

Evaluación del Impacto Toxicológico de los Contaminantes Emergentes en *Artemia salina* (Linnaeus, 1758)

Evaluation of the Toxicological Impact of Emerging Contaminants on *Artemia salina* (Linnaeus, 1758)

Gabriela Natalith Gómez Lima¹; Mireya Tapia Salazar² y Eduardo Alfredo Zarza Meza*¹

¹Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Región Poza Rica-Tuxpan, Universidad Veracruzana,

²Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

*ezarza@uv.mx

Recibido: 07/11/2023

Aceptado: 26/12/2023

DOI: 10.60113/ap.v9i18.128

RESUMEN

Los contaminantes emergentes, incluyendo fármacos y productos de uso personal, cada vez son encontrados con mayor frecuencia en medios acuáticos, incluidos ambientes marinos e hipersalinos. El objetivo de este estudio fue determinar el impacto toxicológico de las sustancias p-fenilendiamina, benzofenona y naproxeno a dos temperaturas (24 ° C y 30 ° C) y dos tiempos de exposición (24 y 48 horas) usando *Artemia salina* como modelo. La concentración letal (CL50) se determinó después de exponer a *Artemia* a diferentes concentraciones y la sobrevivencia fue considerada como la principal variable a evaluar. Los resultados obtenidos señalan la p-fenilendiamina y la benzofenona aumentan su toxicidad conforme incrementa la temperatura y el tiempo de exposición, mientras que la toxicidad del naproxeno fue afectada por el tiempo de exposición más no por la temperatura. No se observan diferencias significativas para interacción entre temperatura y tiempo de exposición para las sustancias evaluadas.

PALABRAS CLAVE: Toxicidad, contaminantes emergentes, CL50, *Artemia salina*

Abstract

Contaminants of emerging concern, including pharmaceuticals and personal care products, are increasingly been found in aquatic environments, including marine and hypersaline media. The objective of this study was to determine the toxicological impact of the substances p-phenylenediamine, benzophenone and naproxen at two temperatures (24 ° C and 30 ° C) and two exposition time (24 and 48 hours) using *Artemia salina* as model. The lethal concentration (LC50) was determined after exposure of *Artemia* to different concentration and considering survival as the main variable to evaluate. The results obtained indicate that p-phenylenediamine and benzophenone increase its toxicity as the temperature and exposition time increases, while naproxen toxicity was affected by the exposition time but not for the temperature. No significant differences for interaction between temperature and exposition time were observed for the substances evaluated.

Key words: Toxic, Emerging pollutants, CL50, *Artemia salina*

Introducción

El término contaminantes emergentes (CEs), ha sido ampliamente utilizado desde inicios del año 2000, e implica posibles riesgos que pudieran ocasionar estos compuestos tanto a seres humanos como al medio ambiente (Halden, 2015). Estos productos de origen farmacéutico, de cuidado personal, surfactantes, aditivos industriales, plastificantes, plaguicidas, así como una gran variedad de compuestos químicos, las concentraciones que se pueden encontrar en el medio ambiente oscilan entre valores de ng/L a µg/L (Kuster *et al.*, 2008). Su presencia en el medio ambiente se atribuye principalmente a la descarga de aguas residuales tratadas debido a la ineficiencia de los procesos secundarios y convencionales de degradarlos, residuos industriales o descargas urbanas, llegando a aguas superficiales tales como ríos, lagos, lagunas y zonas costeras (Petrie 2015; Ávila *et al.*, 2018). Por otro lado, algunos compuestos tienen la característica de pasar de aguas superficiales a aguas del subsuelo o bien transformarse en sustancias más tóxicas cuando están en el medio

ambiente (Barceló, 2008). Así mismo, la velocidad de transformación y/o eliminación se puede compensar debido a su continua introducción en el ambiente (Kuster et al., 2008).

Estos contaminantes entran al ambiente ya sea por procesos antropogénicos, o por procesos naturales o bien pueden intercambiarse entre los diferentes compartimentos medioambientales (sistema terrestre, acuático, aire y biota) en función de sus propiedades y las condiciones ambientales (Kümmerer, 2004; Jemba, 2006; Jones et al., 2004; Fent et al., 2006; Zuccato et al., 2006; SEMARNAT 2007; Gil et al., 2012).

Su concentración puede variar de acuerdo con la zona de muestreo, como: planta de tratamiento de aguas, ríos, lagos, lagunas, subsuelos, cercanía con poblaciones humanas etc. (Gil et al., 2012); para el caso del ibuprofeno se reportan valores de 5 ng/L a 2700 ng/L en aguas de río y de 5 ng/L a 85000 ng/L en aguas de efluentes de plantas de tratamiento de aguas (Öllers et al., 2001; Corcoran et al., 2010). Galindo-Miranda et al (2019) reportan en aguas colectadas de diferentes zonas de países alrededor del mundo una concentración de 2.9 a 323, 40-3462, 3.9-4820, 25-277, 1-163, 19-15,000, 1.7-3700 y 0.43-1168 ng/L para carbamezapina, diclofenaco, naproxeno bisfenol, triclosán, atrizina 17- β -estradiol, β -estradiol respectivamente.

Vieno et al (2005) reportan una mayor concentración de tres a cinco veces mayor en época de invierno que en verano y primavera para fármacos en agua proveniente de plantas de tratamiento. Un estudio realizado en Alemania entre 1996 a 1998, reportó la presencia de 55 fármacos en efluentes de plantas de tratamiento, Ternes et al (2004) reportan la presencia de 82 componentes de fármacos en un arroyo en Estados Unidos.

El tiempo de vida media de estos contaminantes en el medio ambiente es variado, siendo de 0.8 a 32 días en el aire y de 8 días a 40 días en agua, para la aspirina, paracetamol, ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco; siendo el paracetamol y el ibuprofeno los más persistentes. Santibáñez (2014) realizó una revisión de 134 artículos publicados entre los años 1997 y 2009, donde obtuvo que el grupo de anti-

inflamatorio es el más abundante en el ambiente con un 16% respecto a los demás grupos farmacéuticos.

El naproxeno se comercializó por primera vez como el medicamento recetado Naprosyn en 1976 y el naproxeno sódico se comercializó por primera vez bajo el nombre comercial de Anaprox en 1980. Este contaminante se ha reportado en diversas partes del mundo incluyendo aguas superficiales, efluentes de aguas de tratamiento de aguas residuales, aguas del subsuelo e incluso en suelo (McEachran et al., 2016).

La eficiencia de degradación de este compuesto depende del proceso empleado, Qurie *et al* (2015) observa una degradación del 80% de naproxeno después de 15 días de tratamiento cuando aguas residuales de una planta de tratamiento fueron sometidas a un proceso de micro y nano filtración. Mohamed *et al* (2018) observa una mayor degradación (<90%) después de exponerlo por 30 minutos a un proceso de fotocátalisis empleando nanopartículas elaboradas a base de dióxido de titanio y un composito de nano fibras cuando se empleó poli-acrilonitrilo (0%).

La p- fenilendiamina (PPD), también llamada 1,4-diaminobenceno o 1,4-fenilendiamina, se utiliza como componente de polímeros y compuestos de ingeniería, fibras de aramida, tintes para el cabello, productos químicos de caucho, tintes textiles, pigmentos, como reactivo de laboratorio y en revelado fotográfico, se presenta como un sólido blanco o ligeramente rojo o como cristales que se oscurecen con la exposición al aire; ligeramente soluble en agua.

Se emplea también como base de oxidación bases o intermediarios primarios en la composición de los tintes para cabello y algunos productos de uso personal como cremas aclarantes p-fenilendiamina, p-toluendiamina, o-cloro-p-fenildiamina, o-aminofenol y p-aminofenol son las bases más utilizadas en la industria (Cegarra,1987). La exposición a p-fenilendiamina por contacto dérmico en el cuero cabelludo es inevitable entre las personas cuyo cabello está teñido con tintes que contienen cualquiera de estas sustancias conocidas como bases primarias, alrededor del 40 por ciento de las

mujeres estadounidenses son usuarias habituales de tintes para el cabello (Corbett & Menkart, 1973). La degradación de este compuesto mediante un proceso de reacción fento, a una condición de pH 3.5, 50 mg/L peróxido de hidrogeno, 3 mg/L Fe²⁺ y en presencia de luz UV por un tiempo de 3 h se puede remover la p-fenilendiamina en un 54-71%.

Existen diferentes tipos de procesos químicos y físicos para la remoción de sustancias donde se tienen compuestos tóxicos de alto peso molecular, como la p-fenilendiamina, entre estos procesos se encuentran la ozonización, procesos oxidativos, procesos fotoquímicos, oxidación por hipoclorito de sodio, oxidación de curcubituril, destrucción electroquímica, adsorción, tratamiento con carbón activado, membrana de filtración, intercambio iónico, irradiación, entre otros. A pesar de tener un alto grado de remoción presentan desventajas debido a sus altos costos y generación de nuevos residuos (Robinson *et al.*, 2001).

La toxicidad acuática aguda se determina normalmente estudiando los resultados de la CL50 en peces tras una exposición de 96 horas, en crustáceos de 48 horas y para algas de 72 o 96 horas de CE50, estas especies se consideran representativas de todos los organismos acuáticos.

Este método es conocido como un ensayo de toxicidad aguda que cuantifican las concentraciones letales de un xenobiótico o sustancia a una especie en particular. El valor calculado se denomina concentración letal media (CL50), en un tiempo determinado que generalmente es de 48 o 96 horas (Benítez & Lesmes, 2014).

La concentración letal, efectiva o inhibitoria 50 (CL50/CE50/CI50), es la concentración que produce la respuesta esperada sobre el 50% de los organismos expuestos, se emplea para determinar el efecto tóxico de los contaminantes emergentes. Estas pruebas emplean concentraciones múltiples las cuales permiten calcular este valor a partir de la concentración a la cual el 50% de la población muere. Para estos estudios se recomiendan los siguientes métodos para la estimación de CL50/CE50/CI50: Método Probit (paramétrico), método de Litchfield-Wilcoxon (gráfico), método de Sperman-

Karber (no paramétrico) y/o método gráfico. Este método es el método más empleado para la evaluación de toxicidad de los CE en organismos acuáticos tales como crustáceos, microalgas, peces, etc. (Castillo, 2004).

Un lugar sobresaliente dentro del grupo de bioensayos más utilizados lo ocupa el género *Artemia*. es utilizada ampliamente ya que determina el efecto letal de materiales y sustancias en larvas de *Artemia* spp. (McLaughlin *et al.*, 1998; Fatope, 1995; Fatope *et al.*, 1993). El género *Artemia* está compuesto por varias especies, de las cuales se han identificado al menos cinco especies bisexuales y varias poblaciones partenogenéticas, entre ellas *Artemia salina*; *Artemia persimilis*; *Artemia franciscana* (bisexuales) y *Artemia partenogenética* (Serrano *et al.*, 1996; Varo *et al.*, 1998).

Entre estas las más relevantes son *A. franciscana* la cual tiene una gran importancia en la industria acuícola por sus resultados en la alimentación de larvas de peces y crustáceos (Delbare *et al.*; 1995) y que ha sido utilizada como un sistema de prueba para medir toxicidad de sustancias químicas, biológicas y para estudios en el desarrollo de la toxicología (Borowitz y McLaughlin, 1999; Fuentes *et al.*, 2011).

Este crustáceo se utiliza como organismo modelo dándole gran importancia en estudios de ecotoxicología en medios marinos e hipersalinos de contaminantes emergentes como son los compuestos farmacéuticos y las nanopartículas (Nunes *et al.*, 2006; Libralato, 2014).

En peces se ha reportado que los medicamentos β -bloqueadores tienen un efecto inhibitor de la actividad espermática de algunas especies (Jones *et al.*, 2004). Kwak *et al.* (2018) evaluaron la toxicidad crónica del naproxeno empleando *Daphnia magna* y *Moina macrocopa* y *Oryzias latipes*. Los efectos del naproxeno sobre las hormonas esteroides sexuales y la transcripción de genes relacionados con la esteroidogénesis también se evaluaron en células H295R. Se determinó que las concentraciones crónicas sin efecto observado (NOEC) de hormonas sexuales.

Materiales y Métodos

La investigación se realizó en condiciones de laboratorio, dentro del programa de Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológica de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Para el diseño experimental cada contaminante fue evaluado a dos temperaturas de incubación (24 y 30°C) con la finalidad de determinar si la temperatura modifica las concentraciones de la CL50 a un tiempo de exposición de 24 y 48 horas.

Para la evaluación del impacto toxicológico de los contaminantes emergentes de tipo farmacéutico y de uso personal, se emplearon las sustancias p-Phenylenediamine CAS: 106-50-3 $C_6H_8N_2$, Benzophenone CAS: 119-61-9 $C_{13}H_{10}O$ y Naproxeno CAS: 26159-34-2 $C_{14}H_{13}NaO_3$. en la especie modelo *Artemia salina*.

La eclosión de los quistes de *Artemia* se llevó a cabo utilizando agua marina preparada (29.90g/1000ml) y posteriormente 10ml de cloro, eclosionando después de 24 horas.

Se colocaron 10 Artemias por microplaca, y fueron colocadas a diferentes temperaturas (24 y 30°C) durante 24 y 48 horas. de exposición. Posteriormente se preparó un stock para cada sustancia a evaluar y a partir de esta se hicieron concentraciones crecientes para poder establecer la CL50 y se añadió a cada microplaca 230µL de las soluciones.

La CL50 se determinó empleando el programa Excel considerando el porcentaje de sobrevivencia inicial de *Artemias* con el porcentaje de sobrevivencia a las 24 y 48 h. Se determinó la fórmula de regresión de la curva ($r^2 > 0.90$) y se calculó el valor de la CL50. Al valor obtenido se le aplicó el antilogaritmo y se obtuvo la concentración a la cual moriría el 50% de la población. Se realizó un análisis factorial para determinar diferencias significativas entre los productos evaluados, el tiempo de exposición y la temperatura a la cual fueron evaluados, se utilizó el programa estadístico SPSS y un nivel de significancia ($P < 0.05$).

Resultados

Las condiciones de temperatura y de salinidad fue-

ron óptimas para esta especie, 5-250 g/L y de 6-35°C (Nunes *et al.*, 2006), teniendo un alto porcentaje de sobrevivencia de los organismos que se usaron como control negativo, donde el porcentaje de esta fue superior al 85%, por lo que los resultados obtenidos entre los diferentes productos evaluados fueron en base al efecto del contaminante sobre la sobrevivencia en *Artemia*.

En cuanto al cambio en los valores de CL50 para las diferentes concentraciones evaluadas y sustancias analizadas se establece que la presencia de contaminantes emergentes tales como la p-fenilendiamina, bezofenona y naproxeno afecta la sobrevivencia de *Artemia* y su toxicidad se ve incrementada por la temperatura y el tiempo de exposición; aunque para el naproxeno solamente el tiempo de exposición tuvo un efecto significativo sobre los valores de CL50.

En la figura 1 (A, B, C y D) se presentan los porcentajes de mortalidad de *A. salina* expuesta a diferentes concentraciones de p-fenilendiamina a diferentes condiciones de temperatura y tiempo de exposición.

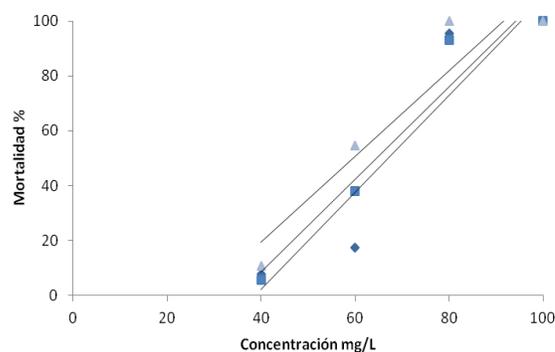


Figura 1 A

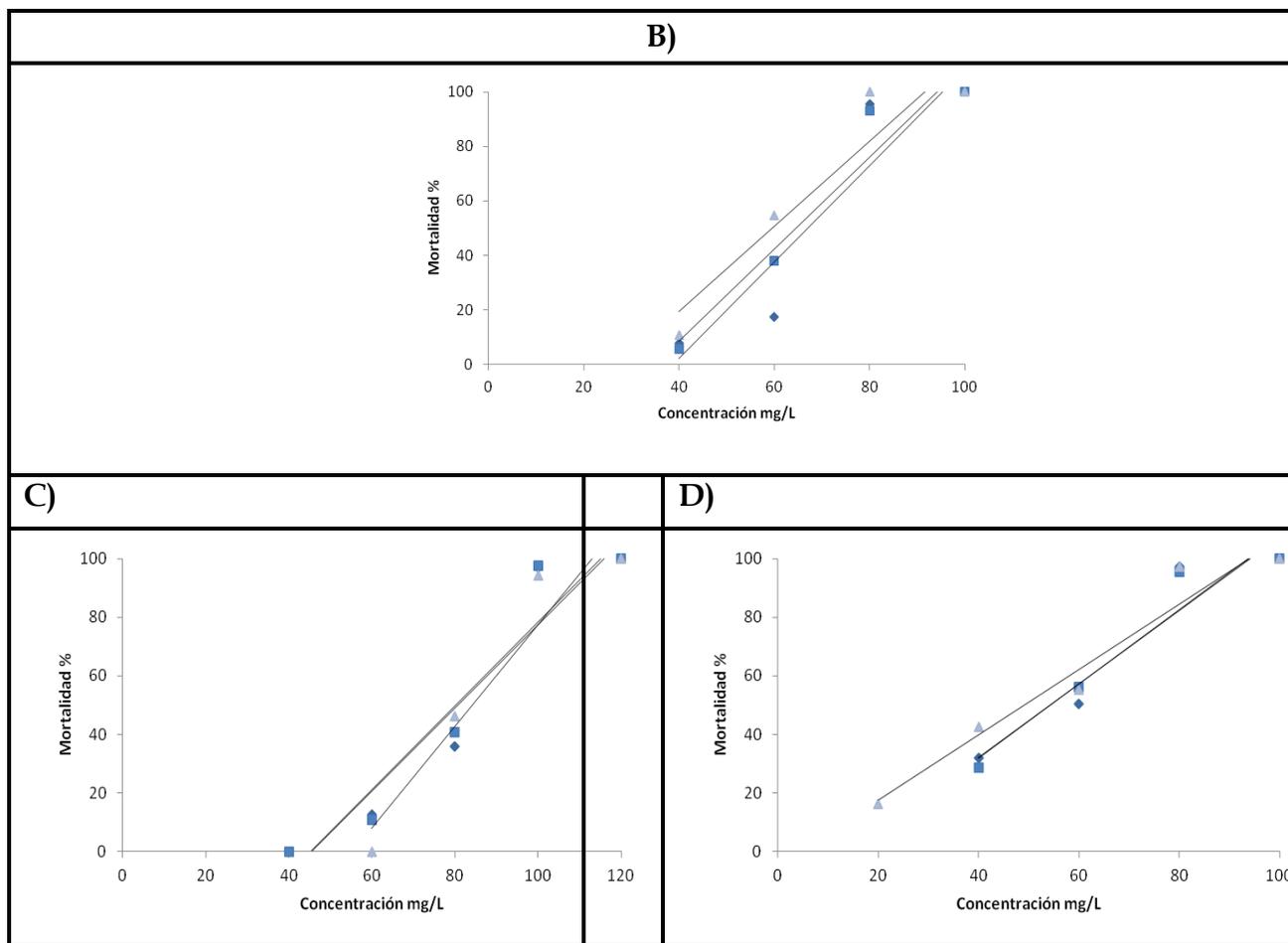


Fig. 1 Mortalidad de *Artemia salina* expuesta a p-fenilediamina a (A) 24°C durante 24 h, (B), 24°C por 48 h, (C) 30°C por 24 h y (D) 30°C por 48 h.

Estos datos fueron empleados para calcular los valores de CL50 a las diferentes condiciones ambientales evaluadas. La CL50 se calculó mediante regresión lineal para cada una de las diferentes condiciones evaluadas. En el cuadro 1 se presentan los valores de la fórmula de regresión, así como el valor de r^2 para cada una de las condiciones evaluadas para este contaminante, el valor de r^2 varío entre 0.84 a 0.96.

Al realizar el análisis del efecto de la temperatura y el tiempo de exposición podemos observar que tanto la temperatura como el tiempo afectaron de manera significativa ($P < 0.01$) los valores de la CL50 obtenida para el colorante p-fenilendiamina (Cuadro 2).

Conforme se incrementa la temperatura de exposición el valor promedio de la CL50 pasa de un valor de 67.8 a 57.9 mg/L; mientras que para el factor tiempo de exposición los valores de CL50 pasaron de 75.5 mg/L a 50.1 mg/L a un tiempo de exposición de 24 y 48 h respectivamente. No se observan diferencias significativas ($P > 0.05$) para la interacción de los parámetros evaluados.

Cuadro 1.- Ecuación de las diferentes regresiones para p-fenilendiamina

Temp. (°C)	Tiempo de incubación (h)	y- a + bx (R ²)
24	24	y = 297.6x - 519.84 (R ² = 0.9687) y = 297.76x - 523.88 (R ² = 0.9608) y = 212.16x - 345.88 (R ² = 0.9117)
	48	4) y = 263.23x - 414.55 (R ² = 0.8417) 5) y = 256.76x - 399.07 (R ² = 0.951) 6) y = 242.63x - 366.71 (R ² = 0.9468)
30	24	1) y = 232.06x - 377.06 (R ² = 0.8689) 2) y = 234.7x - 381.16 (R ² = 0.8813) 3) y = 353.33x - 612.58 (R ² = 0.9595)
	48	4) y = 189.83x - 268.94 (R ² = 0.9149) 5) y = 193.44x - 275.19 (R ² = 0.9578) 6) y = 125.44x - 148.62 (R ² = 0.9192)

Cuadro 2.- Valor de la CL50 de la p-fenilendiamina a dos temperaturas y dos tiempos de exposición en *Artemia salina*

Temperatura (°C)	Tiempo de incubación (h)	CL50 (□±sd)
24	24	80.1±5.9
	48	55.5±3.1
	Total	67.8±14.1
30	24	71.0±3.5
	48	44.7±5.6
	Total	57.9±15.0
Total	24	75.5±6.6
	48	50.1±7.1
	Total	62.8±14.8
Probabilidades análisis factorial		
	Temperatura	0.006
	Tiempo de exposición	0.000
	Interacción	0.721

□ = promedio, sd = desviación estándar

Al realizar el análisis anova de una vía entre las diferentes condiciones evaluadas, se observó que la condición de 24 h ya sea a 24 ó 30°C presentan los mayores valores de CL50= 80.1 y 71 mg/L, conforme se incrementa el tiempo de exposición este se reduce a 55.5 y 44.7 mg/L respectivamente, lo cual demuestra que la

toxicidad del compuesto evaluado aumenta con el tiempo de exposición y no con las condiciones de temperatura (Figura 2). Para el caso del control no contaminado el porcentaje de sobrevivencia vario entre 85 a 100% entre todos los replicados evaluados.

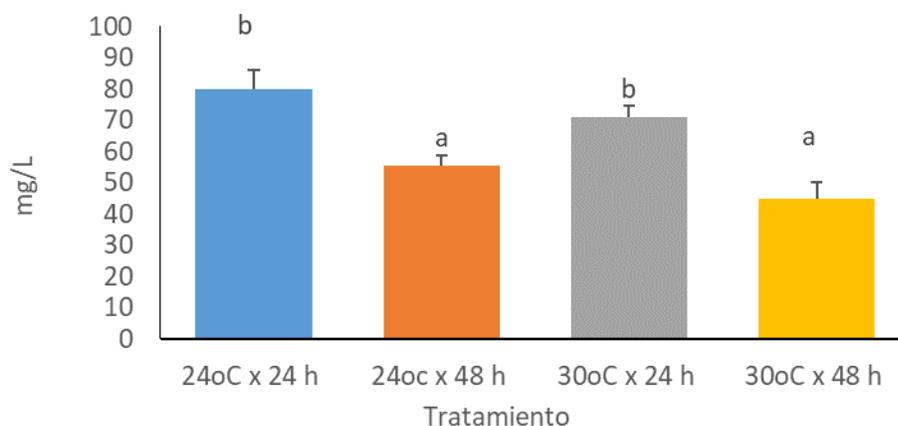
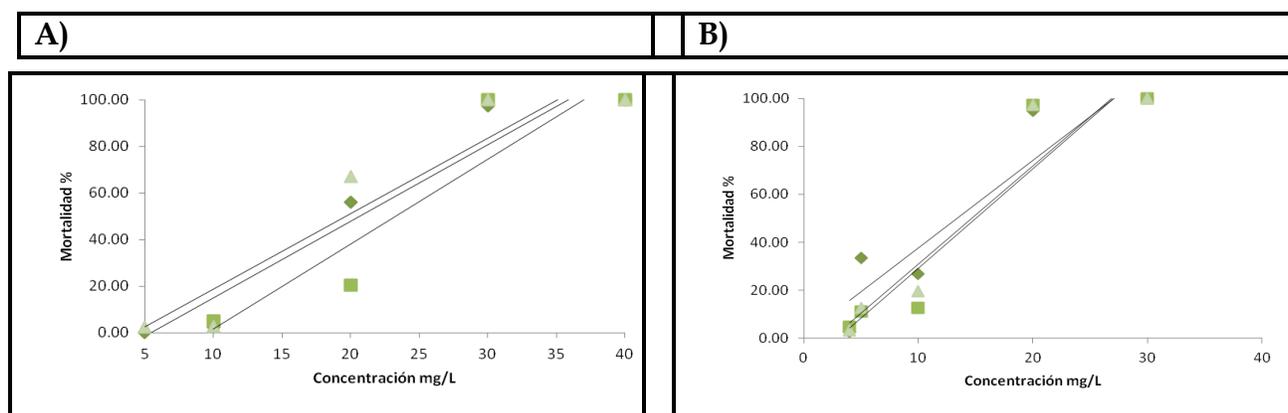


Fig.2 Efecto de la presencia de p-fenilenediamina sobre los valores de CL50 en *Artemia salina* expuesta durante 24 y 48 h a una temperatura de 24 y 30°C.

En la figura 3 (A, B, C Y D) se presentan los porcentajes de mortalidad de *A. salina* expuesta a diferentes concentraciones de benzofenona a una temperatura 24 y 30°C y a 24 y 48h de exposición respectivamente. Los datos fueron empleados para

calcular los valores de CL50 a las diferentes condiciones ambientales evaluadas. La CL50 se calculó mediante regresión lineal para cada una de las concentraciones.



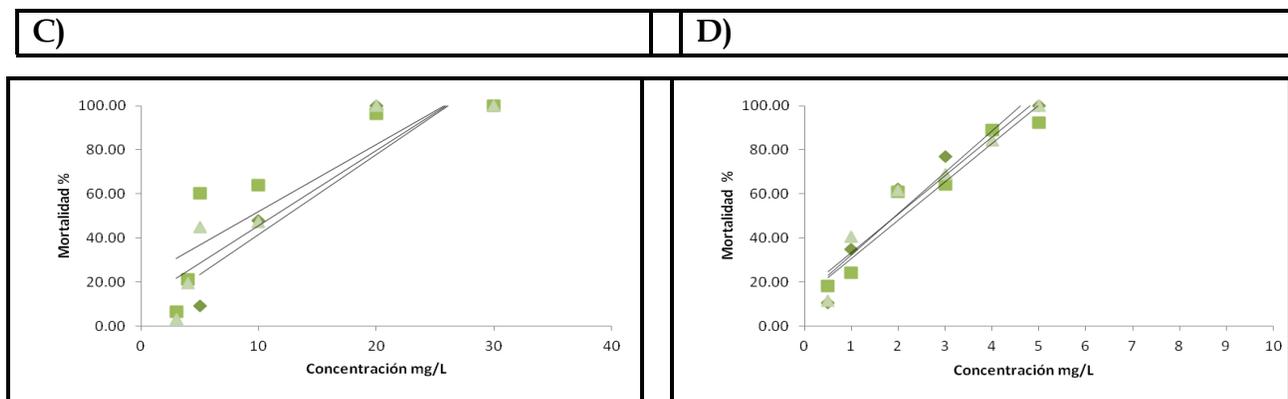


Fig.3 Mortalidad de *Artemia salina* expuesta a benzofenona a (A) 24°C durante 24 h, (B), 24°C por 48 h, (C) 30°C por 24 h y (D) 30°C por 48 h.

En el cuadro 3 se presentan los valores de la fórmula de regresión, así como el valor de r^2 para cada una de las condiciones evaluadas

de dicho contaminante. Para este contaminante, los valores de r^2 fueron de 0.83 a 0.99.

Cuadro 3.- Ecuación de las regresiones para benzofenona

Temperatura (°C)	Tiempo de incubación (h)	y- a + bx (R^2)
24	24	y = 127x - 99.445 ($R^2 = 0.908$) y = 177.44x - 177.01 ($R^2 = 0.8316$) y = 127.36x - 96.559 ($R^2 = 0.9024$)
	48	4) y = 108.1x - 55.742 ($R^2 = 0.8516$) 5) y = 120.5x - 73.652 ($R^2 = 0.8588$) 6) y = 120.51x - 72.309 ($R^2 = 0.8948$)
30	24	1) y = 126.16x - 73.132 ($R^2 = 0.9559$) 2) y = 89.821x - 22.402 ($R^2 = 0.8924$) 3) y = 96.816x - 34.295 ($R^2 = 0.9316$)
	48	4) y = 88.373x + 38.523 ($R^2 = 0.9982$) 5) y = 79.707x + 36.941 ($R^2 = 0.9415$) 6) y = 79.487x + 40.419 ($R^2 = 0.9501$)

Con el análisis factorial del efecto de la temperatura y el tiempo de exposición se observó que tanto la temperatura como el tiempo afectaron de manera significativa ($P < 0.01$) la CL50 (Cuadro 4). Conforme se incrementa la temperatura el valor promedio de la CL50 pasa de un valor de 13.9 mg/L a 4.6 mg/L para 24 y 30 °C respectivamente; mien-

tras que para el factor tiempo de exposición los valores de CL50 pasaron de 11.9 mg/L a 5.7 mg/L a un tiempo de exposición de 24 y 48 h respectivamente. No se observan diferencias significativas ($P > 0.05$) para la interacción de los parámetros evaluados

Cuadro 4.- Valor de la CL50 de la benzofenona a dos temperaturas y dos tiempos de exposición en *Artemia salina*

Temperatura (°C)	Tiempo de incubación (h)	LC50 ($\bar{x} \pm sd$)
24	24	16.1±2.6
	48	10.1±0.6
	Total	13.1±3.7
30	24	7.8±1.7
	48	1.4±0.1
	Total	4.6±3.7
Total	24	12.0±4.9
	48	5.8±4.8
	Total	8.9±5.7
Probabilidades análisis factorial		
	Temperatura	0.000
	Tiempo de exposición	0.000
	Interacción	0.779

Al realizar el anova de los tratamientos evaluados se observa que la condición de 24°C por 24 h presenta el valor mayor de CL50 (16.1 mg/L), seguido de las condiciones de 24°C por 48 h y 30°C 24 h

(10.1 y 7.8 mg/L respectivamente) y la condición de 30°C a 24 h de exposición presento la condición con mayor toxicidad con un valor de 1.4 mg/L (Figura 4).

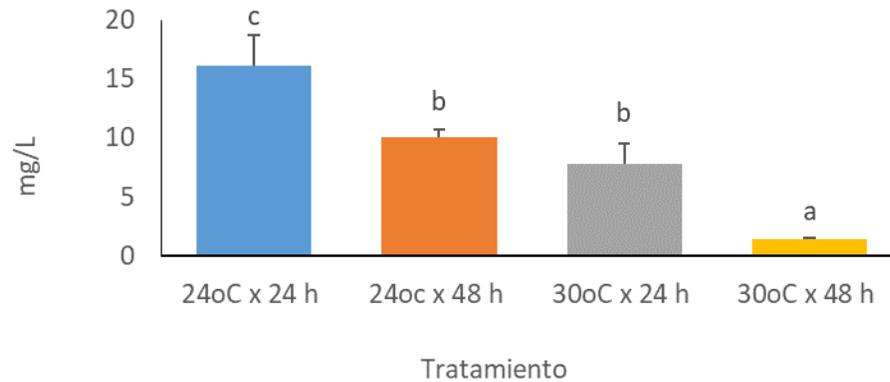


Fig.4 Efecto de la presencia de benzofenona sobre los valores de CL50 en *Artemia salina* expuesta durante 24 y 48 h a una temperatura de 24 y 30°C.

En la figura 5 (A, B, C y D) se presentan los porcentajes de la mortalidad de *Artemia salina* al ser expuesta a diferentes concentraciones del antiinflamatorio naproxeno con diferentes condiciones de temperatura y tiempo de exposición. Los datos obtenidos fueron empleados para calcular los valores de CL50 para cada una de las condiciones evalua-

das. La CL50 se calculó mediante regresión lineal para cada una de las diferentes condiciones evaluadas. En el cuadro 12 se presentan los valores en base a la fórmula de regresión y los valores de r^2 para cada una de las condiciones evaluadas, en el cual el valor de r^2 se encontró entre los valores 0.92 a 0.97.

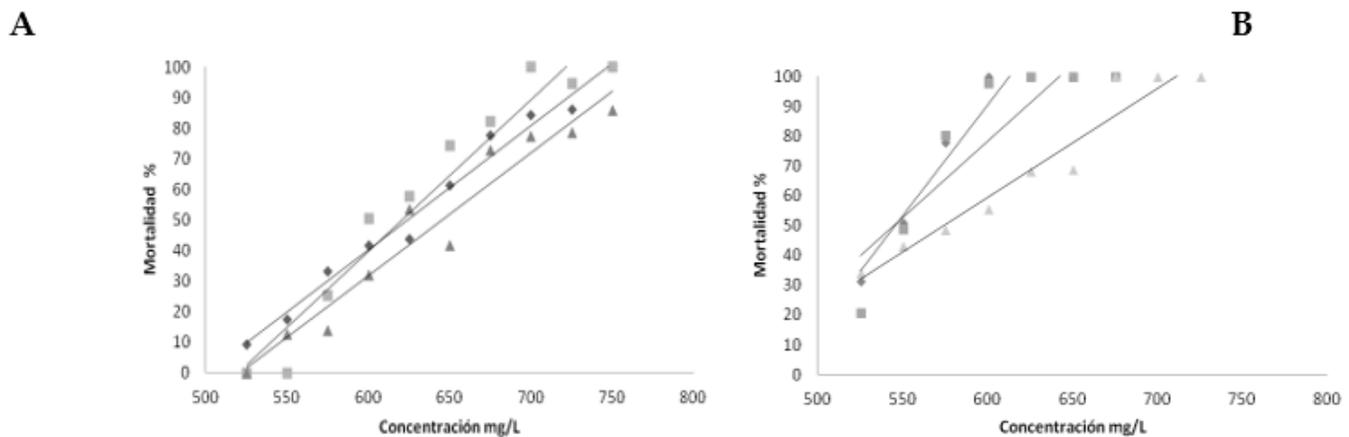
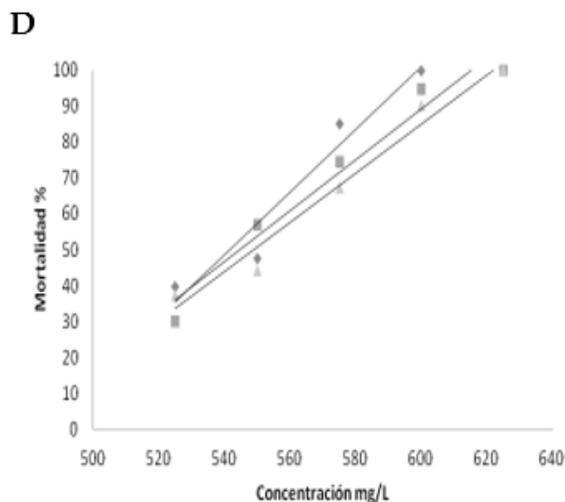
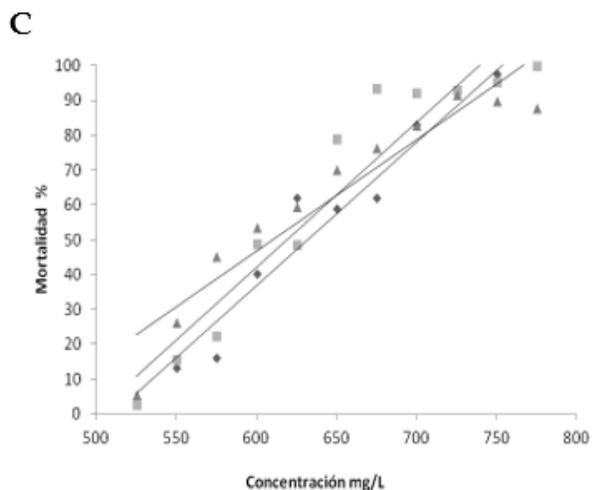


Fig.5 Mortalidad de *Artemia salina* expuesta al compuesto naproxeno a (A) 24°C durante 24 h, (B), 24°C por 48 h, (C) 30°C por 24 h y (D) 30°C por 48 h.



En el cuadro 5 se presentan los valores en base a la fórmula de regresión y los valores de r^2 para cada una de las condiciones evaluadas,

en el cual el valor de r^2 se encontró entre los valores 0.92 a 0.97.

Cuadro 5.- Ecuación de las diferentes regresiones para naproxeno.

Temperatura (°C)	Tiempo de incubación (h)	y- a + bx (R ²)
24	24	y = 604.25x - 1615.9 (R ² = 0.97839)
		y = 728.85x - 1957.1 (R ² = 0.9522)
		y = 587.14x - 1576.9 (R ² = 0.9481)
	48	4) y = 990.27x - 2624.1 (R ² = 0.9479)
		5) y = 1102.2x - 2931.3 (R ² = 0.9373)
		6) y = 522.42x - 1371.8 (R ² = 0.9359)
30	24	1) y = 612.29x - 1641.6 (R ² = 0.9587)
		2) y = 625.28x - 1671.8 (R ² = 0.9335)
		3) y = 482.11x - 1274.5 (R ² = 0.9271)
	48	4) y = 1123.8x - 2981.1 (R ² = 0.938)
		5) y = 940.8x - 2490 (R ² = 0.9671)
		6) y = 902.22x - 2388.5 (R ² = 0.9679)

Mediante el análisis factorial realizado del efecto de la temperatura y el tiempo de exposición se observó que sólo el tiempo de exposición afectó de manera significativa ($P < 0.01$) la CL50 (Cuadro 6). Conforme se incrementa el tiempo de exposición el valor promedio de la CL50 pasa de un valor de 572 mg/L a 506.4 mg/L para 24 y 30 °C respecti-

vamente.

El factor temperatura no afectó de manera significativa los valores obtenidos, siendo estos de 544.0 y de 534.7 mg/L respectivamente. No se observan diferencias significativas ($P > 0.05$) para la interacción de los parámetros temperatura y tiempo.

Cuadro 6.- Valor de la CL50 del naproxeno a dos temperaturas y dos tiempos de exposición en *Artemia salina*.

Temperatura (°C)	Tiempo de incubación (h)	LC50 (□±sd)
24	24	576.3±12.1
	48	511.7±13.2
	Total	544.0±37.1
30	24	568.3±10.2
	48	501.1±3.2
	Total	534.7±37.4
Total	24	572.3±10.9
	48	506.4±10.4
	Total	539.4±35.9
Probabilidades análisis factorial		
	Temperatura	0.163
	Tiempo de exposición	0.000
	Interacción	0.829

Al realizar el anova de los tratamientos evaluados se observa que las condiciones de 24°C a 24 h y de 30°C a 24 h presentaron un valor mayor de CL50 con valores de 576.3 mg/L y de 568.3 mg/L respectivamente, seguido de

las condiciones de 24°C a 48 h y de 30°C a 48 h donde las CL50 fueron de 511.7 y de 501.1 mg/L respectivamente (Figura 5).

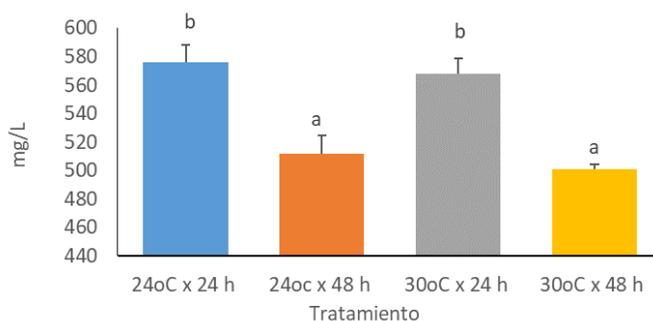


Fig.5 Efecto del compuesto naproxeno sobre los valores de CL50 en *Artemia salina* expuesta durante 24 y 48 h a una temperatura de 24 y 30°C.

DISCUSIÓN

Los tintes para el cabello son, semi-permantes y permantes, siendo estos últimos los más empleados (85%) para los tintes de cabello alrededor del mundo (Hundari *et al.*, 2014; Zanoni *et al.*, 2015). El proceso de coloración se lleva a través de reacciones de oxidación, las cuales ocurren entre aminas aromáticas y son sustituidas por la p-fenilendiamina, el p-toluendiamina y algunos derivados aromáticos sustituidos con grupos amino e hidroxilo tales como el resorcino (Bessegato *et al.*, 2018). La p-fenilendiamina es un colorante empleado en la fabricación de tintes para el cabello y generalmente se ha relacionado con problemas de alergias por contacto en piel (Han *et al.*, 2018).

La toxicidad reportada por la presencia de p-fenilendiamina y la p-fenilentiaramina este compuesto se piensa que ocurre debido a que cuando se oxidan y reaccionan con otros compuestos forman compuestos con múltiples anillos (Bessegato *et al.*, 2018).

Los productos que se generan de la oxidación de la p-fenilendiamina son el cation radical diimina semibenzoquinona, el dimerico del catión radical diimina semibenzoquinona, diimina para-benzoquinona, para-benzoquinona, para-nitroanilina, 4-aminofenil formamida, 4,4'-diamino-azobenzene, 2-(1,4-benzoquinona diimina)-1,4-benzoquinona diimina, 2-(4'-aminoaniline)-5-hidroxi1,4-benzoquinone diimina, 2-(4'-aminoaniline)-1,4-diaminobenzene, Bandrowski's base N',N'-bis-(4-aminofenil)-2,5-diamino-1,4-benzoquinona diimina (Meyer & Fischer, 2015). Existen muy pocos estudios donde se reporta la toxicidad de colorantes en organismos acuáticos, Pauli y Berger (2000) reportan un valor de LC50 2 mg/L para el ciliado *Tetrahymena pyriformis* expuesto por 24 h a 25°C.

La CL50 evaluada en microalgas y bacterias es a través de la determinación de la CL50 basada en la inhibición del crecimiento. Para la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* y la bacteria *Vibrio fischeri* se reporta un valor de CL50 de 0.80 y 0.24 mg/L para un tiempo de exposición de 72 y 96 h respectivamente y de 37.5 mg/L a 30 min de exposición (hoja de seguridad para la p-fenilenediamina de Thermo Fischer, 2018)

En crustáceos como *Daphnia magna* los valores reportados van de >0.4 mg/L a 0.25-1.4 mg/L para un tiempo de exposición de 24 y 48 h (hoja de seguridad de Thermo Fisher; 2018)

En el presente estudio, los valores de CL50 de *Artemia* expuesta a este compuesto fueron afectadas por el tiempo de exposición, así como por la temperatura, los valores tienden a reducirse tanto por el tiempo de exposición como por la temperatura. Se ha reportado que en embriones de pez cebra expuestos a 250 µg/mL de p-fenilendiamina produce un aumento en la taza cardiaca y edemas en el saco vitelino, mientras que la concentración de 500 µg/mL causa 100% de mortalidad después de 24 de exposición (Oh *et al.*, 2018).

Las sustancias reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) son moléculas radicales y no radicales que son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos a radicales libres (Avello & Suwalsky, 2006) y en organismos acuáticos que han sido sometidos a la presencia de contaminantes tales como p-fenilendiamina puede ocasionar un inbalance del estado redox en las células o tejidos en larvas de pez cebra y que al incluirse algunos compuestos activos tales como extractos de macroalga (5-7% de *E. cava*) se puede llegar a reducir la producción de ROS (Oh *et al.*, 2018). La producción de ROS es regulada por la actividad de enzimas antioxidantes, tales como la catalasa CAT, la superoxidodismutada (SOD) y el glutatión peroxidasa (GPx); donde la CAT y la GPx son las responsables de la desintoxicación de peróxidos, mientras la SOD es la responsable de proteger a los tejidos contra los radicales aniones superóxidos (Livingstone, 2001; Nunes *et al.*, 2006). Con el incremento del ROS también se alteran otros procesos tales como la peroxidación lipídica la cual resulta en un detrimento del sistema antioxidante en los organismos (Livingstone *et al.*, 1993). Estas modificaciones tanto en el aumento del ROS, alteración del sistema antioxidante y la generación de otras sustancias repercuten directamente sobre otros procesos tales como el sistema inmune, donde se ha visto que un incremento en el ROS ocasionado por un estrés a cambios de pH causa daño y mortalidad de los hemocitos en camarón *L.*

vannamei (Wang *et al.*, 2009). Es muy probable que las *Artemias* estén presentando un aumento en la cantidad de ROS las cuales estarían afectando el sistema antioxidante además de la generación de compuestos tóxicos provenientes de la oxidación de lípidos los cuales repercuten directamente sobre la sobrevivencia.

Por su parte la benzofenona es un compuesto aromático, cristalino e insoluble en agua, que actúa como filtro para las radiaciones UV (Brausch & Rand, 2011; Gago-Ferrero *et al.*, 2013). Los niveles de inclusión de este compuesto varían entre un 0.5 a 10%, aunque pueden llegar hasta una inclusión del 25% en algunos países (Fent *et al.*, 2006), se le atribuyen efectos como disrupción hormonal principalmente en peces, así como inhibición del crecimiento en algas, y uno de los problemas con mayor auge en la actualidad el blanqueamiento coralino, la degradación del compuesto oscila entre 1 y 10 días. Sin embargo, su liberación constante al medio ambiente por descarga de aguas residuales, lixiviados de los vertederos industriales, desechos de aguas de regaderas ó su introducción directa debido al turismo puede darles un carácter pseudo persistente (Badia-Fabregat *et al.*, 2012).

Los productos que se generan de la degradación de este compuesto son la 2,4-dihidroxibenzofenona, la 2,2'-dihidroxi-4-metoxibenzofenona, la 2,4-dihidroxibenzofenona, la 2,2'-dihidroxi-4-metoxibenzofenona y la 2, 3,4-trihidroxibenzofenona (Felix *et al.*, 1998).

Du *et al* (2017) reportan valores de CL50 de 2.98, 1.09 y 3.98 mg/L para la microalga *Chorella vulgaris*, el crustáceo *Daphnia magna* y el pez *Brachydanio rerio* expuestos a benzofenona-3 y de 201, 47.4 y 633 mg/L respectivamente cuando fueron expuestos a benzofenona-4. Tsui *et al* (2014) reportan valores de 1.67 mg/L para *Daphnia magna* y de la microalga *Desmodesmus subspicatus* de 1.67 y 0.96 mg/L después de 48 y 72 h de exposición respectivamente. Zhang *et al.* (2017) reporta valores de LC50 para bacterias tales como *Vibrio fishery*, *Salmonella typhimurium* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* después de un tiempo de exposición de 15 min, 2 y 24 h de 18.85, 10.6 y 0.48 mg/L. No se encontraron antecedentes para *Artemia salina*, sin embargo, los valores obtenidos de CL50 coinciden con los repor-

tados para otras especies.

Para contaminantes de uso farmacéutico fue evaluado el compuesto naproxeno el cual es uno de los antiinflamatorios no esteroides ampliamente utilizados a nivel mundial (Aus der Beek *et al.*, 2016) cuando este se degrada se generan el metabolito dismetil naproxeno y sus conjugados (Segre, 1975), los cuales no se eliminan de manera eficiente en los procesos de tratamientos de aguas residuales y agua purificada (Kibuye *et al.*, 2019).

Los valores reportados de la CL50 sobre el efecto de naproxeno en los renacuajos de rana temporaria varía de 115-218 mg/L, 143-164 mg/L y de 121-136 mg/L para un periodo de exposición de 48, 72 y 96 h a una temperatura de 21°C (Cory *et al.*, 2019).

Isidori *et al* (2005) reportan valores de CL50 para el rotífero *B. calyciflours*, el crustáceo *T. platyurus* y la pulga de agua *C. dubia*, para el naproxeno y su sal de 84 y 66 mg/L para el naproxeno, de 54, 43 y de 63 mg/L para la sal de naproxeno en *B. calyciflours*, *T. platyurus* y *C. dubia* respectivamente. Estos mismos autores determinaron la toxicidad de cuatro fotoproductos generados por la degradación de este compuesto y observan que la toxicidad de estos es mucho mayor que el naproxeno y su sal, los valores variaron entre 4.5 a 14.5 mg/L, de 5.3 a 4.0 y de 6.3 a 16.7 mg/L para *B. calyciflours*, *T. platyurus* y *C. dubia* respectivamente.

En el caso del microcrustáceo *Daphnia magna* se han reportado valores de CL50 de 101.2 mg/L. Cleuvers (2004) reporta valores de CL50 para el naproxeno de 166 y de 625 mg/L para el crustáceo *Daphnia magna* y del alga verde plantónica *D. subspicatus*, Kwak *et al* (2018) reportan un valor de CL50 para *D. magna* y *Moina macrocopa* de 85.3 y de 74.4 mg/L respectivamente después de 48 h de exposición. En el presente estudio los valores de la CL50 oscilaron entre 501 a 576 mg/L podría compararse con la CL50 mencionada por Calleja *et al.*, 1994 donde fue de 577mg/L en *Artemia salina* para el compuesto paracetamol, el cual se encuentra dentro de los AINEs mismo grupo al que pertenece el naproxeno. Sin embargo, estos valores están muy por encima de valores reportados para el naproxeno en crustáceos tales como *D. magna*, *T. platyurus*, *C. dubia* y

y *B. calyciflous* con valores menores a 84 mg/L. Estas diferencias pudieran estar ligadas a la sensibilidad de la especie para este compuesto. El aumento en la toxicidad del compuesto independientemente de la temperatura pudiera estar ligado a la generación de los metabolitos de este compuesto al degradarse a través del tiempo, donde se ha reportado que los metabolitos de naproxeno son más tóxicos que este y/o su sal (Isidori *et al.*, 2005).

De acuerdo con Du *et al* (2017) quienes reportan criterios de clasificación de prueba de toxicidad para poder clasificar su impacto en organismos acuáticos tales como algas, crustáceos y peces; indicando una toxicidad elevada cuando los valores de la CL50 fueron menores 1 mg/L, toxicidad alta cuando los valores de CL50 varían entre 1 a 10 mg/L, toxicidad media cuando los valores de CL50 oscilen entre 10-100 mg/L y toxicidad muy baja cuando los valores de CL50 fueran mayores a 100 mg/L.

CONCLUSIÓN

La exposición a los compuestos p-fenilendiamina, benzofenona y naproxeno afecta la sobrevivencia de *A. Salina*.

Los parámetros evaluados temperatura y tiempo de exposición no tienen ninguna interacción significativa entre sí, sin embargo, ambos parámetros por su parte afectan la toxicidad de los compuestos. Una temperatura = o >30°C y un tiempo de exposición igual o mayor a 48h provoca que tanto el compuesto benzofenona como la p-fenilendiamina aumenten su toxicidad causando la muerte del 50% de la población de *A. salina*.

Mientras que para el compuesto naproxeno la temperatura no fue un factor determinante en el aumento del nivel de toxicidad, pero si el factor tiempo de exposición teniendo un incremento de toxicidad después de 48h de exposición, esto podría atribuirse al surgimiento de metabolitos más tóxicos debido a la degradación del compuesto. En el presente estudio se observó que para el caso de la p-fenilendiamina y el naproxeno el grado de toxicidad es bajo, mientras que para el caso de la benzofenona el grado de toxicidad observado fue de medio a alto, dependiendo de las condiciones de la

experimentación.

La importancia de conocer el efecto que tienen los CE en los organismos acuáticos radica en que los datos obtenidos son utilizados como indicadores ecológicos, permitiendo conocer el efecto que tendrá la presencia de estos compuestos para los organismos que habitan en el medio acuático e inclusive en la salud de los humanos.

Se sugieren nuevas investigaciones sobre el compuesto p-fenilendiamina y los efectos de este en organismos de prueba para el medio acuático, debido a la escasa información disponible actualmente.

BIBLIOGRAFÍA

- Aus der Beek, T., Weber, F.-A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., & Küster, A. (2016). Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives: Pharmaceuticals in the global environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(4), 823-835.
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea* (Concepción), (494).
- Badia-Fabregat, M., Rodríguez-Rodríguez, C, E., Gago-Ferrero, P., Olivares, A., Piña, B., Díaz-Cruz, M, S. & Caminal, G. (2012). Degradation of UV filters in sewage sludge and 4-MBC in liquid medium by the ligninolytic fungus *Trametes versicolor*. *Journal of Environmental Management*, 104, 114-120.
- Benítez, B, M, E & Lesmes, M, J, L. (2014). DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL 50 (CL50) DE TRES INSECTICIDAS DE USO DOMÉSTICO CON EL MISMO PRINCIPIO ACTIVO. Universidad Santo Tomás Facultad de Ingeniería Ambiental Sitio web: <https://pdfs.semanticscholar.org/5c53/8186b5d1ccd7085b03aa5c996356d15ac03d.pdf> Acceso 01 Noviembre 2019.
- Brausch, J, M. & Rand, G, M. (2011). A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere*, 82(11), 1518-1532.

- Bessegato, G. G., D'Souza, J. C., Carvalho, D., Cardoso, M. V. (2018) Assessment of several advanced oxidation processes applied in the treatment of environmental concern constituents from a real hair dye wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Vol. 6, Issue 2, Pags 2794-2802
- Borowitz, J. L. & McLaughlin, J. L. (1999). Evidence for calcium channels in brine shrimp: Diltiazem protects shrimp against cadmium. In: *Bull. Environ. Contam. Toxicol. Prudue Univ., Sch. Pharm. And Pharm. Sci., USA*. 48: 435-440.
- Calleja MC, Persoone G, Geladi P 1994. Comparative acute toxicity of the first 50 Multicentre Evaluation of *in vitro* cytotoxicity chemicals to aquatic non-vertebrates. *Arch Environ Con Tox* 26: 69-78.
- Castillo, M. G. (2004). Ensayo de toxicidad crónica con *Selenastrum capricornutum*. En *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones* (189pp). México: Gabriela Castillo, IMTA.
- Cegarra, J., Puente, P., & Valldeperas, J. (1992). *Fundamentos científicos y aplicados de la tinción de materias textiles*. Barcelona: Universidad Politécnica de Barcelona. 756pp.
- Cleuvers, M. (2004). Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59(3), 309-315.
- Corbett JF and Menkart J (1973) Hair colouring. *Cutis* 12:190-193.
- Cory, W. C., Welch, A. M., Ramirez, J. N., & Rein, L. C. (2019). Naproxen and Its Phototransformation Products: Persistence and Ecotoxicity to Toad Tadpoles (*Anaxyrus terrestris*), Individually and in Mixtures. *Environmental Toxicology and Chemistry*
- Delbare, D., Lavens, P. & Soregloos, P. (1995). Clownfish as a Reference Model for Nutritional Experiments and Determination of Egg/larval Quality. *European Aquaculture Society, Trondheim, Norway*, 22-25pp.
- Du, Y., Wang, W.-Q., Pei, Z.-T., Ahmad, F., Xu, R.-R., Zhang, Y.-M., & Sun, L.-W. (2017). Acute Toxicity and Ecological Risk Assessment of Benzophenone-3 (BP-3) and Benzophenone-4 (BP-4) in Ultraviolet (UV)-Filters. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(11), 1414.
- Fatope, M. O., Ibrahim, H., & Takeda, Y. (1993). Screening of Higher Plants Reputed as Pesticides Using the Brine Shrimp Lethality Assay. *International Journal of Pharmacognosy*, 31(4), 250-254.
- Fatope, M. O. (1995). Phytocompounds: Their Bioassay and Diversity. *Discov. Innov.* 7(3):229 - 236.
- Felix, T., Hall, B. J., & S. Brodbelt, J. (1998). Determination of benzophenone-3 and metabolites in water and human urine by solid-phase microextraction and quadrupole ion trap GC-MS. *Analytica Chimica Acta*, 371(2-3), 195-203.
- Fuentes, H., Rojas De Gascue, B., Rojas De Astudillo, L., Bucarito, J. & Prin, J. L. (2011). Distribución, comportamiento y toxicidad de metales pesados en el agua de poro de los sedimentos superficiales del Saco del Golfo de Cariaco, Estado Sucre, Venezuela. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 27:5-17.
- Gago-Ferrero, P., Alonso, M. B., Bertozzi, C. P., Marigo, J., Barbosa, L., Cremer, M. & Barceló, D. (2013). First Determination of UV Filters in Marine Mammals. Octocrylene Levels in Franciscana Dolphins. *Environmental Science & Technology*, 47(11), 5619-5625.
- Haman, C., Dauchy, X., Rosin, C. & Muñoz, J.-F. (2015). Occurrence, fate and behavior of parabens in aquatic environments: A review. *Water Research*, 68, 1-11.
- Han, J. H., Lee, H. J., Bang, C. H., Lee, J. H., Park, Y. M., & Lee, J. Y. (2018). P-Phenylenediamine Hair Dye Allergy and Its Clinical Characteristics. *Annals of Dermatology*, 30(3), 316.
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Parrella, A., Previtera, L., & Rubino, M. (2005). Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products. *Science of The Total Environment*, 348(1-3), 93-101.
- Kibuye, F. A., Gall, H. E., Elkin, K. R., Swistock, B., Veith, T. L., Watson, J. E., & Elliott, H. A. (2019). Occurrence, Concentrations, and Risks of Pharmaceutical Compounds in Private Wells in Central Pennsylvania. *Journal of Environment Quality*, 48(4), 1057.

- Kwak, K., Ji, K., Kho, Y., Kim, P., Lee, J., Ryu, J., & Choi, K. (2018). Chronic toxicity and endocrine disruption of naproxen in freshwater waterfleas and fish, and steroidogenic alteration using H295R cell assay. *Chemosphere*, 204, 156–162.
- Libralato, G. (2014). The case of *Artemia* spp. In nanoecotoxicology. *Marine Environmental Research*, 101, 38–43.
- Livingstone DR (2001) Contaminated-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar Pollut Bull* 42:656–666.
- Livingstone DR, Lemaire P, Matthews A, Peters L, Bucke D, Law RJ (1993) Pro-oxidant, anti-oxidant and 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity responses in liver of dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals. *Mar Pollut Bull* 26:602–606.
- Lu, Y., & Yu, J. (2019). A Well-Established Method for the Rapid Assessment of Toxicity Using *Artemia* spp. Model. In *Hazardous Wastes*.
- McEachran, A. D., Shea, D., Bodnar, W., & Nichols, E. G. (2016). Pharmaceutical occurrence in groundwater and surface waters in forests land-applied with municipal wastewater: Pharmaceuticals and municipal wastewater land application. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(4), 898–905.
- McLaughlin, J. L., Rogers, L. L., & Anderson, J. E. (1998). The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals. *Drug Information Journal*, 32(2), 513–524.
- Mohamed, A., Salama, A., Nasser, W. S., & Uheida, A. (2018). Photodegradation of Ibuprofen, Cetirizine, and Naproxen by PAN-MWCNT/TiO₂-NH₂ nanofiber membrane under UV light irradiation. *Environmental Sciences Europe*, 30(1), 47.
- Nunes, B., Carvalho, F., & Guilhermino, L. (2006). Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere*, 62(4), 581–594.
- Oh, J.-Y., Ryu, B., Yang, H.-W., Kim, E.-A., Lee, J.-S., & Jeon, Y.J. (2019). Protective effects of *Ecklonia cava* extract on the toxicity and oxidative stress induced by hair dye in vitro and in vivo models. *Journal of Oceanology and Limnology*.
- Pauli W, Berger S. 2000. A new Toxkit microbio-test with the protozoan ciliate *Tetrahymena*. In: Persoone G, Janssen C, DeCoen W, editors. *New microbio-tests for routine toxicity screen-ing and biomonitoring*. New York, NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers. p 169–176.
- Qurie, M., Khamis, M., Malek, F., Nir, S., Bufo, S. A., Abbadi, J. & Karaman, R. (2015). Stability and Removal of Naproxen and Its Metabolite by Advanced Membrane Wastewater Treatment Plant and Micelle-Clay Complex: Removal of Naproxen from Wastewater. *CLEAN - Soil, Air, Water*, 42 (5), 594–600.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., & Nigam, P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: A critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*, 77(3), 247–255.
- Santibañez, V. S. (2014). DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE DICLOFENACO, IBUPROFENO Y SU MEZCLA, A TEMPERATURA AMBIENTE. UAEM UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO Sitio web: <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/14484/421048.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Acceso 02 Octubre 2019.
- Serrano, C., Ortega, T. & Villar, A. (1996). Biological activity of traditional medicines from Spain and Guatemala. *Artemia salina* Bioassays: A revision. *Phytotherapy Res.* 10:S118-S120.
- Ternes, T. A., Joss, A., & Siegrist, H. (2004). Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. *Environmental Science & Technology*, 38(20), 392A–399A.
- Tsui, M.M.P.; Leung, H.W.; Wai, T.C.; Yamashita, N.; Taniyasu, S.; Liu, W.; Lam, P.K.S.; Murphy, M.B. Occurrence, distribution and ecological risk assessment of multiple classes of UV filters in surface waters from different countries. *Water Res.* 2014, 67, 55–65.

- Varó, I., Serrano, R., Navarro, J. C., López, F. J. & Amat, F. (1998). Acute Lethal Toxicity of the Organophosphorus Pesticide Chlorpyrifos to Different Species and Strains of *Artemia*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 61(6), 778-785.
- Vieno, N. M., Tuhkanen, T., & Kronberg, L. (2005). Seasonal Variation in the Occurrence of Pharmaceuticals in Effluents from a Sewage Treatment Plant and in the Recipient Water. *Environmental Science & Technology*, 39 (21), 8220-8226.
- Wang, W.-N., Zhou, J., Wang, P., Tian, T.-T., Zheng, Y., Liu, Y., Wang, A. L. (2009). Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* when exposed to acute pH stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 150(4), 428-435.

