). "Risk Assessment". Disponible en: <http://www.epa.gov/risk/>. Último acceso: Noviembre 2013.
- Valcárcel, Y., González-Alonso, S., Rodríguez Gil, J. L., Gil, A. and Catalá, M. (2011a). "Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the Madrid Region (Spain) and potential ecotoxicological risk." Chemosphere **84**(10): 1336-1348.
- Valcárcel, Y., González Alonso, S., Rodríguez-Gil, J. L., Maroto, R. R., Gil, A. and Catalá, M. (2011b). "Analysis of the presence of cardiovascular and

- analgesic/anti-inflammatory/antipyretic pharmaceuticals in river- and drinking-water of the Madrid Region in Spain." Chemosphere **82**(7): 1062-1071.
- Valcárcel, Y., González Alonso, S., Rodríguez-Gil, J. L., Castaño, A., Montero, J. C., Criado-Álvarez, J. J., Mirón, I. J. and Catalá, M. (2013). "Seasonal variation of pharmaceutically active compounds in surface (Tagus River) and tap water (Central Spain)." **20**(3): 1396-1412.
- Vieno, N. M., Harkki, H., Tuhkanen, T. and Kronberg, L. (2007). "Occurrence of pharmaceuticals in river water and their elimination in a pilot-scale drinking water treatment plant." Environ Sci Technol **41**(14): 5077-5084.
- Voutsas, D., Hartmann, P., Schaffner, C. and Giger, W. (2006). "Benzotriazoles, alkylphenols and bisphenol A in municipal wastewaters and in the Glatt River, Switzerland." Environ Sci Pollut Res Int **13**(5): 333-341.
- Wang, W. C. (1991). "Literature-Review on Higher-Plants for Toxicity Testing." Water Air Soil Poll **59**: 381-400.
- Wang, L., Ying, G. G., Zhao, J. L., Liu, S., Yang, B., Zhou, L. J., Tao, R. and Su, H. C. (2011). "Assessing estrogenic activity in surface water and sediment of the Liao River system in northeast China using combined chemical and biological tools." Environ Pollut **159**(1): 148-156
- Wang, L., Ying, G. G., Chen, F., Zhang, L. J., Zhao, J. L., Lai, H. J., Chen, Z. F. and Tao, R. (2012). "Monitoring of selected estrogenic compounds and estrogenic activity in surface water and sediment of the Yellow River in China using combined chemical and biological tools." Environ Pollut **165**: 241-249.
- Wang, G., Ma, P., Zhang, Q., Lewis, J., Lacey, M., Furukawa, Y., O'Reilly, S. E., Meaux, S., McLachlan, J. and Zhang, S. (2012). "Endocrine disrupting chemicals in New Orleans surface waters and Mississippi Sound sediments." J Environ Monit **14**(5): 1353-1364.
- Yang, M., Wang, K., Shen, Y. and Wu, M. (2011). "Evaluation of estrogenic activity in surface water and municipal wastewater in Shanghai, China." Bull Environ Contam Toxicol **87**(3): 215-219.
- Yoon, Y., Ryu, J., Oh, J., Choi, B. G. and Snyder, S. A. (2010). "Occurrence of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals, and personal care products in the Han River (Seoul, South Korea)." Sci Total Environ **408**(3): 636-643.
- Zhao, J. L., Ying, G. G., Wang, L., Yang, J. F., Yang, X. B., Yang, L. H. and Li, X. (2009). "Determination of phenolic endocrine disrupting chemicals and acidic pharmaceuticals in surface water of the Pearl Rivers in South China by gas chromatography-negative chemical ionization-mass spectrometry." Sci Total Environ **407**(2): 962-974.
- Zhou, H., Wu, C., Huang, X., Gao, M., Wen, X., Tsuno, H. and Tanaka, H. (2010a). "Occurrence of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage treatment plants and receiving rivers in Beijing, China." Water Environ Res **82**(11): 2239-2248.
- Zhou, H., Huang, X., Wang, X., Zhi, X., Yang, C., Wen, X., Wang, Q., Tsuno, H. and Tanaka, H. (2010b). "Behaviour of selected endocrine-disrupting chemicals in three sewage treatment plants of Beijing, China." Environ Monit Assess **161**(1-4): 107-121.
- Zoller, U. (2006). "Estuarine and coastal zone marine pollution by the nonionic alkylphenol ethoxylates endocrine disruptors: is there a potential ecotoxicological problem?" Environ Int **32**(2): 269-272.