



STVDIVM
GENERALE
CAESARAV-
GVSTANAE
CIVITATIS

COLECCIÓN PARANINFO
SAN BRAULIO 2016



Universidad Zaragoza

CIENCIA ANALÍTICA SIN FRONTERAS:
CONTAMINANTES EMERGENTES

Juan R. Castillo



CIENCIA ANALÍTICA SIN FRONTERAS: CONTAMINANTES EMERGENTES - JUAN R. CASTILLO

STVDIVM
GENERALE
CAESARAV-
GVSTANAE
CIVITATIS



Prensas de la Universidad
Universidad Zaragoza

CIENCIA ANALÍTICA SIN FRONTERAS:
CONTAMINANTES EMERGENTES

CIENCIA ANALÍTICA SIN FRONTERAS:
CONTAMINANTES EMERGENTES

Juan R. Castillo

PRENSAS DE LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

STVDIVM
GENERALE
CAESARAV-
GVSTANAE
CIVITATIS

COLECCIÓN PARANINFO
SAN BRAULIO 2016

- © Juan R. Castillo
- © De la presente edición, Prensas de la Universidad de Zaragoza
(Vicerrectorado de Cultura y Política Social)

1.ª edición, 2016

Prensas de la Universidad de Zaragoza

Edificio de Ciencias Geológicas

c/ Pedro Cerbuna, 12 • 50009 Zaragoza, España

Tel.: 976 761 330. Fax: 976 761 063

puz@unizar.es <http://puz.unizar.es>

Impreso en España

Imprime: Servicio de Publicaciones. Universidad de Zaragoza

ISBN: 978-84-16515-42-4

Depósito legal: Z 163-2016

*Una mar tranquila
nunca hizo buen marino.*

1

PRESENTACIÓN

En noviembre pasado recibí del Sr. Rector Magnífico, profesor Manuel López, el inmerecido encargo de pronunciar la alocución laudatoria en honor de nuestro patrono canónico san Braulio, que, por razones de calendario, celebramos el 23 de marzo de 2016. Gracias, profesor Manuel López, por una confianza que espero no defraudar.

Pronunciar esta alocución desde aquí, y en este día, tiene una importante carga emocional para mí. Son algo más de cincuenta años en la Universidad de Zaragoza, cinco de estudiante y cuarenta y cinco como profesor e investigador, excepto tres periodos anuales en 1979, 2001-02 y 2004-05 con estancias como investigador invitado en las Universidades de Southampton (Reino Unido), Cincinnati y Berkeley (EE. UU.).

Se produce, además, una curiosa coincidencia. El 7 de octubre de 1966, el profesor Bernal Nievas, catedrático de Química Analítica de nuestra universidad, que fue quien me dio la oportunidad de iniciarme en esta apasionante profesión de docente e investigador universitario, pronunciaba desde este mismo estrado la lección de apertura del curso 1966-67, con un tema muy de su especialidad, titulado «El hierro al correr de los siglos». Quien

les habla hoy, cincuenta años más tarde, estudiante entonces de 4.º de Químicas, estaba en este inigualable Paraninfo escuchando al profesor Bernal.

Estando próxima mi jubilación forzosa, que se producirá el próximo mes de septiembre, permítanme dejar por escrito que ha sido un placer y un honor trabajar desde la humildad de mi condición de «profe» e investigador de la Universidad de Zaragoza en un contexto, el de la Facultad de Ciencias, sección de Químicas, que, desde que se realizan *rankings* de calidad docente e investigadora, aproximadamente desde hace diez años, es la primera en España y se encuentra entre las setenta y cinco de mejor calidad a nivel mundial. Así mismo, es una enorme satisfacción personal haber podido contribuir a la creación del Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón de la Universidad de Zaragoza (IUCA) y ser su director desde la fundación en 2008. El IUCA, gracias a la dedicación, esfuerzo y trabajo bien hecho de su personal administrativo, técnico y de investigación, está consolidado y tiene un brillante futuro.

Es para mí un inmenso honor, una enorme satisfacción y una importante responsabilidad tratar de transmitirles mi pasión por los indisociables fines de la universidad, docencia e investigación y, por mi especialidad, la oficialmente denominada *Química Analítica*, hoy más *Ciencia Analítica*, dada la inmensa variedad de matices y factores científico-tecnológicos que intervienen en ella en este primer cuarto del siglo XXI.

En respuesta a los que creen que algunas especialidades químicas podrían estar en retroceso científico o haber sido superadas por otras, me permito transcribirles literalmente la opinión del profesor G. M. Whitesides (Department of Chemistry and Chemical Biology, Harvard University, Cambridge MA 02138 (USA),

<gwhitesides@gmwgroup.harvard.edu>) en 2015 en la prestigiosa revista *Angewandte Chemie International Edition* sobre la Química Analítica actual:

Analytical techniques open new areas of science. Analytical chemistry is a much more important area than it may seem. Dyson, Galison, and others have argued convincingly that one of the most important steps in opening new areas of science is developing new analytical techniques that make possible relevant measurements. As an example, consider the indispensable contribution of chemical methods to gene sequencing, of spectroscopy to organic synthesis, and of lasers to everything. Chemistry is still in a period of very active development of new analytical techniques, and probing molecular behaviors and motions at the subcellular level, addressing individual cells, exploring the deep brain (especially in humans), and (at the other end of scales of sizes) developing the measurement infrastructure for managing megacities, healthcare systems, and atmospheres, all represent enormously interesting and challenging problems (Angew. Chem. Int. Ed. 2015; 54: 3196-3209).

INTRODUCCIÓN

La elección del tema para esta alocución no ha sido sencilla. Voy a tratar de abarcar una materia de enorme actualidad, gran preocupación social, conflictiva, con un profundo contenido contemporáneo químico analítico y que, además, entiendo que permite un lenguaje accesible a toda la sociedad.

En el año 2016 uno de los retos científicos más apasionantes es la aparición de los llamados *contaminantes emergentes*. Sobre todo para los que nos dedicamos como químicos analíticos, de forma transversal, a poner a disposición de la sociedad técnicas y métodos para conocer la composición de la materia, cualquiera que sea esta, composición, concentraciones, morfología, reactividad, estructura, análisis enantiomérico, especies químicas, complejos, efectos sinérgicos, estados de oxidación.

Vaya por delante que la dimensión del problema es seria e importante. Y, repito, conflictiva, pero, ya saben, «Nunca una mar tranquila hizo un buen marino».

Como científicos tenemos que dejar atrás la visión apocalíptica y poner énfasis en las soluciones, una vez bien conocido el problema. Resolver estos problemas empieza por conocer, generar conocimiento sobre el

comportamiento de todos los componentes de los productos naturales y artificiales que hacen nuestra vida más larga y mejor y que contribuyen fundamentalmente al desarrollo económico y social. Por ejemplo, nadie puede dudar de la necesidad del uso responsable de los antibióticos. Sin embargo, ya hay evidencias experimentales de que su presencia en aguas residuales urbanas está generando un problema medioambiental. ¿Cuántos de todos nosotros no se han protegido de la radiación UV solar con cremas base dióxido de titanio? ¿Realmente sabemos qué sucede en el medio marino cuando miles de personas se bañan en una playa previa utilización de esos imprescindibles protectores solares?

Voy a tratar de ejercer de testigo imparcial dando a conocer el problema en algunos aspectos parciales, ya que abarcarlo en su totalidad escapa del contexto de esta intervención, sin juicios de valor. Pido perdón por los errores que pueda cometer; nadie está libre de ellos, aunque nosotros generamos conocimiento sobre la base de evidencias experimentales, no sobre opiniones, y, a quien le corresponda, que tome las medidas oportunas.

CONCEPTO DE CONTAMINANTE EMERGENTE

La década de los cincuenta del siglo pasado marcó un punto de inflexión en la preocupación por los posibles efectos perjudiciales derivados de la presencia de especies químicas en el entorno ambiental de la vida en nuestro planeta.

Desde entonces, la comunidad científica ha trabajado en el estudio de la detección y caracterización de especies químicas cuya presencia en el medio ambiente, en su sentido más general, podía resultar perjudicial, facilitando el conocimiento necesario para que las Administraciones públicas hayan regulado su utilización y los límites máximos tolerables.

La disponibilidad de nuevas y más sensibles técnicas y métodos de análisis ha permitido alertar de la presencia de otros contaminantes potencialmente peligrosos, pero con efectos no conocidos y carentes de regulación por parte de las Administraciones públicas. El papel de la Ciencia Analítica, fundamentalmente constituida por la Química Analítica, pero también por importantes aportaciones de la electrónica, óptica, ciencia de materiales, electroquímica, informática, quimiometría, bioquímica, bioinorgánica, etc., ha sido clave en la detección, identificación,

caracterización y cuantificación de los miles de contaminantes descritos y regulados en los últimos sesenta y cinco años.

La «aparición» de un primer sentimiento de preocupación sobre contaminantes emergentes probablemente hay que atribuírsela a Rachel Carson en su libro *Primavera silenciosa*, de 1962, reeditado en 2002 por Ed Mariner. En él, Carson demostró que el uso generalizado del DDT para eliminar los mosquitos y otras plagas había llevado a la muerte y desaparición de muchas especies vegetales. Carson fue muy criticada en su momento por atreverse a desafiar los beneficios del uso de plaguicidas en general y más específicamente del DDT. El devenir de los acontecimientos posteriores ha demostrado su razón: el DDT fue prohibido más tarde y es un buen ejemplo de cómo un ecologista dio la voz de alarma y luego la investigación científica respaldó esa opinión, descubriendo la verdad y los riesgos que producía el uso del DDT, que había sido sintetizado por primera vez unos cien años antes de que el libro de Carson fuese publicado en 1962.

Es conocida la debilidad de algunas instituciones por «normalizar» una definición «oficial» que sea aceptada por todos. Por ello, han surgido intentos de definición de *contaminante emergente* (1) tales como:

- a) Un nuevo grupo de productos químicos antropogénicos persistentes clasificados no regulados que pueden existir en el aire, suelo, agua, alimentos y seres vivos en concentraciones traza y que son capaces de alterar la fisiología de receptores diana.
- b) Un nuevo grupo de contaminantes antropogénicos, constituido por nuevos compuestos utilizados en la industria, alimentación, farmacología, agricultura, etc.

- c) Productos químicos conocidos que aparecen como nuevos en el medio ambiente y que por sus características no se sospechaba de sus posibles consecuencias perjudiciales .
- d) Compuestos resultantes de la degradación y recombinación de productos químicos artificiales con larga persistencia en distintos medios naturales.
- e) Mezclas de productos químicos que individualmente pueden ser inocuos pero que, combinados, son capaces de degradar la salud de los seres humanos, los ecosistemas y la vida silvestre.

Ninguna de ellas, y hay muchas más propuestas, puede llegar a recoger las múltiples matizaciones que encierra el término *contaminante emergente*, so pena de que la definición se convierta en un capítulo de decenas de páginas.

Actualmente se acepta, como concepto resumido, que no como definición, que un contaminante emergente es un material, un elemento, un compuesto, una especie química, e incluso un fenómeno físico desconocido o no reconocido, cuya presencia en el medio ambiente, en alimentos, en cualquier producto natural o artificial, o en cualquier ser vivo, no es necesariamente nueva, pero sí son nuevas las posibles consecuencias perjudiciales de esa presencia. Generalmente, son especies químicas, también materiales/compuestos, de los cuales se sabe relativamente poco o nada acerca de su presencia e impacto. Además, su control no está regulado por las Administraciones públicas y la disponibilidad de técnicas y métodos para su análisis es nula o limitada.

Se trata de actores de los que se sabe relativamente poco o nada acerca de su presencia e impacto en los distintos espacios ambientales y seres vivos, por lo que no han sido regulados.

Una importantísima matización cuando surge la alarma por una especie potencialmente contaminante es la prácticamente nula disponibilidad de métodos para su análisis, lo que ha concedido a la investigación en Ciencia Analítica un papel determinante. Un problema solo puede resolverse cuando se conoce y diagnostica con exactitud y precisión. Otra particularidad de estos compuestos es que, debido a su elevada producción y consumo y a la continua introducción de los mismos en el medio ambiente, no necesitan ser persistentes para ocasionar efectos negativos.

El desarrollo de nuevas técnicas analíticas cada vez más sensibles y selectivas y los efectos toxicológicos de los contaminantes emergentes se encuentran entre las líneas de investigación prioritarias de los principales organismos dedicados a la protección de la salud pública y medioambiental, tales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Agencia para la Protección del Medio Ambiente norteamericana (US EPA) o la Unión Europea.

Cabe afirmar que la preocupación por los contaminantes emergentes es relativamente reciente en la Unión Europea, muy a remolque de la EPA norteamericana, aunque algo parece moverse como consecuencia de la presión que ciertos grupos de investigación estamos haciendo con el apoyo de los medios de comunicación.

La contaminación por productos químicos y por productos procedentes de la actividad humana está teniendo un importante impacto sobre la Tierra y en nuestra propia salud y bienestar. Las huellas de la contaminación antropogénica se encuentran desde la estratosfera hasta la profundidad de los océanos, de polo a polo, en la vida silvestre, en la cadena alimentaria. El término *contaminante emergente* a menudo causa confusión, ya que no es solo para los propios productos químicos, sino también para

dimensiones asociadas a sus propiedades y al concepto «fuente continua-efecto», aunque sea a muy bajas concentraciones.

En la actualidad la mayoría de los contaminantes emergentes se detectan en algunos ecosistemas acuáticos en muy pequeñas cantidades de ppb a ppt. Un origen importante de estos contaminantes en el medio ambiente son los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales (EDAR) (2).

Algunos de estos contaminantes son persistentes en el ambiente y, a través de la cadena alimentaria, hacen su camino de regreso a los seres vivos (3, 4). Los contaminantes pueden ser tan variados como productos para el cuidado personal (por ejemplo, agentes antimicrobianos y tintes), productos farmacéuticos, retardantes de llama, nuevas clases de pesticidas, drogas ilícitas, productos químicos industriales, colorantes, etc. En los últimos años, todo tipo de nanomateriales se han unido a la lista de potenciales contaminantes emergentes.

La amplia variedad de contaminantes emergentes que se pueden encontrar en nuestro entorno, la diversidad de sus estructuras químicas, la falta de información en cuanto a sus mecanismos de transporte y transformación y su efectos sobre la salud humana y los ecosistemas son algunos elementos que estimulan la investigación científica así como la creciente preocupación de las Administraciones públicas.

La existencia de muchas lagunas de conocimiento crítico debe acabar dentro de lo posible, con el fin de lograr una mejor evaluación del riesgo de sustancias químicas potencialmente contaminantes emergentes, y deben conseguirse procedimientos de tomas de decisión científicamente defendibles sobre la gestión de estos contaminantes. El reconocimiento, entre otros, de importantes

déficits en métodos analíticos precisos para potenciales contaminantes emergentes, en la disponibilidad de materiales certificados para contaminantes emergentes y la falta de información sobre el destino, la toxicidad y el comportamiento de los contaminantes emergentes está propiciando un muy importante desarrollo en los siguientes apartados

- a)* Consolidación de una metodología analítica robusta, fiable y rápida.
- b)* Estudio de procedimientos para evaluar el destino y el comportamiento de los contaminantes en el medio ambiente.
- c)* Desarrollo de métodos para el estudio de la toxicidad crónica y subcrónica de estos productos químicos.
- d)* Impacto de exposiciones temporalmente largas en concentraciones muy bajas a estas sustancias químicas.
- e)* Generación de metodología para disminuir la descarga de esos productos químicos a través del desarrollo de productos de sustitución y la puesta a punto de nuevos tratamientos y tecnologías capaces de eliminar eficazmente dichos compuestos.

INCERTIDUMBRES CIENTÍFICAS Y TRANSMISIÓN DE CONOCIMIENTO «CONFLICTIVO»

Aspectos éticos: del laboratorio a la norma; el caso de los retardantes de llama bromados

La creación de conocimiento científico sobre nuevas amenazas para nuestro medio ambiente implica numerosos problemas éticos relacionados con la incertidumbre científica sobre las etapas de detección, cuantificación, caracterización, interpretación de resultados y comunicación a la sociedad.

En condiciones de incertidumbre científica, la conducta del investigador debe estar gobernada por códigos éticos formales de conducta concretos y bien establecidos.

Globalmente, podemos identificar cuatro fuentes de incertidumbre científica:

- 1) La elección de las técnicas y los métodos de investigación.
- 2) La interpretación de los resultados científicos.
- 3) La comunicación de los resultados a la sociedad y poderes públicos.
- 4) La aplicación de los resultados para la formulación de políticas preventivas y de regulación de productos y niveles de concentración.

La incertidumbre surge debido a que las directrices éticas formales y los códigos de conducta se desarrollan más lentamente que los avances científicos, y nos encontramos con que los enfoques tradicionales, protocolos y paradigmas no describen adecuadamente el estado actual de las cosas ni proporcionan directrices claras.

La objetividad, autonomía y neutralidad científica en temas tan complejos como el de los contaminantes emergentes están amenazadas por la incertidumbre y la relevancia política y económica del posible problema, lo que puede provocar deslizamientos desde la evidencia experimental hacia los juicios de valor.

La participación de científicos en la formulación de políticas medioambientales puede socavar la propia autoridad científica, creando dilemas éticos sobre los niveles adecuados de participación política de la comunidad científica. Por otra parte, es frecuente que actores no científicos como políticos y activistas se interesen en los hallazgos científicos y se apropien de esos hallazgos para múltiples usos. Este hecho, cada vez más frecuente en nuestra sociedad, ha desdibujado la línea entre la ciencia y la formulación de políticas de prevención y normativa reguladora, lo que ha retraído a muchos científicos, por lo que la comunidad científica se ha ido distanciando de este tipo de problemas de compleja responsabilidad política, social y económica, lo que podría explicar muchas de las desacertadas decisiones que suelen tomarse y los tiempos tan largos en regular cuestiones que son evidentes.

Un claro ejemplo de lo comentado anteriormente, sobre incertidumbre científica en el conocimiento de los contaminantes emergentes y su traslación a normas reguladoras, es la enorme controversia sobre la utilización de

retardantes de llama en muchos productos de consumo con fuertes intereses enfrentados entre el mundo académico-investigador, los Gobiernos, los industriales productores y los movimientos sociales: cada sector lleva a cabo sus propias metodologías de investigación o utiliza los resultados de los demás introduciendo matizaciones nuevas no previstas en el planteamiento inicial.

En los últimos diez años la investigación científica sobre retardantes de llama y biomonitorización de los mismos ha crecido exponencialmente (5).

Sin embargo, la cuestión de si los retardantes de llama representan un riesgo para la salud pública, que merece una mayor regulación, sigue siendo controvertida debido a las incertidumbres sobre el peligro de incendio, peligros químicos, exposición pública, la salud y los resultados ambientales, y los productos químicos de sustitución.

Los retardantes de llama son ampliamente utilizados y se dispone de muy pocos datos sobre sus efectos en la salud. El caso es perfecto para el estudio de la incertidumbre científica. En este caso, la llamada preocupación ambiental está creciendo enormemente, acompañada a su vez de controvertidos intereses. Algunos retardantes de llama están regulados de forma laxa y rara vez existen directrices de salud seguras en los niveles de exposición. Además, plantean preocupaciones sobre posibles compensaciones entre la seguridad contra incendios y los resultados ambientales o de salud.

La fabricación de materiales ignífugos químicos comenzó en la década de 1960 (6) y su uso se impulsó por las normas de seguridad contra incendios y normas de inflamabilidad que requerían productos para cumplir los estándares mínimos de rendimiento. Los productos químicos retardantes de llama son ampliamente utilizados en electrónica, tejidos sintéticos, decoración interior, au-

tomóvil, mobiliario, etc., con el fin de reducir la velocidad de combustión. Muchos de ellos, de uso actual, son químicamente similares en forma, función y antecedentes de uso a los prohibidos por motivos de salud (7, 8).

Sin alarmismos, son solo casos experimentalmente demostrados.

Las personas estamos expuestas a los retardantes de llama a través del polvo de nuestros hogares y lugares de trabajo, el contacto físico, la ingestión, el humo y el aire contaminado (9). Se ha demostrado que son bioacumulativos rápidamente en el medio ambiente, la fauna y en las personas (9, 10, 11). Los éteres polibromodifenilados (PBDE) se han detectado en leche humana (12, 13), en orina y en polvo doméstico (14, 15, 16).

Los PBDE son disruptores endocrinos, tóxicos y presentan factores de riesgo potenciales para los trastornos del espectro autista (17).

La exposición a PBDE se asocia con resultados adversos al desarrollo neurológico en los niños (18, 19), trastornos reproductivos masculinos (20), disminución de la fecundidad en las mujeres (21) y niveles de hormona tiroidea más bajos durante el embarazo (22). Se han descrito con rigor episodios asociados a la exposición a retardantes de llama en pijamas para niños (23, 24) y el envenenamiento de animales de granja por retardantes polibromados de bifenilo (25).

Aunque la mayoría de los PBDE ya no se fabrican, la exposición sigue siendo generalizada, dado que se utilizaron en gran medida en productos de consumo con ciclos de vida largos.

Pues bien, los PBDE utilizados desde los años sesenta *solo se han prohibido recientemente* (NCSL 2011; US EPA 2006, 2009), lo que demuestra que la interacción entre conocimiento y legislación reguladora de su utilización

ha sido muy compleja y que los fuertes intereses enfrentados han provocado una larga incertidumbre en el tiempo.

Se puede añadir además la matización de las dobles apariciones o resurgimientos de contaminantes a través de los años. Los datos disponibles confirman que, de hecho, pueden surgir más de una vez, como lo ilustra el ejemplo del DDT, que alcanzó su punto máximo en 1972, pero vio un resurgimiento entre 1991 y 2008. Del mismo modo, el ácido tricloroacético alcanzó su punto máximo en 1971 y a partir de 1993 experimentó un resurgimiento que ha provocado un segundo pico de preocupación en 2009. Esta incertidumbre real en algunos de los contaminantes más importantes en realidad provoca que contabilizadas, a finales de 2013, el número de publicaciones totales sobre estos tipo de contaminantes en orden decreciente son: DDT (37 136), tricloroetileno (30 241), nanomateriales (30 015), priones (27 468), 1,4-dioxano (26 031), ácido tricloroacético (14 084), metil ter-butil éter (13 188), N-nitrosodimetilamina (8434), triclosán (6974), perclorato (6839), triclocarbán (1027) y microplásticos (107).

Está estadísticamente calculado que la preocupación viene a durar $14,1 \pm 3,6$ años y desaparece a un nuevo nivel basal en $14,5 \pm 4,5$ años. Además, los enormes avances en sensibilidad y precisión de las nuevas técnicas y métodos analíticos, sobre todo cromatográficos, espectrometría de masa y nanometrología, provocan cambios de paradigmas científicos (por ejemplo, el descubrimiento de proteínas infecciosas).

UNA APROXIMACIÓN AL PROBLEMA GENERAL DE LOS CONTAMINANTES EMERGENTES

Realizar una exhaustiva y completa sistematización de los compuestos químicos que potencialmente podrían ser considerados como contaminantes emergentes es una misión imposible de todo punto.

La existencia de millones de compuestos químicos orgánicos, centenares de miles de compuestos inorgánicos y decenas de miles de distintos tipos de materiales impide poder diseñar una sistemática ordenación de los mismos.

La mayor parte de las referencias existentes sobre esto se limitan a ordenarlos de acuerdo con grupos de concepto químico muy generalista, bien sea por su naturaleza orgánica o inorgánica, o por usos y aplicaciones.

En los últimos quince años y en relación con los contaminantes emergentes orgánicos (tabla 1), las mayores incidencias corresponden a la consideración de algunos aditivos, ya sean alimentarios (aromas sintéticos, edulcorantes, etc.) o industriales (perfluorados, nafténicos, retardantes de llama, etc.) y, como novedad surgida en esta última década, los productos de degradación y derivados de pesticidas y de productos de desinfección de aguas así como los microplásticos.

Tabla 1
CONTAMINANTES EMERGENTES ORGÁNICOS

Ácidos nafténicos
Aditivos gasolinas (MTBE y EDB)
Aromas sintéticos
Benzotriazoles
Compuestos perfluorados
Dioxano
Edulcorantes artificiales
Fármacos, drogas de abuso, hormonas, disruptores endocrinos
Filtros solares
Microplásticos
Plastificantes
Productos de degradación de pesticidas y nuevos pesticidas
Productos derivados de desinfección de aguas
Retardantes de llama bromados
Siloxanos
Surfactantes

No cabe la menor duda de que una de las mayores preocupaciones actuales son los contenidos de fármacos, drogas de abuso, hormonas y disruptores endocrinos en aguas residuales, antes y después de procesos de depuración donde no se consigue eliminarlos y son vertidos a cauces de río, lagos o al mar. En efecto, el consumo de fármacos en los países de la UE se cifra en toneladas por año, y muchos de los más usados, entre ellos los antibióticos, se emplean en cantidades similares a las de los pesticidas (26). Entre los fármacos más prescritos en medicina humana destacan los analgésicos/antiinflamatorios como el ibuprofeno y el diclofenaco, los anti-epilépticos como la carbamazepina, antibióticos como la amoxicilina y el sulfametoxazol y los bloqueantes como el metoprolol.

Actualmente, en Europa hay más de 3200 ingredientes activos permitidos para su uso como fármacos. Puede afirmarse que se presta la máxima atención a los antibióticos, los medios de contraste en técnicas de diagnóstico por imagen, sobre todo por su persistencia en el medio ambiente, los citostáticos que exhiben con frecuencia propiedades carcinogénicas, mutagénicas o embriogénicas, los estrógenos, usados como anticonceptivos y tratamiento de desórdenes hormonales como la menopausia y que provocan fenómenos de feminización, hermafroditismo y disminución de la fertilidad.

Dada la imposibilidad de abordar en profundidad todos ellos, en el capítulo 6 de este trabajo incidiremos en relación con los orgánicos —sin duda los más numerosos—, en aromas sintéticos, fármacos, drogas de abuso, hormonas, disruptores endocrinos, filtros solares, productos derivados de desinfección de aguas, productos de degradación de pesticidas y nuevos pesticidas y microplásticos.

Posiblemente, pueda afirmarse que en el campo de los contaminantes emergentes inorgánicos se ha producido una auténtica explosión, no tanto debida a la naturaleza química de los posibles agentes contaminantes como a su tamaño físico. Prácticamente, la única novedad cuando estamos hablando a escala macro es la consideración de los percloratos como contaminantes emergentes, ya que lo que sucede con arsénico y antimonio es un *revival* de su consideración por el amplio uso que se hace de ellos.

El caso del perclorato es absolutamente nuevo. En efecto, su detección reciente en aguas de suministro urbano en EE. UU., en productos frescos, alimentos, vino y bebidas en países europeos y asiáticos ha hecho sonar las alarmas recientemente. Su presencia en muestras

Tabla 2
OTROS POTENCIALES CONTAMINANTES EMERGENTES ORGÁNICOS E INORGÁNICOS

Materiales		Nanomateriales		
Arsénico	Naturales		Artificiales	
Percloratos	Inorgánicos	Orgánicos	Inorgánicos	Orgánicos
Antimonio	Ag, Au, Cu, Fe	Coloides	Pt, Pd, Ni, Mn, Mg, Li, Pb, Fe, Ir, Au, Co, Cr, B	Nanotubos
	Óxidos	Ácidos húmicos y Fúlvicos	TiO ₂ , ZnO, CuO, Si, SiO ₂ , CeO ₂ , ZrO ₂ , S ₂ W, Al ₂ O ₃	Fullerenos
	Aerosoles marinos	Nanotubos	Fosfatos metálicos	Polímeros
	Polvo atmosférico	Fullerenos	Zeolitas	Polietilenglicoles
	Arcillas		Cerámicas	Sustancias extrapoliméricas
			Arcillas	Nanocelulosa

biológicas y en las ciudades anteriormente se achaca a su masiva utilización en forma de perclorato amónico en fuegos artificiales así como en propelentes en cohetes, misiles, fuegos artificiales, bengalas. Otra importante fuente de percloratos es la utilización de fertilizantes base nitrato de Chile, que puede tener percloratos, al tiempo que el perclorato puede ser un contaminante del hipoclorito sódico utilizado en tratamiento de aguas. Además, es bioacumulable en vegetales y no es eliminado en las plantas de tratamiento de aguas, y fundamentalmente en el ser humano causa graves problemas tiroideos por desplazamiento de yoduros.

El factor tamaño está originando un gran grupo de contaminantes emergentes, prácticamente desconocidos hasta hace cinco años. Es ya sobradamente conocido que la escala nano, una dimensión por debajo de los 100 nm,

Tabla 3
BIOCONTAMINANTES EMERGENTES

Microorganismos	Comp. bioquímicos	Algas	Micotoxinas	
<i>Adenovirus</i>	Exosomas (50-169)	Cianobacteria	Hongo	Toxina
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Lipoproteínas (7-200)	Algas agua dulce	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxinas B1, B2, G1 y G2
<i>Calicivirus</i>	Ferritina (7-12)	<i>Caulerpa taxifolia</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxinas B1 y B2
<i>Coxsackievirus</i>	Magnetosomas (Magnetita/Greigita) (50-70)	<i>Pseudo-nitzschia</i>	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Toxina T-2
<i>Echovirus</i>	Liposomas		<i>Fusarium graminearum</i>	Deoxinivalenol Zearalenona
<i>Helicobacter pylori</i>			<i>Fusarium moniliforme</i> (<i>F. verticillioides</i>)	Fumonisina B1
<i>Microsporidia</i>			<i>Penicillium verrucosum</i>	Ocratoxina A
<i>Avium intracellulare</i>			<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ocratoxina A
Priones*				
Virioplacton (femto)				

* Los priones no son estrictamente microorganismos, sino partículas no celulares, proteínas que tienen características patógenas e infecciosas. Los priones no son organismos vivos, son solo proteínas sin ácido nucleico. Se incluyen ahí por su similitud en los efectos.

puede inferir propiedades muy distintas de las que el mismo material tiene a escala *bulk* o macro; esto ha hecho nacer un nuevo concepto de toxicidad asociado a la escala nanométrica, lo que ha supuesto el nacimiento de una nueva ciencia la llamada *Nanotecnología Medioambiental*, que agrupa el conocimiento de los procesos de síntesis y propiedades de todo tipo de nanomateriales, el de las técnicas y métodos para su detección, caracterización, cuantificación, los procesos de interacción

con ecosistemas, biodisponibilidad, movilidad, interacción con sistemas biológicos, nanotoxicidad, etc.

La cuestión está adquiriendo un enorme volumen de trabajo no ya porque se haya partido de cero al principio del siglo XXI, sino porque el concepto de nanomaterial se ha extendido a múltiples aspectos (tabla 2). Por su importancia y novedad los nanomateriales serán tratados en extenso en el apartado homónimo del capítulo 7 (págs. 87-109) y allí remitimos al lector.

Lo que se expone en la tabla 3, dada la limitación de espacio a la que estamos sometidos, es solo una exposición resumida de algunos de los contaminantes que han emergido en los últimos quince años, muchos de los cuales no están regulados todavía: este tercer gran grupo de contaminantes emergentes lo constituyen los llamados *biocontaminantes*, es decir, organismos celulares vivos o productos emitidos a compartimentos medioambientales por estos seres vivos.

Aromas sintéticos

Los aromas sintéticos son ampliamente utilizados como aditivos en muchos productos de consumo, incluyendo perfumes, lociones, protectores solares, desodorantes, ciertos alimentos y detergentes para ropa.

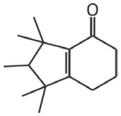
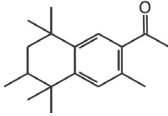
Actualmente, debido a su toxicidad y carácter de disruptores endocrinos, son considerados contaminantes emergentes.

Los efluentes de las plantas de depuración de aguas residuales de los núcleos de población son la principal fuente de emisión, ya que su eliminación durante el tratamiento depende mucho del tamaño de la planta, tipo de tratamiento y de la tipología de los propios residuos (municipal, industrial, rural altamente urbanizada, etc.).

La concentración de aromas sintéticos en los efluentes después de la planta de tratamiento dependen, como es lógico, del factor de dilución, de la cantidad eliminada durante el tratamiento y de las condiciones del flujo de salida.

Algunos de los más estudiados son: galaxolide, tonalide, celestolide, fantolide, traseolide, cashmeran y algunos otros con estructuras nitroaromáticas. Son compuestos altamente lipofílicos, por lo que tienden a acumularse en sedimentos, lodos y biota.

Figura 1

<p>Cashmeran (DPMI) 33704-61-9 206.3</p>	
<p>Galaxolide (HHCB) 1222-05-5 258.4</p>	

Se han detectado en plantas (27), en las lombrices de tierra (28), pescado (29), mejillones(30), mamíferos marinos (31), tejido adiposo humano (32), sangre humana (33, 34, 35, 36) y leche humana materna (36, 37, 38, 39).

Como era de esperar, la aplicación de técnicas cromatográficas de alta resolución combinadas con detectores de masas de alta sensibilidad ha permitido obtener límites de detección de la mayoría de estos aromas sintéticos hasta de 6 picogramos en efluentes de plantas depuradoras. Para la preparación de la muestra, es decir, para la extracción de aromas policíclicos de sedimentos, pueden utilizarse alternativamente una etapa previa de extracción asistida por microondas, o extracción simultánea por destilación del disolvente, o extracción Soxhlet, o extracción de ultrasonido o asistida por ultrasonidos. El mayor rendimiento de extracción y reproducibilidad se consigue con la asistencia por ultrasonidos, que es la más eficaz.

El carácter lipofílico hace que se produzca una fuerte acumulación en sedimentos; de ahí que utilizando cromatografía de exclusión molecular y GC/MS se hayan detectado 9,2 ng/g de galaxolide (HHCB) en residuo

seco, y de hasta 25,8 ng/L en agua de río. También se han descrito contenidos de 48 a 683 ng/L en camarones de cultivo, y de 66 a 762 ng/L en camarones salvajes.

Hasta la fecha, de los distintos estudios recientemente llevados a cabo tanto en EE.UU. como en Europa en efluentes de plantas depuradoras puede concluirse que son especialmente el galaxolide y tonalide los más frecuentes en concentraciones de unos pocos ppb, mientras que el resto de los citados anteriormente, tal vez por su fuerte carácter lipofílico, se detectan principalmente en sedimentos y no en medios líquidos acuosos.

Por otra parte, los procesos de adsorción irreversible, de degradación microbiana y fotolíticos pueden hacer que las concentraciones estén por debajo de los límites de detección.

En el caso de los aromas sintéticos es de gran interés el seguimiento y control de aguas subterráneas, ya que los procesos de acumulación en suelos y sedimentos pueden hacer que estas aguas estén más contaminadas que las superficiales. Se ha demostrado que existen fluctuaciones de concentración debidas al proceso de descarga de aguas subterráneas después de importantes episodios de lluvias.

Filtros solares

Habitualmente, los filtros solares UV utilizados en protectores solares son de dos tipos: filtros inorgánicos constituidos por suspensiones de nanomateriales de TiO_2 o ZnO que reflejan o dispersan la radiación UV; y filtros constituidos por una base de compuestos orgánicos que absorben la luz ultravioleta y que se utilizan cada vez más en productos de cuidado personal, tanto en protectores solares como en cosméticos, cremas de belleza, lociones para la piel, barras de labios, lacas para el cabello, tintes

para el cabello y champús (40). Su entrada en ecosistemas medioambientales es debida a las propias actividades recreativas en contacto con agua dulce o de mar, o a través de las aguas residuales de las plantas de tratamiento.

En los filtros solares los compuestos orgánicos más utilizados son: benzofenona-3 (BP-3), 4-hidroxibenzofenona (HBP), 2-hidroxi-4-metoxibenzo-fenona (HMB), 2,4-dihidroxi-benzofenona (DHB), hidroxi-4-2,2'-dihimetoxibenzo-fenona (DHMB), zofenona 2,3,4-trihidroxibenzo-fenona (THB), ácido octil-dimetil-p-aminobenzoico, 4-metil-bencilideno (4-MBC), metoxicinamato de etilhexilo, octilmetoxicinamato (OMC), octocrileno, butil metoxi dibenzoilmetano, tereftalilidina dialcanfor ácido sulfónico, triazona etilhexilo, ácido fenilbenzimidazol sulfónico (PBSA), salicilato de etilhexilo, benzohidrol (BH) y 1-(4-terc-butilfenil)-3-(4-metoxifenil)-1,3-propanedione (BPMP).

La mayoría de ellos son compuestos lipofílicos con sistemas aromáticos conjugados que absorben luz UV en el rango de longitud de onda 280 hasta 315 nm o 315-400 nm (40).

Numerosos productos de protección solar contienen mezclas de compuestos filtros UV y a menudo están en combinación con micropigmentos inorgánicos.

Se han detectado en aguas naturales en concentraciones próximas a las comprobadas como tóxicas en experimentación animal. Un estudio realizado en Suiza sobre la presencia de filtros solares constituidos por alcanfor de 4-metil-bencilideno (4-MBC) y octilmetoxicinamato (OMC) en la leche materna humana ha demostrado que el 85 % de las muestras los contenían en concentraciones similares a los PCB (41).

La presencia de componentes de filtros solares en fluidos biológicos humanos está más relacionada con su

repetida aplicación como productos de cuidado personal que por exposición general medioambiental. Es de gran interés e importancia el control de los procesos de eliminación de este tipo de contaminante después de procesos de tratamiento biológico de aguas de depuradora tanto de tipo aeróbico, anaeróbico o combinaciones de ambos (42). Generalmente, la eliminación es más alta usando condiciones aeróbicas, siendo el fenilbenzimidazol-ácido sulfónico y el etilhexil metoxicinnamato (EHMC) los más persistentes.

Algunos datos recientes sobre contenidos en sedimentos y lodos de depuradora de benzotriazole y benzofenona provenientes de filtros solares han hecho sonar alarmas preocupantes. En efecto, utilizando técnicas combinadas de LC/MS/MS y GC/MS (43) se han llegado a determinar 6370 ng/g en residuo seco de lodos de depuradora y de hasta 389 ng/g en residuo seco de sedimentos. El problema parece complicarse más, ya que la aplicación de técnicas de UPLC/MS/MS ha permitido detectar y cuantificar en sedimentos productos de degradación de la benzofenona-3 (BP-3) tales como 4,40-dihidroxibenzofenona y 4-hidroxibenzofenona, que son preocupantes agentes estrogénicos (44).

Microorganismos

Los importantes incidentes de enfermedades transmitidas por el agua producidos en los últimos veinte años en los cinco continentes han hecho necesario mejorar las técnicas y métodos analíticos para la detección e identificación de microorganismos en el agua y otras muestras ambientales. La EPA ha incluido en los últimos años varios microorganismos en sus CCL. Y desde sus propios laboratorios en Cincinnati ha desarrollado

varios métodos para la medición de algunos microorganismos en el agua (<www.epa.gov/nerlcwww>). Estos incluyen nuevos métodos para *Cryptosporidium*, *Giardia*, *E. coli*, *Aeromonas*, colifagos, los virus (importante novedad como motores de la producción de materia orgánica disuelta en medio acuático) (45), los coliformes totales y enterococos.

Un microorganismo conocido desde la década de los ochenta, la cepa enterohemorrágica de la bacteria *E. coli*, el *E. coli* O157: H7, ha provocado importantes alarmas, ya que ha causado una serie de brotes y muertes en todo el mundo. Se ha renovado la ocurrencia de *E. coli* O157: H7 y otras *E. coli* enterohemorrágicas en el medio ambiente (46). También se han actualizado los métodos para la medición de *E. coli* O157: H7, que incluyen cultivo y métodos inmunológicos y métodos basados en ácidos nucleicos (incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa, PCR). En algunos de los últimos brotes detectados en América y Asia hay que destacar que se han producido al nadar en lagos y ríos.

El agua es la tercera ruta más importante de transmisión, después de la transmisión por los alimentos y de persona a persona. Los seres humanos y los animales son la fuente de *E. coli* O157: H7, que libera toxinas shiga para inducir colitis hemorrágica. Las aves silvestres, especialmente las aves acuáticas, han sido reconocidas como fuentes de *Campylobacter*, y los brotes de gastroenteritis se han relacionado con los alimentos contaminados y el agua potable.

Los adenovirus (47) son uno de los nuevos microorganismos regulados recientemente para el agua potable debido a su supervivencia en la misma. Los virus son mucho más pequeños que otros microorganismos comúnmente medidos (incluyendo *E. coli*), y pueden escapar de

las barreras de filtración diseñadas para eliminarlos. Los adenovirus son también más resistentes al tratamiento (incluyendo el tratamiento UV) y a la degradación natural en el medio ambiente (47). El desarrollo de técnicas analíticas de PCR extraordinariamente sensibles ha incrementado los informes positivos de los adenovirus en ríos y aguas costeras. Los adenovirus proceden de seres humanos y una variedad de animales, pero solo los adenovirus humanos infectan a los humanos y son responsables de enfermedades entéricas, así como de infecciones respiratorias y de los ojos. Como veremos más adelante, algunas de las primeras detecciones de adenovirus humanos se hicieron en agua de piscinas, donde los residuos bajos de cloro se asociaron con los brotes de enfermedades (47).

Poliomavirus, adenovirus y virus de la hepatitis E se han detectado en muestras ambientales y en el agua (48) potable, mediante técnicas de PCR, comprobándose además que puede eliminarse el 99 % con filtros de carbón activado granular. Por otra parte, se estima que los norovirus son responsables de hasta 23 millones de casos de gastroenteritis por año en los Estados Unidos. La mayoría de los casos ocurren en entornos cerrados, como hospitales y hogares de ancianos (49).

Algunos estudios dedicados a amebas patógenas similares a la *Legionella* han demostrado que usando centrifugación y PCR pueden controlarse las torres de refrigeración. La mayoría de las bacterias detectadas parecían ser algo distintas de la *mophila Legionella*, lo que refuerza la idea de que muchas infecciones de neumonía similares a las provocadas en los seres humanos por la *Legionella* pueden deberse a nuevos microorganismos ameba-asociado que son difíciles de cultivar y no se detectan. Esto ha dado lugar al uso de un nuevo concepto, llamado *array medioambiental*, para la identificación de amenazas

emergentes transmitidas por el agua (50), utilizando un enfoque basado en genómica que no depende de un conocimiento *a priori* de genes de virus. Estas matrices de entorno se ensamblan a partir de perfiles moleculares de los elementos infecciosos que transfieren entre las bacterias (llamados *integrones*). Con este sistema se ha podido medir una amplia gama de bacterias sin tener que cultivar los organismos.

Productos de degradación de pesticidas y nuevos pesticidas

Desde mediados del siglo pasado los herbicidas y pesticidas han sido los compuestos químicos más estudiados como contaminantes, tanto todos sus posibles efectos tóxicos como el desarrollo de técnicas y métodos analíticos más robustos y sensibles. Sin embargo, la tendencia en los últimos años se ha inclinado más por sus productos de degradación, provocados generalmente por hidrólisis, oxidación, biodegradación o transformación fotolítica.

En el CCL-3 de la EPA (EE.UU.) aparecen el alachlor etanosulfónico (ESA), ácido alacloro oxalínico (OA), acetocloro ESA, OA acetoclor, metolacloro OA, 3-hidroxicarbofurano, terbufos y sulfona, que pueden estar presentes en mayores niveles que el propio plaguicida de origen, siendo además el producto de la degradación igual o más tóxico que el original (51). También se están utilizando algunos nuevos, como los derivados glifosatos y organofosforados. Especial atención se está prestando a derivados de alacloro ESA acetanilida, triazina, cianazina, y atrazina desetil. El glifosato (N-fosfometilglicina) es el ingrediente activo en el herbicida de amplio espectro comercialmente conocido como Roundup, y es actual-

mente el herbicida más utilizado en el mundo (52); además, se ha identificado un producto de su degradación: el aminometilfosfónico (AMPA), demostrándose que no es eliminado en las plantas depuradoras. En general, el AMPA se detecta con mucha más frecuencia (67,5 %) en comparación con el glifosato (17,5 %). Se han observado significativas diferencias en función del tipo de suelo. Un suelo arcilloso puede llegar a dar concentraciones promedio superiores a 0.1 mg/L, el valor umbral europeo para el agua potable (53).

Parece que este es el mejor momento para profundizar en la técnica analítica que ha permitido el conocimiento exhaustivo de los compuestos químicos orgánicos considerados como contaminantes emergentes, es decir, la *Espectrometría de Masas y Técnicas Acopladas*.

En efecto, la Espectrometría de Masas se considera la técnica analítica capaz de proporcionar más información sobre productos químicos que cualquier otro método de análisis con una cantidad mínima de muestra (54). Merece la pena recordar que la MS fue desarrollada inicialmente para medir la masa exacta de determinadas estructuras moleculares, por lo que se ha empleado durante muchos años para la caracterización estructural pura de compuestos volátiles y finalmente se ha extendido al estudio de todo tipo de macromoléculas en matrices complejas.

El extraordinario progreso de las dos últimas décadas ha sido posible gracias a los avances en el acoplamiento con técnicas de separación, nuevas formas de ionización y detectores. Sobre todo, el acoplamiento Cromatografía Líquida de Alta Resolución (en todas sus facetas) - Espectrometría de Masas se ha convertido en una herramienta analítica fascinante y, junto con la Cromatografía de Gases (GC) acoplada a Espectrometría de Masas, ha permitido la identificación de un sinnúmero de contaminantes ambientales (55).

El analizador de masas de tiempo de vuelo (TOF) ha supuesto también una incorporación instrumental decisiva debido a su alta resolución y aplicabilidad a analitos con diferente polaridad y peso molecular. La información obtenida por TOF-MS permite proponer fórmulas empíricas y estructuras químicas, hace posible el uso de bibliotecas estructurales (56).

Otra configuración instrumental fundamental en la obtención de información de pesticidas y sus productos de degradación y de fármacos, disruptores endocrinos, etc., es el sistema Ion-Trap-FT, con impresionantes resoluciones (57). El detector de triple cuadrupolo ha permitido la identificación y cuantificación de gran parte de los contaminantes emergentes incorporados en los últimos quince años (58); y la Electroforesis Capilar (CE) acoplada a MS ha dado excelentes resultados en sistemas electrostáticamente cargados (59).

Las técnicas de desorción/ionización e ionización por electrospray (ESI) son, probablemente, las más empleadas para el análisis de contaminantes polares como pesticidas o disruptores endocrinos. Otras fuentes de ionización a presión atmosférica (APCI) y fotoionización a presión atmosférica (APPI) proporcionan mejores resultados para compuestos menos polares o no polares (60, 61).

Algunas técnicas muy especiales como la monitorización de reacción múltiple (MRM) proporcionan un gran aumento de sensibilidad, reduciendo el fondo sin comprometer la selectividad.

El estudio de los productos de degradación utilizando técnicas de Cromatografía Líquida/Espectrometría de Masas en tándem es un asunto que parece no tener fin por el enorme número de compuestos distintos que podemos llegar a identificar y la enorme variedad de tipos de muestras susceptibles de verse afectadas, tales como frutas,

verduras, leche, carne, huevos, miel, harina, arroz, alimentos para bebés, cereales, fruta, jugos, refrescos, aceite de oliva, vinos y otras bebidas alcohólicas. El seguimiento de los productos de degradación del alacloro ESA, acetanilida, triazina, cianazina, atrazina-desetil utilizando LC/MS/MS permite controlar más de 500 pesticidas de alta prioridad (62); en este sentido, es clave la mayor anchura de pico en LC que en GC y la posibilidad de disminuir mucho los *dwell time* de los detectores de los espectrómetros de masas.

En la selección de las técnicas de detección de masas a utilizar es muy interesante la comparación entre los resultados obtenidos por las distintas técnicas de Espectrometría de Masas de tiempo de vuelo o de triple cuadrupolo. Hoy existe un consenso generalizado en que los TOF que *a priori* presentan mejores resoluciones pueden ser menos sensibles que los de triple cuadrupolo. Sin embargo, el perfeccionamiento de distintos métodos de ionización y la utilización de trampas iónicas han permitido un gran margen de seguridad en la identificación de productos de degradación, en especial para identificar los productos de transformación y metabolitos de diversos plaguicidas como el diazinón (63); también, para determinar rápidamente 18 plaguicidas polares y 9 productos de transformación (en su mayoría de atrazina y derivados), como en el caso detectado en aguas de Beijing, con niveles de 35,9 a 217,3 ng/L.

En los últimos años, posiblemente la recopilación más útil de estrategias de Espectrometría de Masas para determinar pesticidas y sus metabolitos en alimentos y aguas es el trabajo de Botitsi y colaboradores (64), incluyendo un original concepto para la etapa de preparación de muestras, la llamada aproximación QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe), y una completísima

descripción de metodologías para el control de pesticidas en frutas, vegetales, leche, carne, huevos, miel, arroz, cereales, alimentos infantiles, zumos, aceite de oliva, vino y otras bebidas alcohólicas.

Es destacable la creciente utilización de técnicas de inmunoensayo enzimático para la detección rápida de plaguicidas y sus productos de degradación (65), aunque la excesiva presencia de falsos positivos hace muchas veces necesario el contraste de resultados por LC/MS/MS.

En los últimos años se han incorporado detectores de Resonancia Magnética Nuclear a cromatógrafos líquidos, ampliando las posibilidades de identificación de productos de degradación. En efecto, se han caracterizado las rutas de biodegradación del herbicida mesotrione (66) usando NMR, LC/NMR y LC/MS. El uso de LC/RMN ha permitido la identificación inequívoca de 6 metabolitos.

Productos derivados de procesos de tratamiento y desinfección de aguas

En los últimos diez años, el endurecimiento de la normativa legal sobre el control de los procesos de desinfección de aguas, tanto de consumo como las de fines recreativos, ha destapado la existencia de productos derivados de los procesos de tratamiento y desinfección de aguas.

En realidad, corresponden a productos conocidos por las siglas DBPs (*drinking byproducts*), que se originan en la reacción de los desinfectantes (cloro, cloraminas, ozono, dióxido de cloro, etc.) con la materia orgánica natural (NOM) y/o bromuro o yoduro en las aguas originales.

Por otra parte, son muchos los estudios enfocados a un proceso singular y específico, en especial en aquellos casos en los que el contaminante emergente proviene en

realidad de la derivatización de otro contaminante que se transforma durante el proceso de tratamiento y desinfección de aguas.

La presencia de algunos fungicidas utilizados en Europa como el tolitfluoranilide pueden provocar altos niveles de N-nitrosodimetilamina en el agua potable por la acción del ozono utilizado en el proceso de desinfección.

De estos contaminantes emergentes, posiblemente desde un punto de vista toxicológico los más preocupantes son los bromados, yodados, simultáneamente con contenido de nitrógeno. El problema es más grave en ciudades costeras, donde tanto las aguas superficiales como subterráneas pueden ser contaminadas por agua de mar o si circulan por depósitos de salmueras, donde puede haber altos contenidos de bromuros y yoduros.

La utilización de técnicas analíticas de ESI-MS/MS ha permitido descubrir nuevos contaminantes de este tipo altamente polares, como tres nuevas haloquinonas, en agua potable: 2,6-dicloro-3-methyl-1,4-benzoquinona, 2,3,6-tricloro-1,4-benzoquinona y 2,6-dibromo-1,4-benzoquinona (67). Como consecuencia del descubrimiento, se han estudiado las interacciones de estas haloquinonas con oligodeoxinucleótidos para conocer su potencial tendencia a enlazar con DNA (68). Usando ESI-MS se ha podido conocer que la afinidad de enlace de 2,6-dibromo-1,4-benzoquinona con oligodeoxinucleótidos es similar a la del bromuro de etidio, un carcinógeno bien conocido; igualmente, el resto de haloquinonas muestra afinidad por el DNA en el orden: 2,6-dibromo-1,4-benzoquinona > 2,6-dicloro-1,4-benzoquinona > 2,6-dicloro-3-metil-1,4-benzoquinona > 2,3,6-tricloro-1,4-benzoquinona.

Tal vez la aportación más espectacular en este ámbito sea el trabajo de Richardson (69), donde se identifican y describen más de 600 contaminantes emergentes

provenientes de distintos desinfectantes y sus combinaciones, y se tratan, además, sus procesos de formación, persistencia, rutas de exposición, etc.

Un caso especial muy interesante es la identificación de DBP producidos por la cloración de fármacos reguladores lipídicos como el gemfibrozil (70) utilizando GC/MS y LC/ESI-MS/MS para el análisis estructural, y RMN de H^1 para confirmar las especies aisladas. Las reacciones de cloración incluyen la incorporación de uno a tres átomos de cloro en el anillo aromático del gemfibrozil, habiéndose identificado tres productos: ácido 5-(4-cloro-2,5-dimetilfenoxi)-2,2-dimetilpentanoico, ácido 5-(4,6-dicloro-2,5-dimetilfenoxi)-2,2-dimetilpentanoico y ácido 5-(3,4,6-tricloro-2,5-dimetilfenoxi)-2,2-dimetilpentanoico.

Sin pretender alarmar a nadie, solo somos testigos de evidencias experimentales. El uso del agua como elemento recreativo es una arraigada afición de un muy elevado porcentaje de la población mundial, y parece que los controles funcionan, pero las piscinas, parques acuáticos, etc., están siendo reconocidos como el origen de una importante exposición a los subproductos de desinfección. Parece existir una cierta tendencia al incremento de cáncer de vejiga y mayores riesgos de crisis asmáticas.

Ya se ha demostrado, sin lugar a dudas, que la utilización de derivados bromados en el tratamiento de piscinas tales como la bromoclorodimetilidantoína pueden ser altamente genotóxicos y que deben ser eliminados, aunque el riesgo está mitigado por la exposición a la luz solar, lo que sugiere procesos de degradación fotolítica hacia compuestos menos tóxicos.

Algunos casos espectaculares se circunscriben a las piscinas cubiertas y *spas*. En efecto, se acepta que las tricloroaminas en combinación con otros DBPs pueden ser

las causantes de muchos procesos inflamatorios bronquiales y pulmonares (71). Un típico DBP son los ácidos haloacéticos. Con exposiciones solamente de 20 a 30 minutos en piscina cubierta se han llegado a determinar entre 120 y 300 ng/L de ácidos di- y tricloroacético debido a la exposición de aerosoles que contienen ácidos haloacéticos; tal vez, lo más espectacular es que después de una hora de natación en piscina cubierta los niveles en orina pueden llegar a 4400 ng/L. Las estimaciones de exposición indican que la ingestión accidental es la principal vía de exposición a ácidos haloacéticos (~94 %), seguida por la inhalación (~ 5 %) y la exposición dérmica (~1 %) (72, 73).

La controversia sobre bromación o cloración ha continuado en los últimos años (74), siendo la tricloroamina y el bromoformo los principales actores del proceso, no aclarado pero sí definido con la presencia de más de 100 DBPs, incluyendo muchos nitrogenados.

Productos farmacéuticos, hormonas, y compuestos disruptores endocrinos

Las primeras evidencias de la presencia de fármacos en el medio acuático se produjeron en los años setenta con la identificación en aguas residuales en EE.UU. del ácido clofibrico, que es el metabolito activo de varios reguladores de lípidos en sangre (clofibrato, etofilin clofibrato y etofibrato). Sin embargo, no ha sido hasta principios de la década de 1990 cuando el tema de los fármacos en el medio ambiente comenzó a preocupar seriamente.

La US Food and Drug Administration ha publicado una base de datos con los 3193 fármacos más vendidos. De ellos 275 ya han sido identificados en distintas muestras reales ambientales, 92 con propiedades bioacumula-

tivas altas, 121 fuertemente persistentes, 54 son simultáneamente bioacumulativos y persistentes y 99 de todos ellos se considera que son los más importantes a vigilar por su consideración de fármacos de volumen de producción muy alto.

Así pues, nos enfrentamos a un problema centrado en unos 3200 principios activos, incluyendo analgésicos, antibióticos, antidiabéticos, betabloqueantes, anticonceptivos, reguladores de lípidos, antidepresivos, medicamentos de quimioterapia y medicamentos contra la impotencia. Hay que tener en cuenta, además, que no se trata solamente de medicamentos para seres humanos; también los fármacos veterinarios representan una amenaza de análogas características.

En este caso se plantea una cuestión clave. En realidad, la presencia de los productos farmacéuticos en las distintas etapas del ciclo del agua se detecta a bajísimas concentraciones, generalmente unos pocos ppb. ¿Realmente son perjudiciales a esos niveles? Volvemos a la incertidumbre científica en un caso controvertido.

Entre los fármacos más prescritos en medicina humana destacan los analgésicos/antiinflamatorios como el ibuprofeno y el diclofenaco, los antiepilépticos como la carbamazepina, antibióticos como la amoxicilina y el sulfametoxazol, y los bloqueantes como el metoprolol. La liberación de antibióticos en el medio ambiente puede provocar el desarrollo de resistencia bacteriana, e incluso que se produzcan efectos de disminución del rendimiento de procesos de biodegradación de material vegetal que sirve como principal fuente de alimento para la vida acuática en los ecosistemas.

A los fármacos usados en seres humanos cabe añadir los cada vez más utilizados en veterinaria, en actividades como la acuicultura, la ganadería y la avicultura. Según

las propiedades físico-químicas de los fármacos y sus metabolitos y productos de degradación, y las características de los suelos, estas sustancias pueden llegar a alcanzar las aguas subterráneas y contaminar los acuíferos, o bien quedar retenidas en el suelo y acumularse pudiendo afectar al ecosistema y a los humanos a través de la cadena trófica. En consecuencia, para una evaluación realista del medio acuático es necesario un estudio integral agua subterránea-suelo/sedimento-agua superficial-suelo.

Las concentraciones detectadas en aguas superficiales (como consecuencia de una eliminación incompleta en las plantas de depuración de aguas) o en aguas subterráneas (debido a la escasa atenuación que experimentan algunos compuestos durante la filtración a través de suelos) se sitúan normalmente en el rango de ng/L o mg/L, mientras que en suelos y sedimentos, en donde pueden persistir durante largos periodos de tiempo (la vida media del ácido clofibríco, por ejemplo, se estima en 21 años) se han detectado concentraciones de hasta g/kg (75). Pero lo que ha despertado una mayor preocupación ha sido el hallazgo de algunos de ellos (como el ibuprofeno, el diclofenaco, la carbamazepina o el ácido clofibríco) en aguas potables (76).

En muchos casos, las consecuencias de su presencia en el medio ambiente no están aún claras, pero en otros el riesgo parece evidente y alarmante. Así, por ejemplo, el diclofenaco, además de afectar a la función renal en los mamíferos, se ha asociado (como consecuencia de su uso en veterinaria) con la desaparición de los buitres blancos en la India y Pakistán, lo que supone, según el autor de este estudio (77), un desastre ecológico comparable al acontecido en el pasado con el DDT. Otro ejemplo es el del propanolol, que el equipo de investigación del Dr. Barceló ha detectado en múltiples ocasiones en España (78)

y que, como se ha visto, tiene efectos sobre el zooplancton, así como sobre los organismos bentónicos (77).

Algunos fármacos están ya incluidos por la US EPA en la lista de los contaminantes orgánicos prioritarios en el agua potable, como es el caso del diclofenaco (antirreumático), la carbamazepina (antiepiléptico) y el cloranfenicol (antibiótico). En la UE se empezó a legislar a principios de la primera década del 2000. La Directiva Marco del Agua (2000) de la UE ya incluyó dos productos farmacéuticos (diclofenaco y el ibuprofeno) y dos hormonas (EE2 y E2).

De todas formas, está primando el sentimiento de precaución, y, así, la US EPA ha incluido en su última CCL-3 (<[http://water.epa.gov/Scitech/agua de consumo/DWS/ccl/ccl3.cfm](http://water.epa.gov/Scitech/agua%20de%20consumo/DWS/ccl/ccl3.cfm)>) fármacos como la eritromicina, la nitroglicerina y algunas hormonas naturales y sintéticas como 17α -etinilestradiol [EE2], 17α -estradiol, 17β -estradiol [E2], equilenina, equilina, estriol [E3], estrona, mestranol y noretindrona.

Un importante factor de estudio en este tipo de contaminantes emergentes es considerar el destino de los productos farmacéuticos de aguas residuales a las aguas de los ríos, a las fuentes de agua natural, aguas potables, etc., ya que el problema real es distinto en función del tipo de utilización del agua.

Algunos fármacos se incorporan a las aguas residuales sin ser metabolizados previamente, mientras que otros fármacos son metabolizados parcialmente en el cuerpo humano, lo que implica una combinación de fármaco original y metabolitos.

En el caso de los antibióticos, algunos de los detectados como ciprofloxacina, ofloxacina y norfloxacina han sido a niveles superiores a 1 mg/kg junto a otros compuestos como bisfenol A, triclosán, triclocarbán con

propiedades químicas muy distintas (hidrofobicidad, solubilidad, etc.), sugiriendo que el destino y transporte desde distintos suelos puede ser muy variable (79). El triclosán y triclocarbán tienen una gran hidrofobicidad, lo que indica una fuerte retención en el suelo original, al contrario que los que son relativamente solubles en agua como ciprofloxacina, norfloxacina y ofloxacina, lo que sugiere una fuerte movilidad hidrofílica, con el resultado de un importante transporte en el entorno de las aguas superficiales (80). Esto implica otros mecanismos que pueden ser relevantes en su consideración como contaminantes emergentes, tales como atracciones electrostáticas (81). Si esta interacción electrostática juega un papel sustancial en los procesos de adsorción, algunas teorías como el concepto de K_{ow} no pueden aplicarse. Por otro lado, el pK_a del contaminante emergente en cuestión y el pH de la matriz suelo serán críticas para entender los procesos de reparto.

En el ámbito analítico la existencia de técnicas acopladas de Cromatografía Líquida o de Gases con distintos tipos de detectores de Espectrometría de Masas ha facilitado en los últimos años un exhaustivo control de la presencia de fármacos y sus metabolitos tanto en muestras de aguas como en sedimentos, lodos, alimentos, etc., aunque la complejidad del tratamiento previo de la muestra en las muestras sólidas hace que el proceso sea menos robusto en estas que en las líquidas. La aplicación de LC/MS/MS, ESI, APCI, FT-MS, Q-TOF-MS, GC/MS/MS, combinadas con tratamientos de extracción en línea, derivatización en línea, han permitido no solo la detección y cuantificación de los casos que se reflejan en la tablas 4 y 5, sino además la realización de estudios químico-toxicológicos que han permitido conocer sus efectos en distintos ecosistemas, seres vivos y vegetales.

Tabla 4
METABOLITOS, ESTEROIDES, BETABLOQUEANTES DETECTADOS
EN DISTINTOS TIPOS DE AGUAS DESDE 2010

Contaminante Emergente	Uso	Kg prescritos 2012	Concentración final efluente ng/mL	Agua superficial ng/mL	Agua superficial máximo ng/mL
Ácido Clofibríco	Metabolito	—	6-44	<0.3-101	164
Ácido Salicílico	Metabolito	—	75-209	462	302
Norfluoxetina	Metabolito	—	5.8-13	1.3-2.8	3.5
Nortramadol	Metabolito	—	145-433	11-181	410
Norcodeína	Metabolito	—	24-33	2.1-9.0	20
Normorfina	Metabolito	—	20-62	<5-5.7	5.7
Norbuprenorfina	Metabolito	—	<0.7-7.5	<0.5-12.2	3.4
EDDP	Metabolito	—		1.2-19	38
EMDP	Metabolito	—	1.3-1.7	0.6-1.0	1.1
Norfentanil	Metabolito	—	1.1	<0.1	—
Norpropoxifeno	Metabolito	—	91-106	6.5-31	80
Nordiazepam	Metabolito	—	5.8-9.9	0.7-3.2	6.8
Aminonitrazepam	Metabolito	—	<1.2	<0.5	—
Norketamina	Metabolito	—	14-28	1.7-5.8	14
Estrona	Esteroides estrógenos	—	4.3-12	—	—
17β-estradiol	Esteroides estrógenos	84	0.4-1.3	—	—
17α-etinilestradiol	Esteroides estrógenos	12	0.20-0.47	—	—
Propranolol	Beta bloqueante	9076	93-388	<0.5-107	215
Metoprolol	Beta bloqueante	2311	41-69	<0.5-10	12
Salbutamol	Beta bloqueante	182	63-66	<0.5-2	8
Atenolol	Beta bloqueante	20,725	2123-2,870	<1-487	560
Ranitidina	H ₂ receptor agonista	35,665	<9-425	<3-32	73
Cimetidina	H ₂ receptor agonista	3195	462-2,605	<0.5-105	220
Diltiazem	Bloqueante canal calcio	21,922	95-357	<1-17	65

Es clave poder llegar a determinar no solo los niveles de concentración de riesgo, sino también los efectos de muy bajas concentraciones por debajo del efecto pernicioso agudo, es decir, establecer los efectos de cronicidad debido a la persistencia de muy bajas concentraciones, ya que, generalmente, los efectos observados corresponden en muchos casos a concentraciones más altas que las medidas en muestras reales. Sin embargo, hay algunas excepciones notables en las que se alcanzan niveles de toxicidad crónica en efluentes de aguas residuales. Este es el caso del ácido salicílico, diclofenaco, propranolol, ácido clofibrico, carbamazepina y fluoxetina. Por ejemplo, para el diclofenaco, la concentración encontrada para toxicidad crónica en pescado está en el rango de concentraciones de aguas residuales, y la de propranolol y la fluoxetina para los organismos del zooplancton y bentos estaba cerca de la máxima medida en los efluentes de aguas residuales. El antibiótico ciprofloxacina también se ha demostrado que tiene efectos perniciosos sobre el plancton y el crecimiento de algas con importantes efectos estrogénicos.

El anticonceptivo α -etinilestradiol (EE2) produce también efectos estrogénicos en peces en concentraciones extremadamente bajas (ng/L). Los efectos incluyen la alteración de los procesos de reproducción, características sexuales y la disminución de la fertilización del huevo (82). Una excelente revisión que cubre hasta 2010 es la de Santos y cols. (83) sobre el efecto de muchos productos farmacéuticos de diferentes clases y sus metabolitos y productos de degradación incluyendo datos de ecotoxicidad. Por otra parte, los fármacos utilizados en tratamientos de quimioterapia están empezando a preocupar medioambientalmente, ya que muchos de ellos no son biodegradables y pueden producir daño en el DNA, inhibir su síntesis e interrumpir la replicación celular, aunque el consumo de fármacos citostáticos es muy bajo comparado con otras clases de medicamentos (84).

Tabla 5
ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDES (NSAID), ANTIBACTERIANOS, ANTIEPILEPTICOS,
ANTIDEPRESIVOS, ANALGÉSICOS Y OTROS FÁRMACOS DETECTADOS
EN DISTINTOS TIPOS DE AGUAS DESDE 2010

Contaminante emergente	Uso	Kg prescritos 2012	Concentración final efluente ng/mL	Agua superficial ng/mL	Agua superficial máximo ng/mL
Acetaminofenaco	NSAID	>2,000,000	<20-11,733	1.5-1,388	2,382
Diclofenaco	NSAID	10,652	58-599	<0.5-154	568
Ibuprofeno	NSAID	108,435	143-4,239	1-2,370	5,044
Naproxen	NSAID	126,258	170-370	1-59	146
Ketoprofen	NSAID	243	16-23	1-4	14
Amoxicilina	Antibacteriano	158,231	31	<2.5-245	622
Eritromicina	Antibacteriano	41,057	109-1,385	<0.5-159	1,022
Metronidazol	Antibacteriano	12,300	265-373	<1.5-12	24
Ofloxacina	Antibacteriano	219	10	—	—
Cloramfenicol	Antibacteriano	—	<6-21	<10	40
Sulfametoxazol	Antibacteriano	—	10-19	<0.5-2	8
Sulfapiridina	Antibacteriano	—	277-455	<2-28	142
Carbamazepina	Antiepileptico	44,498	826-3,117	<0.5-251	684
Gabapentina	Antiepileptico	104,110	2592-21,417	<0.6-1,879	1,887
Furosemida	Diuretico	14,480	629-1,161	<6-129	630
Fluoxetina	Antidepresivo	5319	16-29	5.8-14	14
Venlafaxina	Antidepresivo	16,211	95-188	1.1-35	85
Dosulepina	Antidepresivo	3270	57	0.5-25	32
Amitriptilina	Antidepresivo	10,171	66-207	<0.5-30	72
Nortriptilina	Antidepresivo	439	7.6-33	0.8-6.8	19
Tramadol	Analgésico	41,445	739-59,046	<30-5,970	7,731
Oxicodona	Analgésico	—	7-12	0.5-3	7.1
Oximorфона	Analgésico	—	<1.7-8.4	<0.1-2.3	3.5
Morfina	Analgésico	5684	59-131	1.6-36	36
Dihidrocodeína	Analgésico	9720	118-146	2.9-36	97
Metadone	Analgésico	1687	42-50	0.6-12	24
Fentanil	Analgésico	1.0	<1.0-0.5	<0.1	—
Propoxifeno	Analgésico	—	7.1	<0.1	—
Ketamina	Anestésico	64	83-130	0.6-27	54
Bezafibrato	Regulador lipídico	7966	177-418	<10-60	90

Contaminante emergente	Uso	Kg prescritos 2012	Concentración final efluente ng/mL	Agua superficial ng/mL	Agua superficial máximo ng/mL
Simvastatina	Regulador lipídico	49.198	<3-5	<0.6	—
Valsartan	Hipertensión	66484	192-344	<1-55	144
Teofilina	Broncodilatador	4	1220-3,169	76-558	1,439
Codeine	varios	34,626	372-5,271	<1.5-347	815
Bupreorfina	varios	91	14	<0.5-15	14
Temazepam	Hipnótico	833	135-179	3.2-34	78
Diazepam	Hipnótico	335	1.6-5.1	0.6-0.9	1.1
Oxazepam	Hipnótico	85	33-58	2.4-11	21
Sildenafil	Disfunción eréctil	570	7.0-9.7	<1-2.2	2.9
Efedrine/ pseudofedrine	varios	622	35-70	7.7-15	17-29
Norefedrine	varios	—	59	<5	—

Ciertos productos químicos sintéticos y naturales tienen la capacidad de imitar hormonas y, por tanto, son capaces de interferir o interrumpir las funciones hormonales normales. Los naturales más importantes son, entre otros: sitosterol, estrona, testosterona, fitoesteroides e iso-flavonas (daidzeína); y los sintéticos: etinilestradiol, plaguicidas (atrazina), ftalatos, surfactantes de etoxilato de alquifenol, dioxinas, bifenilos policlorados (PCB), parabenos (derivados hidroxibenzoato), bisfenol A (85).

En la vida silvestre, los disruptores endocrinos son responsables de la disminución de ciertas especies del cambio de sexo en los peces y mariscos, y otros problemas como la disminución del número de espermatozoides en seres humanos.

Estos compuestos pueden llegar al medio ambiente acuático a través de descargas de aguas residuales. La nomenclatura americana de la EPA denomina CAFO a sitios donde se realizan «operaciones de alimentación y crecimiento de animales (Concentrated Animal Feeding Ope-

ration (CAFO)», estableciendo algunas condiciones en cuanto a días de confinamiento de los animales, vegetación asociada al sitio y umbrales de tamaño numérico de animales. La versión europea que corresponde a la americana CAFO son las aquí denominadas «granjas». Pues bien, las de ganado porcino y pollos se han reconocido ya como fuentes importantes de estrógenos en el medio ambiente. Utilizando tanto LC/MS/MS como GC/MS/MS se han medido estrógenos y sus conjugados, en donde estos últimos representan al menos un tercio de los estrógenos totales equivalentes.

Está ya experimentalmente contrastado (86) que en los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales de algunas industrias farmacéuticas de producción de anticonceptivos se han identificado y medido esteroides estrógenos tales como estrona, estradiol y estriol mediante SPE-LC/MS/MS con límites de detección de 0,7 a 2,0 ng/L. Se ha generalizado mucho el uso de técnicas de separación y microextracción, bien sea utilizando SPE, o bien fibras huecas poliméricas, llegando a obtenerse límites de detección muy bajos, del orden de 0,03 ng/L (87) en aguas.

Desde nuestra perspectiva y experiencia en sensores, resultan muy interesantes las propuestas de inmunosensores para medir E2 y EE2 en agua de río (88) con límites de detección de hasta 0,01 ng/L para E1, E2, E3, EE2, dietilestilbestrol, mestranol, progesterona, 19-noretisterona, norgestrel (89).

En los últimos diez años se está prestando una especial atención al control de las drogas ilícitas con una doble finalidad: por un lado, para su detección, caracterización, cuantificación, determinar su destino, comportamiento y efectos en el medio ambiente y, por otro, utilizar los datos obtenidos para extrapolarlos y obtener indicadores de consumo en las zonas estudiadas.

No hay demasiados datos experimentales todavía. Las primeras informaciones fiables son del año 2004, emitidas por Jones-Lepp de la EPA, y en Europa por Castiglioni en 2006, y también por Petrovic y cols. (90) en 2008.

Un completo e interesante libro del propio Castiglioni (91) ha recogido, desde la información facilitada por varios investigadores, las incidencias de la presencia de drogas ilícitas en aguas residuales, aguas de río, aguas subterráneas, aguas potables, aire y materia particulada. En el libro se exponen también las técnicas analíticas de medida, fundamentalmente de Espectrometría de Masas, y las implicaciones ecotoxicológicas.

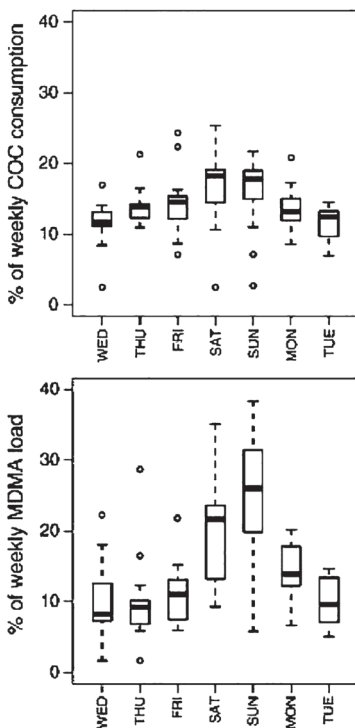
Es realmente interesante el estudio espacial y estacional realizado sobre cocaína y su metabolito benzoilecgonina realizado en Bélgica usando técnicas de extracción y preconcentración de SPE y detección por Cromatografía Líquida de interacción hidrofílica y Espectrometría de Masas en tándem (HILC/MS/MS) (92). Con los resultados obtenidos puede concluirse que no hay diferencias significativas de consumo en Bruselas (norte) entre el verano/otoño e invierno, con unos registros constantes mensuales, aunque se observan picos más altos durante los fines de semana.

En el Reino Unido un total de 15 drogas ilícitas se detectaron y midieron en aguas residuales en un estudio realizado en 2011: MDMA-MDEA-MDA (éxtasis), anfetamina, metanfetamina, cocaína, benzoilecgonina, norbenzoilecgonina, norcocaína, cocatilen, bencilpiperazina, triflurometil-fenilpiperazina, 6-acetilmorfina, cafeína y nicotina. Aunque las concentraciones fueron generalmente bajas, la serie de trabajos de Baker (93, 94, 95, 96, 97) realizados entre 2011 y 2013 ofrece un excelente panorama de técnicas de extracción, preconcentración, en aguas residuales, efluentes, lodos de depuradoras, etc., confirmando los problemas que

plantea el hecho de que las drogas tipo cocaína y metabolitos no se eliminan totalmente en el tratamiento y son vertidas a las aguas superficiales, obteniéndose valores del alucinógeno 3,4-metilendioxi-N-metilanfetamina (MDMA, éxtasis) y cocaína en concentraciones de 25 a 17 ng/L. En algunos casos puntuales se han llegado a determinar cantidades máximas de 1597 ng/L del metabolito de la cocaína, la benzoilecgonina en aguas residuales sin depurar.

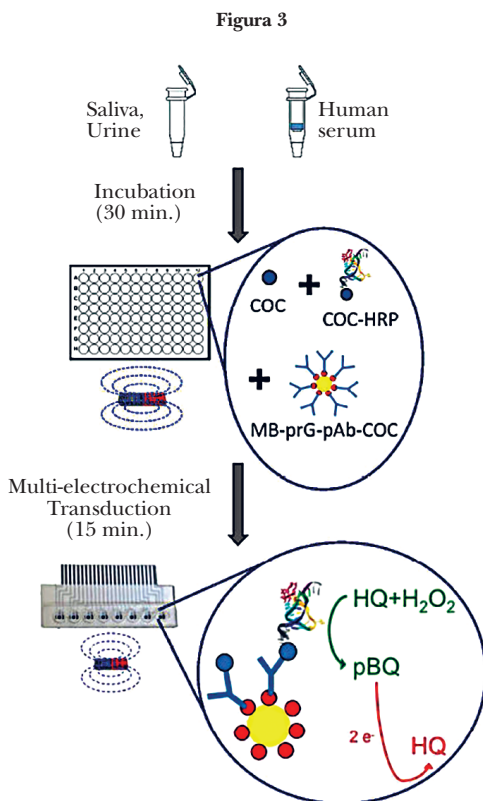
Figura 2

DISTRIBUCIÓN TEMPORAL DE CONTENIDOS DE COCAÍNA EN EL NORTE DE BRUSELAS



Water Research 72 (2015); 3-27

Se produce en los últimos años una fuerte tendencia al desarrollo de sensores rápidos y portables para la determinación de drogas de abuso. En la figura 3 se detalla un nuevo inmunosensor para la determinación de cocaína no metabolizada.



Scheme 1. A schematic representation of the developed multi-electrochemical immunosensor for the sensitive cocaine determination in biological samples.
130x208 mm (219x219 DPI)

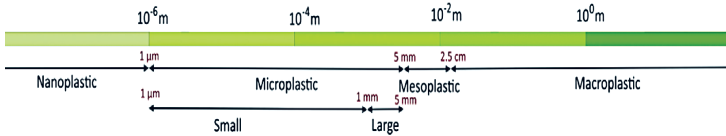
J. C. Vidal, J. R. Bertolín, L. Bonel, L. Asturias, J. Arcos-Martínez, J. R. Castillo
ELECTROANALYSIS Manuscript ID elan.201500517

Tabla 6

ALGUNOS FÁRMACOS MEDIDOS EN BIOSÓLIDOS DE PLANTAS DEPURADORAS DE DISTINTOS PAÍSES

Contaminante emergente	País	Concentración media en biosólido (mg kg-1 en residuo seco)
Estrona	Alemania	<MQL-0.02
	Canadá	0.06
	Australia	<MQL-0.28
Ibuprofeno	España	0.30/0.02-0.44/0.09
	Canadá	0.15/0.17/0.06
Naproxen	Canadá	0.02/0.01
	España	<MQL-0.02
Diclofenaco	España	0.19/<MQL-0.63/0.06
	Canadá	<MQL-0.02
Acetaminofenona	España	0.03/0.02-0.29
	EE. UU.	<MQL-0.37
	Canadá	0.02
Gemfibrozil	España	0.12/<MQL-0.07
	Canadá	0.008/<MQL-0.003
Carbamazepina	España	0.08/0.03
	EE. UU.	<MQL-0.02
	Canadá	0.26/0.18/0.09/0.01
Fluoxetina	España	0.12
	Canadá	0.09/0.11
Propranolol	España	0.03
	Canadá	0.04/0.12/0.36/0.23
Ciprofloxacín	Suiza	2.27-2.42
	Suecia	0.50-4.80
	Canadá	6.50/5.87/3.26/<MQL-0.05
Norfloxacín	Suiza	2.13-2.37
	Suecia	0.10-4.20
	Canadá	1.75/1.01
Ofloxacín	Suecia	<MQL-2.00
	España	0.07
	Canadá	0.69/1.07//1.40
Tetracyclina	EE. UU.	<MQL-0.56
	Canadá	0.24/0.34/0.51/<MQL-0.01
Triclosán	Grecia	3.21
	EE. UU.	0.53-15.6
	España	1.51
	Canadá	0.68-11.55/6.80/4.68/10.9
	Australia	5.58/0.22-9.89
	EE. UU.	4.89-9.28
Triclocarbán	Canadá	3.05-5.97/2.90//6.03/4.94
	EE. UU.	0.09-7.06/51.0
Bisfenol A	Grecia	0.53
	China	0.01
	Australia	0.06-1.37

Figura 4



Marine Environmental Research 111 (2015); 5-17

Microplásticos

La presencia de pequeños fragmentos de plásticos en el océano fue descrita por primera vez en 1970 por Carpenter (98). Estos microplásticos representan una seria amenaza, ya que su tamaño (menos de 5 mm) los hace accesibles a una gran variedad de organismos, incluso muy pequeños, como el zooplancton, provocando un alto riesgo físico y toxicológico.

La National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) ha definido *microplástico* como fragmentos inferiores a 5 mm de diámetro (99).

Los microplásticos primarios procedentes de gránulos abrasivos usados en chorro de arena pueden acceder directamente al medio acuático por descarga después de su uso o derrames accidentales. También los microplásticos pueden generarse en el medio ambiente por fragmentación de plásticos grandes (se llaman entonces *secundarios*), fragmentación de fibras, degradación fototérmica, oxidación y/o mecanismos de abrasión (100, 101).

La producción anual global de plásticos ha crecido exponencialmente, alcanzando los 299 millones de toneladas en 2014 (102). Se acepta que la cantidad que llega a los océanos es de entre 4,8 y 12,7 millones de toneladas desde las costas de unos 192 países en 2010 (103), y se estima que la cantidad mínima de plásticos flotantes (de 0,33 mm de tamaño máximo) es de unas 0,27 toneladas, lo que supone, aproximadamente, 5,2 trillones de partículas,

que acompañan a los microplásticos de 0,33 a 5 mm, que son el 92 % del número de partículas; el total alcanza las 250 000 toneladas (104).

Un reciente estudio ha estimado que existen 269 000 toneladas y unos 5,25 trillones de partículas flotando en la superficie de los océanos (105).

Sin embargo, todos estos datos no incluyen los plásticos existentes en el lecho marino y playas (106, 107), considerándose que los lechos marinos son el mayor depósito de microplásticos; y muy recientemente se ha confirmado que la mayoría de ellos tienen un tamaño comprendido entre 0,001 y 0,33 mm (108).

En sedimentos marinos pueden retenerse todos los tamaños; sin embargo, una eficiente caracterización para un exacto conocimiento de los depositados es especialmente difícil cuando el tamaño disminuye. Las técnicas espectroscópicas de análisis han llegado a identificar fragmentos de 20 micras y menores, lo que supone un grave riesgo de ingestión por parte de organismos vivos (109). Pero, aun reconociendo la certeza de esta afirmación, el conocimiento de la distribución por tamaños y las relaciones de generación y degradación son totalmente desconocidas, por lo que los efectos, por ahora, son muy difíciles de evaluar con exactitud. Además, por regla general, los plásticos han sido fabricados para que sean duraderos, y, en consecuencia, pueden estar inalterados durante décadas.

Otro factor que hay que considerar es la posibilidad de que sean biodisponibles (o digeribles) por organismos muy pequeños; además, el incremento de superficie activa aumenta las posibilidades de *leaching* o desorción de aditivos o compuestos químicos adsorbidos, que serían transferidos al organismo vivo durante la digestión.

Los microplásticos pueden acumular una gran variedad de productos químicos, tales como diclorodifenil-

tricloroetano (DDT), bifenilos policlorados (PCBs) y éteres difenil polibromados (PBDE) (110) incrementando su concentración en varios órdenes de magnitud por preconcentración. Este proceso es reversible y los contaminantes son liberados por ingestión (111). Igualmente, pueden liberarse monómeros y algunos aditivos tóxicos como plastificantes, retardantes de llama y agentes antimicrobianos, que son incorporados a los plásticos durante su fabricación. Son ya varias las evidencias experimentales de este proceso en pescado (112, 113).

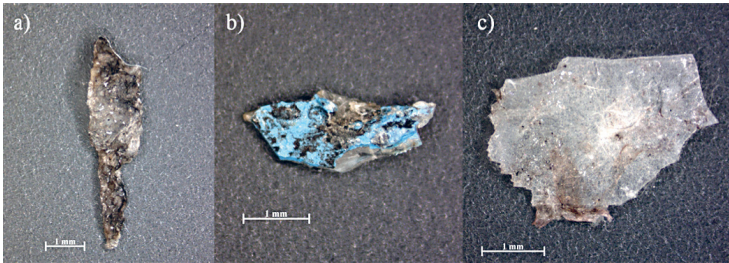
La ratio de transferencia depende del tipo de polímero plástico, del contaminante, de las condiciones del organismo vivo, del pH y de la temperatura; estas interacciones son específicas, pero no totalmente predecibles (114).

Tabla 7
DATOS DE ABUNDANCIA DE MICROPLÁSTICOS EN DISTINTOS OCÉANOS
(MUESTRAS TOMADAS CON RED DE MANTA Y RED NEUSTON)

Location	n/m ²	n/m ³	Particle abundance
Arctic waters (This study)	0.028	0.34	0-1.31/m ³
Bering Sea ⁴⁸	—	0.004-0.19	—
North Pacific subtropical gyre ¹⁹	—	0.116	—
North Pacific subtropical gyre ²⁸	0.02-0.45	—	—
South Californian current system ⁵⁰	—	0.011-0.033	0.00-3.14/m ³
South Pacific ²⁹	0.027	—	0-0.40/m ²
North Atlantic ⁵¹	—	0.01-0.04	—
North Atlantic subtropical gyre ²⁷	0.0015	—	0-0.2/m ²
Portuguese coast ⁵²	—	0.02-0.036	—
Equatorial Atlantic ⁵³	—	0.01	—
South Atlantic ⁵⁴	—	0.03	—
Mediterranean ³⁷	0.12	—	0-0.89/m ²
Mediterranean ⁵⁵	0.25	—	—
Mediterranean ⁵⁶	—	0.15	0.01-0.35/m ³

Figura 5

EJEMPLOS DE RESIDUOS ENCONTRADOS EN EL CONTENIDO DEL ESTÓMAGO DEL PEZ ESPADA (A), ATÚN ROJO (B) Y ATÚN BLANCO (C)



T. Romeo et al. Marine Pollution Bulletin 95 (2015); 358-361

La ingestión de estos microplásticos por peces habitualmente destinados a consumo humano en nuestro entorno más próximo ya cuenta con una irrevocable evidencia experimental. En efecto, en 2015, T. Romeo y cols., del Institute for Environmental Protection and Research de la UE en ISPRA y de la Universidad de Siena, han descrito por vez primera la existencia, en el estómago de grandes peces pelágicos (*Xiphias gladius*, *Thunnus thynnus* y *Thunnus alalunga*) capturados en el Mediterráneo entre 2012 y 2013, de microplásticos (<5 mm), mesoplásticos (5-25 mm) y macroplásticos (>25 mm). Ver figura 5. El 18,2 % de las capturas contenían microplásticos en su aparato digestivo (115). Sin comentarios.

Los más remotos océanos no se libran de este preocupante problema actual y futuro. Microplásticos de distintos tamaños han sido detectados y cuantificados en el océano Ártico (129) y en el océano Antártico (130). En el caso del océano Ártico, la zona estudiada ha sido al suroeste de Svalbard (mar de Barents). Se han detectado microplásticos en la superficie (a 16 cm) y a 6 metros de profundidad. La composición de las partículas, que en un 95 % eran fibras, sugiere que su origen puede ser la

destrucción de plásticos grandes. En esta experiencia se identificaron 665 partículas de tres tipos distintos: fibras (95 %), fragmentos (4,9 %) y films (0,1 %). Los dos colores predominantes eran negro (45 %) y azul (29 %). El tamaño oscilaba entre 0,25 mm y 7,1 mm. La composición química obtenida por espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier IR-FT correspondía a poliéster (15 %), poliamidas (15 %), polietileno (5 %), acrílicas (10 %), cloruro de polivinilo (5 %), celulosa (¿rayón?, 30 %); el resto (20 %) no han sido identificadas.

El comentario anterior sobre el uso de IR-FT para caracterizar la composición de estos microplásticos nos permite abordar el complejo y difícil problema de evaluar las posibilidades que la Ciencia Analítica, a través de sus técnicas y métodos, puede aportar para conocer el problema y facilitar la puesta en marcha de las medidas adecuadas para detener este auténtico despropósito.

Desde un punto de vista analítico, los tres tipos de compartimentos medioambientales marinos (sedimento, agua y biota) susceptibles de estudio presentan problemáticas muy distintas, con procesos de toma de muestra bien diferenciados (131).

Cuando se trata de analizar sedimentos marinos para detectar, en su caso, la existencia de microplásticos, es clave el proceso de extracción de los posibles polímeros, sin someterlos a un proceso de degradación que adulteraría el resultado. Muy recientemente (131) se ha propuesto un método en dos etapas para la extracción no destructiva de microplásticos desde sedimentos utilizando un método de flujo inducido de aire basado en fluidificación con disolución de cloruro sódico (método AIO), reduciendo el sedimento hasta un 80 %, utilizando luego un pequeño volumen de yoduro sódico en la etapa de flotación; las recuperaciones para polietileno, polipropileno,

cloruro de polivinilo, terftalato de polietileno, poliestireno y poliuretano con tamaños de 1 mm fue del 91 al 99 %; en las muestras reales se detectaron polipropileno (PP), cloruro de polivinilo (PVC) y terftalato de propileno (PET) por pirolisis/cromatografía de gases/espectrometría de masas.

Desgraciadamente, no hemos encontrado propuesta alguna de tratamiento de biota que no sea la digestión mediante ataque ácido agresivo, lo cual elimina cualquier intento de caracterización real de los microplásticos, y solamente se puede obtener información del tipo de polímero inicial y su cuantificación. El tratamiento de muestras de agua solo incluye, generalmente, una etapa de filtración con tamaños adecuados de poro.

El análisis de microplásticos en océanos comprende dos campos de actuación. Por una parte, su caracterización física y morfológica; por otra, la caracterización química y su cuantificación.

La caracterización de la distribución de tamaños depende de los métodos de muestreo y separación utilizados. El tamaño puede obtenerse usando juegos de tamices con ayuda de microscopía óptica; la precisión se ve muy mejorada utilizando técnicas de difracción con láser.

Igualmente, se han aplicado con éxito Microscopía Electrónica de barrido con dispersión de energía SEM-EDS y la técnica combinada Microscopía de barrido y Espectroscopía de Rayos X de dispersión de energía ESEM-EDS.

En cuanto a la caracterización química y su cuantificación, la técnica de Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier aporta una información valiosísima con el tradicional método de comparación con los datos de librerías de espectro IR disponibles actualmente, añadiéndose con frecuencia el uso de Espectroscopía micro FT-IR con sistemas ATR, que permite obtener datos de *mapping*

e identificación de irregularidades en la superficie, además de la información estructural habitual (132). La utilización de Espectroscopia Raman (133) presenta la ventaja de no necesitarse un tratamiento de muestra previa (excepto lavado): la medida es de carácter no destructivo, pero tiene el inconveniente de que la presencia de pigmentos coloreados puede interferir seriamente.

Queda todavía un largo camino de investigación para desarrollar técnicas de análisis de microplásticos que permitan obtener información de calidad sobre aspectos morfológicos, estructurales, composición química, capacidad de asociarse a otros contaminantes (sirviendo de transporte), etc.

CIENCIA ANALÍTICA Y CONTAMINANTES EMERGENTES EN EL SIGLO XXI: NUESTRAS APORTACIONES A DOS CASOS DESTACADOS

Micotoxinas

Las micotoxinas son un numeroso grupo de metabolitos químicos secundarios producidos por diferentes hongos filamentosos y que tienen efectos tóxicos en los seres vivos (134, 135, 136). Como contaminantes, son un paradigma del desarrollo del concepto de emergentes, dadas todas las vicisitudes de su historial como contaminantes durante los últimos veinte años.

Las más importantes micotoxinas proceden de las especies de hongos *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (136). Generalmente, el crecimiento de las diferentes especies de hongos se asocia a una gran variedad de condiciones climatológicas (137).

El género *Aspergillus* prefiere condiciones de alta temperatura y humedad, es predominante en climas tropicales (138) y la especie *Penicillium verrucosum* crece solo a temperaturas próximas a los 30 °C. Se han descrito más de 300 micotoxinas diferentes. Son moléculas heterocíclicas muy diversas que afectan a una amplia gama de alimentos como cereales, derivados de cereales, frutos secos, vino, leche, café, cacao, pan o productos cárnicos, vino, bebidas alcohólicas (139). Aproximadamente, el 25 % de los cultivos del mundo se ven afectados por los hongos

productores de micotoxinas, por lo que se han convertido en parte de la cadena alimentaria.

La primera micotoxina descrita como tal fue la aflatoxina B1 (AFB1) en la década de 1960 (procedente de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*). Se trata de un potente carcinógeno humano y el principal responsable de cáncer de hígado en animales (140, 141).

La AFB1 cuando es ingerida por el ganado vacuno se transforma rápidamente en su metabolito hidroxilado, la aflatoxina M1 (AFM1), que se excreta entonces en la leche. Desgraciadamente, la AFM1 es estable y persiste durante la pasteurización y el almacenamiento de la leche.

La toxicidad de una micotoxina, tras su ingesta, inhalación o contacto con la piel, está determinada por distintos procesos, no muy bien definidos hasta la fecha: absorción, transformación, farmacocinética, interacciones moleculares, distribución y excreción de la toxina y sus metabolitos.

Su elevada toxicidad presenta un abanico muy amplio de problemas que incluye genotoxicidad, efectos cancerígenos, inmunodepresión, inhibiendo la síntesis de proteínas, lo que puede ocurrir de varios modos:

- a) Inhibición de la transcripción (aflatoxinas).
- b) Inhibición de la fenilalanina tRNA sintetasa (ocratoxina).
- c) Inhibición de la translación a través de la unión con el ribosoma eucariote (micotox T-2).

Conocida desde 1960, no es hasta la década de los noventa cuando se produce una explosión de estudios toxicológicos sobre sus efectos, existiendo una amplísima documentación que por falta de espacio no puede reflejarse aquí.

Las micotoxinas se empezaron a regular en la Unión Europea a partir de 2006, y *se conocían sus efectos desde los noventa*. Actualmente, alrededor de 100 países de todo el mundo (aproximadamente, el 85 % de los habitantes

del mundo) tienen regulaciones específicas o directrices detalladas para la presencia de algunas micotoxinas en alimentos; por lo general, estas regulaciones se han aprobado después de dictámenes científico-técnicos de agencias internacionales tales como la EFSA (European Food Safety Authority), la OAV (Food and Veterinary Office) y la CPVO (Community Bureau of Plant), proponiendo los requisitos y recomendaciones para la adecuada toma de muestras, las alertas y los métodos analíticos (141, 142, 143).

La directiva UE más importante en este aspecto es la Comisión Reguladora 1881/2006, de 19 de diciembre de 2006 (144), que establece los niveles máximos de ciertos contaminantes en productos alimenticios, entre los que se encuentran las micotoxinas, fijando el contenido máximo de aflatoxinas, OTA, patulina, DON, ZEA, fumonisinas, T-2 y HT-2. La normativa tiene algunas lagunas ya, que, por ejemplo, admitiendo la alta toxicidad de HT-2 y T-2, la falta de métodos analíticos suficientemente sensibles hace que sus niveles de concentración máxima todavía no estén definidos.

Además, el Reglamento de la UE 401/2006, de 23 de septiembre de 2006, establece los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de algunas micotoxinas en productos alimentarios.

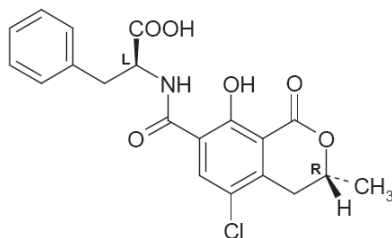
Una preocupante área de aplicación de algunas micotoxinas es su utilización como armas químico-biológicas. En efecto, algunos tricotecenos tipo B como el T-2 y HT-2 se han usado como armas biológicas en guerras: son baratos, de fácil acceso y se pueden aplicar a un pequeño grupo de enemigos.

De las aproximadamente trescientas micotoxinas que existen, nosotros hemos trabajado durante los últimos casi 15 años en cuatro de ellas: Zearalenona (ZEN), Ocratoxina A (OTA), Patulina (PAT) y Fumonisin B₁ (FB₁).

toxina A (OTA), Deoxinivalenol (DON) y Fumonisina B1 (FB1), citadas en el orden cronológico en el que se ha abordado el trabajo experimental en nuestro grupo. Los cuatro casos nos van a servir de ejemplos significativos del problema como contaminantes emergentes que después de un largo recorrido ya han sido convertidos en contaminantes regulados.

La Ocratoxina A (OTA, producida por los hongos *Aspergillus* y *Penicillium*) se aisló por primera vez en 1965 y presenta un fuerte potencial contaminante en muchos tipos de alimentos (145). La OTA es un cancerígeno clase 2 de la IRC, además de ser mutagénico, teratogénico e inmunosupresor.

Figura 6
OCRATOXINA A



La OTA es un metabolito tóxico que aparece en una gran variedad de alimentos, siendo los cereales, las bebidas alcohólicas, los frutos secos, el cacao, el café, etc., los más afectados (146). Se ha demostrado que la OTA constituye un considerable riesgo para la salud humana, dado su carácter nefrotóxico, hepatóxico, carcinogénico y teratogénico (147). El comité de expertos de la FAO/WHO sobre aditivos de alimentos (JEFCA) ya estableció en 2001 una ingesta tolerable de 100 ng/kg peso del cuerpo por semana (148). Desde entonces se encuentra en permanente revisión.

La legislación para OTA en los países desarrollados y emergentes es extremadamente restrictiva desde hace aproximadamente solo 15 años, cuando en realidad se conocían sus posibles efectos tóxicos desde hace más de 25. La FAO/WHO sugirió instaurar en los países una serie de normas recopiladas en los llamados APPCC (Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control), que básicamente consisten en la evaluación de la naturaleza del proceso de contaminación y en una selección de medidas preventivas y correctivas para el control de micotoxinas en los diferentes tipos de alimentos (<FAO. www.fao.org>). Por ejemplo, la UE ha establecido límites máximos aceptables para la OTA en vino de 2 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Regulación de la Comisión EC No 123/2005). También se ha descrito en los últimos años que el consumo de vino puede contribuir en un total de 10-15 % en la ingestión de OTA en humanos, aunque la mayor ingesta de OTA se debe a los cereales, que contribuyen en un 40-50 % (149).

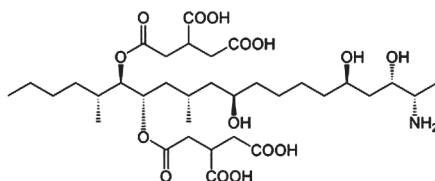
Durante algunos años, los niveles de contaminación de OTA en muestras de alimentos en Europa han oscilado en el rango 0.01-7.0 $\mu\text{g l}^{-1}$ para el vino y para los cereales entre 0.05-12.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$. En el año 2006, la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimenticia) y la JECFA (Junta de Expertos en Aditivos Alimenticios) recomendaron una ingesta diaria tolerable de 17 ng kg^{-1} de OTA. Y en los años posteriores, los límites legales permitidos han ido disminuyendo, sobre todo en muestras de vino, frutas y cereales, de acuerdo con la Comisión de Regulación Europea (EC) No 123/2005, de 26 de enero de 2005 (modificando la Regulación (EC) No 466/2001).

Este proceso es un claro ejemplo de los problemas que plantea el ir traspasando el conocimiento científico de contenidos de un contaminante emergente y sus efectos toxicológicos a la legislación vigente: en el caso de la OTA

se pasa en cinco años de una ingesta máxima recomendada de 100 nanog.kg-1 (2001) a 17 nanog.kg-1 (2006).

Las Fumonisinias se conocen desde la década de los ochenta y son compuestos de cadena larga de polihidro-xialquilaminas que contienen fragmentos tricarbóxicos. Al menos se han descrito 13 fumonisinias estructuralmente diferentes.

Figura 7
FUMONISINA B1



Las fumonisinias provienen del hongo *Fusarium*. Las principales especies productoras de fumonisinias son las *F. verticillioides* y las *F. proliferatum*, abundantes en suelos agrícolas. Son muy comunes en cereales y productos derivados (sobre todo maíz) (150) y es frecuente la presencia simultánea de otras micotoxinas provenientes del mismo hongo, como por ejemplo el DON. La principal especie en cuanto a su importancia económica es la *F. verticillioides*, que crece de forma endófitas en el maíz en los tejidos vegetativos y reproductivos.

Las fumonisinias se caracterizaron por primera vez en 1988 (151). Se identificó tanto su estructura como sus propiedades físico-químicas, realizándose además numerosos ensayos toxicológicos relacionados con procesos cancerosos cuando se expusieron mamíferos a concentraciones elevadas de esta micotoxina.

Si bien se han encontrado 16 tipos de fumonisinias distintas (FB1, FB2, FB3, FB4, A1, A2, A3, AK1, C1, C3, C4,

P1, P2, P3, PH1a, PH1b), la FB1 y su metabolito FB2 son las más importantes. En la legislación europea, actualmente, se considera la contaminación conjunta de FB1+FB2. Su proporción natural frecuentemente sigue una relación estequiométrica en masa de 12:4:1 (FB1:FB2:FB3). La molécula de fumonisina contiene 4 grupos carbonilo, un grupo amino y varios hidroxilos, los que le confieren solubilidad en agua y disolventes polares. Precisamente, su insolubilidad en disolventes orgánicos complica su extracción y procedimientos de aislamiento de la matriz del alimento.

La FB1 es muy tóxica por ingestión, por inhalación o adsorción a través de la piel, causando enfermedades micotóxicas graves y pudiendo ser incluso mortal. Los efectos toxicológicos de esta micotoxina están relacionados con enfermedades en los animales tales como la leucoencefalomalacia equina (ELEM, 152), el edema pulmonar porcino y el hidrotórax porcino (153). Otros efectos tóxicos relevantes en mamíferos son su nefrotoxicidad, hepatotoxicidad y hepatocarcinogenicidad (154).

Quizá el estudio más destacado de toxicidad de la fumonisina es el relacionado con el cáncer esofágico en seres humanos en regiones de Sudáfrica, EE. UU. y China (155).

El problema más importante se encuentra en el maíz, en donde puede llegar a concentraciones de varios mg kg⁻¹, la mayoría de las veces asociada a la presencia de otras micotoxinas. También se han encontrado fumonisinas en el mismo rango de concentraciones en alimentos derivados del maíz para consumo humano directo, como sémola, harina, polenta, cereales de desayuno, tortitas de maíz, cerveza y palomitas (156, 157).

En la Unión Europea se han realizado numerosos estudios para recopilar todos los datos de toxinas de *Fusarium* en alimentos (158). En España, según los datos ofrecidos por el estudio multianual de micotoxinas en

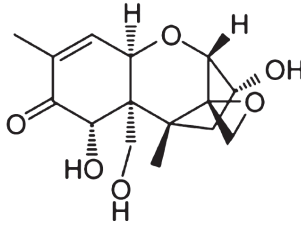
maíz relativos a los años 2003-2006 (159), último conocido, el 22,6% de las muestras de maíz de grano tomadas en el campo superaron los 2 mg kg⁻¹, observándose diferencias interanuales debidas a las condiciones climáticas. En este estudio se señala una importante presencia de fumonisinas en maíz en el valle del Ebro.

El Deoxinivalenol (DON) pertenece al grupo de micotoxinas conocido como tricotecenos, que se generan principalmente por hongos pertenecientes al género *Fusarium* (*Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium crookwellense* y *Fusarium poae*) (160). Los tricotecenos se dividen en cuatro grupos (tipos A-D), de acuerdo con sus grupos funcionales característicos (tipo A: grupo funcional distinto de una cetona en el carbono 8; tipo B: grupo carbonilo en el carbono 8; tipo C: grupo epóxido en carbonos 7, 8 o carbonos 9, 10; tipo D: sistema de anillos macrocíclicos entre carbonos 4 y 15 con dos enlaces éster). Corresponden al tipo A las toxinas T-2 y HT-2, y al tipo B, que es el más frecuente, el deoxinivalenol (DON), 3-acetil-DON, 15-acetil DON, nivalenol y fusarenon (160, 161).

El DON se produce a través del metabolismo secundario del hongo *Fusarium graminearum*, que suele desarrollarse en los suelos, preferentemente en temperaturas templadas, de entre 24 y 26 °C y contamina, especialmente, cereales como el trigo y el maíz, y otros como la cebada, la avena, y el centeno. Además, puede aparecer en sus granos procesados como la malta, la cerveza o el pan.

El DON es altamente estable a 120 °C, moderadamente estable a 180 °C y parcialmente estable a 210 °C. Posee gran estabilidad bajo condiciones débilmente ácidas, pero presenta inestabilidad en medios altamente alcalinos. El DON aparece especialmente en cereales cultivados en regiones templadas de Europa, América y Asia.

Figura 8
DEOXINIVALENOL



Un amplio estudio realizado sobre 35 000 muestras (162) para evaluar la presencia de tricotecenos en alimentos de todo el mundo puso de manifiesto la presencia de DON en el 57 % de las muestras analizadas y principalmente en el trigo; en el 6 % de las muestras el contenido de DON era superior a 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y en el 7 % a 750 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

En lo que se refiere a las toxinas de *Fusarium*, la Comisión Reguladora 1881/2006, de 19 de diciembre de 2006, que fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, establece una ingesta diaria tolerable (TDI) de 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal. Además, el Reglamento 1126/2007, de 28 de septiembre de 2007, fija el contenido máximo de contaminantes en los alimentos para las toxinas *Fusarium* en maíz y en productos de maíz entre 50 y 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Las concentraciones máximas permitidas de deoxinivalenol en el Reglamento de la UE 1126/2007, de 28 de septiembre de 2007, para diferentes alimentos oscilan entre 200 y 1750 $\mu\text{g kg}^{-1}$, dependiendo del tipo de producto (cereal o alimento procesado).

La normativa aplicable a DON incluye también el Reglamento 401/2006, de 23 febrero de 2006, que establece los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del

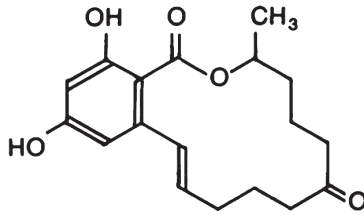
contenido de micotoxinas en productos alimentarios, y que sustituye a la Directiva 2005/38/CE, de 6 junio de 2005, «Métodos de muestreo y métodos de análisis para el control oficial de los niveles de toxinas *Fusarium* en productos alimentarios por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimentarios», incluyendo el DON en los productos cereales y sus derivados. Además de las normativas mencionadas, el deoxinivalenol y el resto de tricotecenos se regulan para los alimentos destinados a animales con la Comisión Reguladora Recomendación 2006/576/CE, de 17 de agosto de 2006, «Presencia de deoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina, T-2 y HT-2 y fumonisinas en productos destinados a la alimentación animal».

La Zearalenona es la (3S,11E)-14,16-dihidroxi-3-metil-3,4,5,6,9,10-hexahidro-1H-2-benzoxacicotetradecien-1,7(8H)-diona, también conocida como lamicotoxina F2, y es producida en regiones templadas y húmedas por varias especies de hongos pertenecientes al género *Fusarium*, entre las que se encuentran *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. equiseti* y *F. Verticillioides*.

Puede contaminar el maíz, principalmente, pero también otros cereales como la cebada, trigo, sorgo, mijo y arroz. La zearalenona se absorbe de forma rápida y se metaboliza en el cuerpo humano dando lugar al α -zearalenol (más estrogénico) y al β -zearalenol (menos estrogénico que la zearalenona parental) (16, 163).

La ZEN, por lo tanto, es una sustancia que muestra actividad endocrina, y es capaz de contaminar todos los niveles tróficos de la cadena alimentaria a partir de cereales, maíz y otras plantas de cultivo. La zearalenona tiene una estructura similar a la del estrógeno (anillo de lactona macrocíclico), que tiene una afinidad por los receptores de estrógeno y compite con el 17β -estradiol por la unión al receptor de

Figura 9
ZEARALENONA



estrógeno en las vías naturales. Como disruptores endocrinos, la zearalenona y sus metabolitos pueden contribuir a mutaciones cancerígenas asociadas a las características sexuales secundarias femeninas.

También el metabolito zearalenol tiene estructura de lactonas y presenta actividad estrogénica, compitiendo con los propios estrógenos, activando y desactivando sus rutas metabólicas, a pesar de su escasa semejanza estructural aparente con los estrógenos fisiológicos. Sin embargo, la estructura tridimensional del anillo de lactona sitúa un grupo OH en una posición tal que puede interactuar con los receptores de estrógenos.

Puesto que la zearalenona se metaboliza y se elimina de forma rápida en los animales, los residuos de zearalenona en alimentos de origen animal (carne, leche, huevos, etc.) son muy bajos y no contribuyen significativamente a la exposición humana a dicha micotoxina: el riesgo proviene casi en exclusiva de su presencia en los vegetales y plantas citados (164).

La primera regulación europea se produjo en el 2001 (Reglamento (CE) 466/2001), modificado por el Reglamento CE 856/2005. La recomendación de la Comisión de la UE de 17 de agosto de 2006 (2006/583/CE) recoge las advertencias sobre prevención y reducción de micotoxinas de *Fusarium* y los límites de contenidos fueron

fijados por el Reglamento (CE) 1881/2006 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2006.

Su no excesiva toxicidad y el hecho de que no se acumula en los organismos animales le hace presentar una menor toxicidad crónica a largo plazo, comparada con otras micotoxinas (165).

La ingesta de niveles altos vía consumo de alimentos puede producir trastornos en el sistema reproductor en desarrollo (pubertad precoz en niñas y aumento del tamaño de los órganos reproductores en niños), así como alteraciones en la fertilidad y reproducción en las mujeres.

Como el resto de micotoxinas, también puede afectar al sistema inmunológico de los seres vivos disminuyendo las defensas del organismo.

Las características más importantes de las principales micotoxinas y sus efectos tóxicos como contaminantes emergentes fundamentalmente en alimentos, tal y como se han expuesto hasta aquí de forma resumida, se han podido conocer por el formidable trabajo realizado en el desarrollo de métodos de separación/extracción y en métodos y técnicas analíticas para su detección, caracterización y cuantificación.

Las concentraciones de micotoxinas involucradas en los procesos analíticos generalmente son muy bajas, por lo que ha sido necesario poner a punto métodos extraordinariamente sensibles (166). Tradicionalmente, han sido los métodos de Cromatografía Líquida de Alta Resolución con columnas de fase reversa acoplados a detectores de fluorescencia molecular (167), detectores de absorción UV o Espectrometría de Masas (168) los que han facilitado métodos robustos con límites de detección de 0,01 a 5 ng.ml⁻¹. Estas metodologías son la base de los métodos oficiales de contraste hoy existentes. Dichos métodos

implican procedimientos de preconcentración y limpieza para la eliminación de la matriz y los interferentes utilizando columnas de inmunoafinidad a base de anticuerpos o columnas de extracción en fase sólida con disolventes orgánicos. Algunas veces es necesaria la derivatización del analito, sobre todo para la detección espectroscópica.

Hay que romper una lanza a favor de otras técnicas que con resultados de una calidad similar a los cromatográficos y espectrometría de masas resultan mucho más baratos de inversión en grandes instrumentos de laboratorio y en su mantenimiento.

Ya en 1980 (169) se propuso la detección amperométrica de ZEN con buenos resultados y recientemente (170) se ha actualizado el método con procesos de adsorción-redisolución voltamétrica de DON, AFB1 y AFB2 a nivel de trazas. Por voltametría de onda cuadrada es posible la determinación de OTA en vinos (171) y algunas técnicas amperométricas pueden aplicarse para la detección de ZEA y sus metabolitos α , β -zearalenol (172); asimismo, después de un proceso hidrolítico asistido por microondas, puede hacerse detección electroquímica directa de DON y nivalenol en varias decenas de muestras a la vez en pocillos ELIME (173).

Sin embargo, las técnicas de «laboratorio» en *batch* que siguen siendo imprescindibles en los métodos oficiales de contraste se han visto claramente superadas en los últimos 20 años por la técnicas de biorreconocimiento acopladas a detección espectrofotométrica (ELISA) o electroquímica. Las ventajas sustanciales son dos. Por una parte, el costo de análisis es infinitamente más barato y, por otra, la rapidez y flexibilidad del desarrollo del método con dispositivos portables los ha hecho imprescindibles para un rápido y seguro control de las materias primas y de los productos elaborados en la industria alimentaria.

Por falta de espacio para entrar a fondo en todo lo que la Ciencia Analítica ha hecho en el mundo del reconocimiento de las micotoxinas como contaminantes y en el control de su impacto en alimentos, permítanme remitirles a las referencias (174, 175), ambas son las dos mejores y más modernas revisiones, con excelente y completa información sobre la situación actual de las metodologías analíticas de todo tipo y en cualquier clase de muestra aplicables hoy a la determinación de micotoxinas.

En el desarrollo de biosensores se han utilizado como receptores de biorreconocimiento: antígenos, anticuerpos, aptámeros, DNA y receptores artificiales, enzimas y péptidos, con transductores electroquímicos y espectrofotométricos. La entrada de los nanomateriales así como de partículas magnéticas en la estructura de las fases de biorreconocimiento asociadas al uso de Screen Printed Carbon Electrodes en transducción electroquímica ha supuesto incrementos de sensibilidad importantes.

En este ámbito de investigación de sensores para micotoxinas, en algunos casos portables, el Grupo de Espectroscopia Analítica y Sensores del Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales de la Universidad de Zaragoza ha contribuido muy significativamente durante los últimos quince años al desarrollo de dispositivos altamente sensibles, robustos, sencillos y baratos para la detección y cuantificación de zearalenona (ZEN), ocratoxina A (OTA), deoxinivalenol (DON) y fumonisina B1 (FB1).

En 2004 (176) propusimos un nuevo método de determinación de zearalenona basado en la reacción con NADH en presencia del enzima 3-HSD. El proceso de obtención de la señal analítica está basado en el cambio de intensidad de fluorescencia que tiene lugar durante la reacción enzimática, y se definió un modelo matemático para explicar el tipo de señal analítica obtenida.

Algún tiempo más tarde (177) se construyó un inmunosensor piezoeléctrico para la detección y cuantificación de ocratoxina A a través de la inmovilización de OTA-BSA conjugada sobre cristales de cuarzo recubiertos de oro (AT-cut/5 MHz, microbalanza de cuarzo basado en el efecto piezoeléctrico). El inmunoensayo se lleva a cabo en un sistema de inyección en flujo en donde la frecuencia decrece en la microbalanza de cuarzo al crecer la masa durante la inmunorreacción con el anticuerpo anti-OTA. La señal puede ser amplificada utilizando nanopartículas de oro, y el límite de detección es de 8 ng.ml⁻¹.

Sobre la base del conocimiento adquirido en el desarrollo de este sensor piezoeléctrico de microbalanza de cuarzo se construyeron posteriormente (178) inmunosensores indirectos electroquímicos basados en el uso de Screen Printed Carbon Electrodes. En este caso, se usaron anticuerpos policlonales en procesos de adsorción física de conjugados de OTA con OTA-BSA, y en otro caso con OTA.BSA-AuNPs sobre la superficie del electrodo. Después de la etapa de competición, la señal analítica se obtuvo a través de un anticuerpo aIgG etiquetado con fosfatasa alcalina con transducción de voltametría de pulsos diferencial usando fosfato alfanafil como sustrato. Los límites de detección alcanzados fueron de 0,2 ng.ml⁻¹.

Algunos de los problemas que planteaba el empleo de anticuerpos policlonales se obviaron usando anticuerpos monoclonales biotinilados sobre Screen Printed Carbon Electrodes nanoestructurados con nanopartículas de oro (179). En efecto, en 2011 desarrollamos un sensor basado en un anticuerpo monoclonal biotinilado frente a OTA (mAbOTA-bi) y la avidina-biotina acoplada al trazador extravidin-HRP. Este inmunosensor de formato de

ensayo competitivo indirecto se basa en la adsorción física pasiva del antígeno conjugado con albúmina de suero bovino (OTA-BSA) o unido a las nanopartículas de oro (OTA-BSA-AuNPs) y la tecnología de electrodos serigrafados realizando medidas voltamétricas (DPV). El nuevo diseño es más simple, requiere menos tiempo y proporciona una mayor sensibilidad como consecuencia de un aumento de la pendiente en el intervalo lineal de la curva de calibración debido a una mayor afinidad del anticuerpo monoclonal en comparación con el policlonal. Este nuevo diseño tiene un rango dinámico lineal de 0,15 a 9,94 ng/mL de la OTA (límite de detección, 0,10 ng/mL OTA) y una variabilidad entre los ensayos de un 10%, y permite la determinación de OTA en niveles de concentración muy por debajo de los permitidos en los cereales bajo recomendaciones de la Unión Europea.

Simultáneamente, ensayamos otros procesos de bio-reconocimiento, en este caso basados en la utilización de aptámeros de DNA biotinilados para desarrollar nuevos biosensores electroquímicos competitivos para OTA (180). Usamos, además, micropartículas paramagnéticas que fueron funcionalizadas con un aptámero específico para OTA compitiendo con disolución de OTA conjugada OTA-HRP y OTA libre. Después de la separación magnética de las micropartículas, estas se colocan sobre la superficie del electrodo serigrafado, lo que permite seguir la reacción enzimática por voltametría diferencial de pulsos. Es, hasta la fecha, uno de los biosensores más sensibles que existen para OTA, con un límite de detección de 0,01 ng.ml⁻¹, es decir, 10 ppt.

Durante los últimos dos años el esfuerzo del grupo de investigación se ha centrado fundamentalmente en la aplicabilidad sobre muestras reales de los prototipos desarrollados. Poniendo a punto sistemas de Molecularly

Figura 10

INMUNOSENSORES VOLTAMÉTRICOS



- Gran sensibilidad
- Nanoestructuración
- ABI: LOD 0.03 ppb; intervalo 0.1-10 ppb
- Portabilidad / SPCEs.
- Volumen: 10-30 μ L
- Etiquetado enzimático

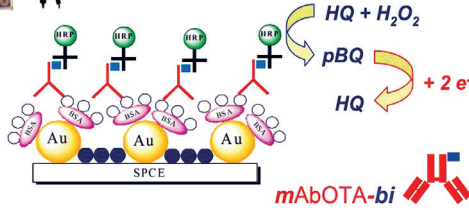
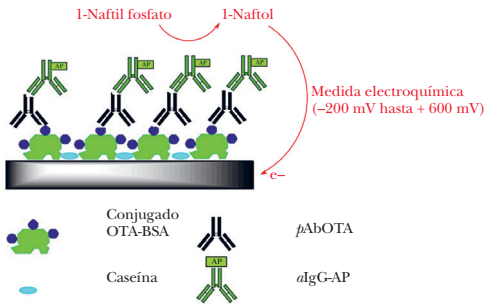


Figura 11

INMUNOSENSORES INDIRECTOS COMPETITIVOS BASADOS EN UN ANTICUERPO POLICLONAL



INMUNOSENSORES INDIRECTOS COMPETITIVOS BASADOS EN UN ANTICUERPO POLICLONAL Y NANOPÁRTICULAS DE ORO

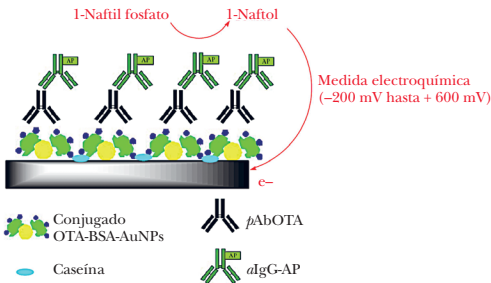


Figura 12
APTÁMEROS

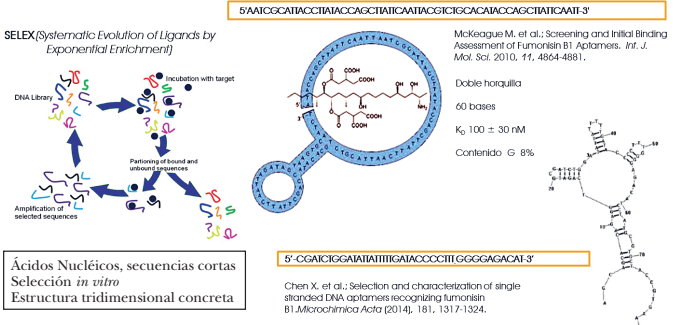


Figura 13
APTASENSOR ELECTROQUÍMICO SOBRE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS

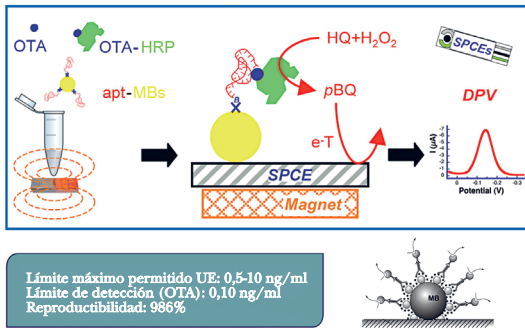
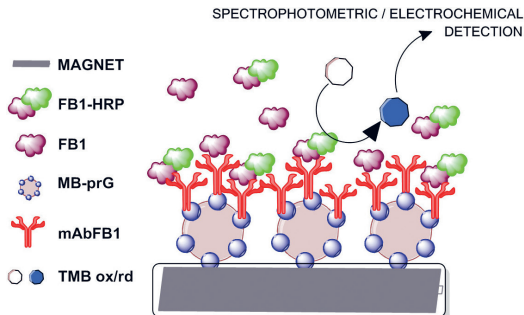


Figura 14
INMUNOSENSOR DIRECTO COMPETITIVO DE FB1



Imprinted On-line Solid Phase Extraction para cereales (181), optimizando el inmunosensor electroquímico basado en anticuerpo monoclonal y micropartículas paramagnéticas para la determinación de OTA en vinos y bebidas alcohólicas (182), y desarrollando un inmunosensor electroquímico multicanal para la determinación rápida de fumonisina B1 en cereales (183).

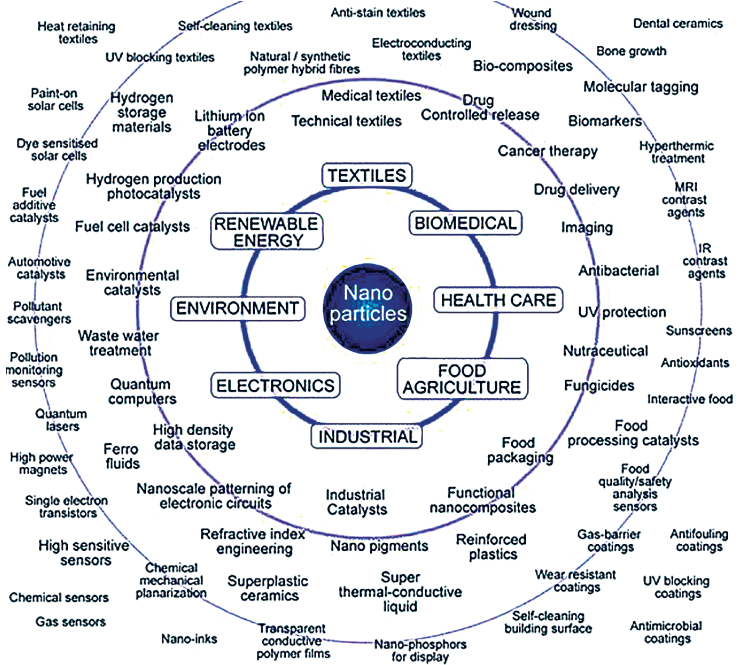
Se han registrado tres patentes en relación con inmunosensores de OTA, DON y FB1, y se dispone de un muy importante *know-how* tanto en procesos de biorreconocimiento de micotoxinas como en la utilización de sistemas de transducción espectrofotométricos y electroquímicos y aplicación en muestras reales de cereales, derivados de los mismos, vino y bebidas alcohólicas.

Nanomateriales

El concepto básico de *nanociencia*, tal como lo conocemos actualmente, fue introducido en 1959 por el premio Nobel Richard Feynman durante la 29 reunión anual de la American Physical Society; sin embargo, no es hasta 1974 cuando empieza a usarse el término *nanotecnología*, que fue propuesto por Norio Taniguchi para describir con precisión la fabricación de materiales a escala nanométrica. Desde un poco antes del 2000 se produce un rapidísimo incremento de aplicaciones en todo tipo de áreas de actividad y productos de consumo, lo que puede verse en la figura 15 es solo una sinopsis muy resumida.

Pero en la práctica es a partir de 2006 (184, 185, 186) cuando comienzan a preocupar los riesgos potenciales de los nanomateriales en relación con la salud humana y el medio ambiente (187, 188). Diez años más tarde no existe, de hecho, regulación oficial sobre contenidos en

Figura 15
 APLICACIONES DE NANOPARTÍCULAS



productos de consumo ni en las áreas de actividad que se pueden observar en la figura 15.

El caso de los nanomateriales como contaminantes emergentes, citados por primera vez como tales en 2006, es otra de las circunstancias que demuestran la crisis de incertidumbre, la lentitud en la toma de decisiones por parte de las Administraciones públicas (más de 14 años desde que se detecta un posible problema hasta que se regula) y los potenciales riesgos que se corren en medio de fuertes tormentas de intereses sociales, económicos, políticos, ¿científicos?, cuando se genera conocimiento

sobre posibles efectos contaminantes de, como en el caso de la nanociencia y nanotecnología, materiales y productos con un importantísimo valor añadido.

Se estima que en el año 2015 el peso económico de la nanotecnología ha supuesto a nivel mundial unos 2,2 billones de euros, y en 2017 el mercado mundial de productos nanotecnológicos alcanzará los 48900 millones de dólares. A grandes rasgos, existen dos vías de acceso de los nanomateriales al medio ambiente. Una de ellas viene dada por su uso industrial y tecnológico, así como en productos de consumo como las medicinas, agentes de diagnóstico médico, cosméticos, aditivos y envases alimentarios. La otra vía es accidental: incendios forestales, erupciones volcánicas creadas por organismos, minerales naturales, exposición laboral en puestos de trabajo manipulando nanomateriales, uso erróneo de un producto, remediaciones, aguas residuales, incineraciones o transporte.

Sin embargo, cuando actualmente casi toda la atención desde el punto de vista medioambiental se está centrando en los nanomateriales artificiales, es también necesario considerar los nanomateriales de origen natural: algunos de ellos comienzan a ser identificados como posibles contaminantes emergentes.

Las NP de origen natural son muy abundantes (p. ej., millones de toneladas en polvo atmosférico en un año) y son bastante más heterogéneas en tamaño que las NP artificiales.

Los nanomateriales naturales se encuentran en suelos, aire, aguas (superficiales y subterráneas) y proceden de actividad química natural o biológica. Ejemplos de nanomateriales naturales son los filosilicatos, óxidos de metales, sustancias húmicas, alófanos e imogolita en suelos volcánicos, emisiones volcánicas derivadas de incendios forestales o aerosoles marinos. La posible toxicidad de estos nanoma-

teriales viene dada tanto por los efectos que ellas mismas puedan ejercer sobre los organismos (problemas respiratorios, oculares, etc.) como al ejercer de vehículos de transporte para bacterias, hongos, virus y contaminantes químicos, es decir, como auténticos «caballos de Troya» para seres vivos y organismos de todo tipo (189).

En los últimos cinco años se están incluyendo dentro del concepto de nanomateriales naturales con posibilidad de ser considerados contaminantes emergentes los nanomateriales biológicos naturales. Un nanomaterial biológico natural consiste en un conjunto de moléculas o átomos en un sistema biológico con al menos una dimensión en el rango 1-100 nm. Estas partículas incluyen estructuras intracelulares como los magnetosomas y ensamblajes extracelulares como lipoproteínas y virus. Sus funciones son diversas, entre otras: el almacenamiento de iones, comunicación intercelular, propagación de material genético, regulación del ciclo biogeoquímico, regulación del ciclo de nutrientes, actuar como agentes de organomineralización, efectos en procesos planctónicos (190, 191, 192, 193, 194).

Pese a la ubicuidad y la importancia que tienen los virus acuáticos y en concreto el virioplancton en los procesos naturales, el conocimiento sobre su papel en ecosistemas acuáticos es limitado y aún más en sistemas de agua dulce (195).

Debido a las particularidades de estas nanopartículas naturales, las técnicas para su caracterización suelen tener fines identificativos como virus o como subpoblaciones de ellos, en donde se emplean técnicas de ensayos en placa, anticuerpos, la técnica de dilución/extinción en presencia del huésped adecuado o marcadores moleculares (196).

Para eludir las dificultades que los métodos de cultivo presentan se emplean técnicas moleculares (p. ej., elec-

troforesis en gel de campo pulsado, electroforesis en gel desnaturalizante en gradiente...), las cuales dieron lugar al nacimiento de la ecología microbiana molecular, proporcionando una huella de la riqueza y la dinámica de las comunidades acuáticas de los virus. En cuanto a su conteo, tres técnicas son las que predominan: Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), Microscopía de Epi-fluorescencia (EFM) y Citometría de Flujo (FCM).

Pese a que los datos obtenidos por estos métodos pueden estar positivamente correlacionados, los resultados no son comparables entre unas técnicas y otras (p. ej., EFM suele dar valores más altos que TEM). Incluso, dentro de la misma técnica, el empleo de diferentes protocolos lleva a discrepancias en la precisión de los resultados (195, 196).

De cualquier forma, el problema fundamental que está surgiendo en los últimos años está más centrado en los nanomateriales artificiales. Desde hace unos diez años los nanomateriales son el centro de una nueva iniciativa de la US EPA en la que se ha definido un nuevo marco prioritario de investigación sobre su destino, transporte y efectos sobre la salud humana. Además, las universidades y centros de investigación, no solo en EE. UU., también en Europa y Japón, han formado nuevos departamentos en torno al estudio de los nanomateriales, y la inversión pública en nanotecnología ha aumentado muy considerablemente en los últimos años; en la mayoría de dichos departamentos hay ya grupos de trabajo en nanotoxicidad. La primera llamada de atención sobre sus posibles efectos ecológicos la dio en 2004 Oberdorster (197), y en 2006 se publicaron las primeras evidencias sobre los efectos de la exposición ambiental a nanomateriales manufacturados (198), lo que ha provocado un nuevo concepto en las ciencias ambientales que es el de *nanorresiduo*.

Parece claro que, para poner en valor su consideración como contaminantes emergentes, habrá que demostrar su potencial toxicidad para el ser humano y ecosistemas ambientales.

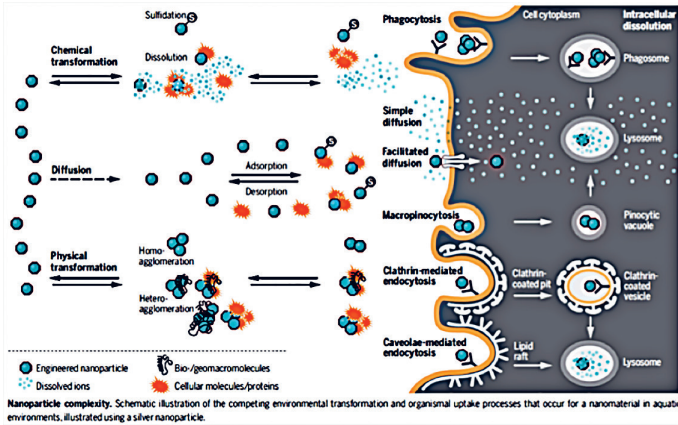
Los efectos adversos de los nanomateriales sobre la salud humana dependen de varios factores individuales: genética, enfermedades ya existentes, exposición, química de los nanomateriales, tamaño, perfil, estado de aglomeración, propiedades electromagnéticas, etc. El problema es extraordinariamente complejo y tal vez habría que empezar por comprender y conocer perfectamente los mecanismos de muerte celular (199). En la mayoría de los casos, la clave hasta la comprensión de la toxicidad de los nanomateriales es que su tamaño más pequeño (más pequeño que las células y orgánulos celulares) les permite penetrar en estas estructuras biológicas básicas e interrumpir su función normal (200).

De forma muy resumida pueden citarse algunos ejemplos de estudios que han descrito como los nanotubos de carbono a dosis de 10 y 50 mg/ml provocan apoptosis, aunque las dosis son excesivamente altas. En este caso también se ha descrito la apoptosis de células de carcinoma de pulmón A549, y que nanomateriales de negro de humo de 13 nm provocan la apoptosis en células epiteliales bronquiales.

Muy recientemente se ha llegado a demostrar que la forma de apoptosis depende de la naturaleza química del nanomaterial, ya que nanopartículas de TiO_2 de 15 nm inducen la apoptosis mediante la desestabilización de la membrana lisosomal y la liberación de la cathepsina B (201, 202).

Otros tipos de nanomateriales, como fullerenos, nanopartículas de oro, nanopartículas de Fe/Au Shell/core, activan la autofagia *in vitro* (203, 204).

Figura 16



E. Valsani-Jones, I. Lynch. Science 350, 6259, 389 (2015)

Y, por otra parte, también se ha descrito que algunos nanomateriales pueden producir especies reactivas de oxígeno (ROS), así como procesos citotóxicos *in vitro* al pasar a través de las membranas celulares y las barreras biológicas tales como la barrera hematoencefálica (205, 206). Además, algunos nanomateriales constituyen potentes inductores de micronúcleos, que dan fe de su genotoxicidad y mutagenicidad (207, 208).

Desde una perspectiva general, a finales de 2015 puede afirmarse que existen suficientes evidencias experimentales para aseverar que la acción de los nanomateriales sobre el ser humano no es inofensiva y que, enunciado con todos los condicionantes (209) a que obliga el estudio de cada caso específico, se pueden producir los siguientes efectos ya contrastados experimentalmente:

- Producción de ROS e interferencias en la producción de energía mitocondrial, así como desregulación de concentraciones de calcio e inducción de producción de citoquina.

- DNA disrupting e interferencias en las funciones de señales.
- Citotoxicidad y genotoxicidad en HELA y HepG2 Células.
- Citotoxicidad y genotoxicidad en fibroblastos humanos.
- Citotoxicidad y genotoxicidad en células colorrectales Caco2.
- Incremento de presión arterial y decrecimiento del ritmo cardiaco sin cambios aparentes en el coeficiente de saturación de oxígeno.
- Asma, enfisema e inflamación pulmonar.
- Toxicidad frente a células epiteliales alveolares humanas.
- Enfermedades cardiovasculares.
- Efectos tóxicos en la reproducción y desarrollo del ser humano e interferencias en la función placentar.

Teniendo en cuenta la lógica limitación de espacio, remitimos al lector al artículo referenciado en la cita (210), en donde puede encontrar una amplia y actual información sobre los posibles efectos de diversos tipos de nanomateriales en la salud humana.

En otros ámbitos no estrictamente relacionados con la salud humana, es decir, desde una perspectiva más fundamental, o bien en biota, vegetales y otros compartimentos medioambientales, a día de hoy tenemos ya docenas de trabajos donde se exponen un gran número de estudios experimentales de econanotoxicidad.

En este contexto son claves:

- El conocimiento de los procesos de liberación de los nanomateriales artificiales.
- Las cantidades que pueden liberarse.
- El destino final de los nanomateriales.
- La movilidad y sistemas de transporte.

- La influencia en el comportamiento nanotoxicológico de
 - la agregación y el comportamiento de la suspensión;
 - la existencia de coloides naturales y materia orgánica natural;
 - la influencia del pH y fuerza iónica.

Posiblemente, es el grupo de Handy el que ya en 2007/2008 marcó las pautas de lo que debía hacerse para conocer los procesos en econanotoxicidad (211, 212, 213).

Desde nuestra experiencia, lo que se echa en falta son dos cuestiones no reguladas hasta ahora para los estudios de nanoecotoxicidad. En primer lugar, no existe una normalización de métodos, técnicas, criterios ni especies testigos para estos estudios experimentales de nanotoxicidad. De ahí la enorme dispersión de resultados y de conclusiones e interpretaciones. Y, por otra parte, hasta la fecha son escasísimos los trabajos en sistemas medioambientales acuosos reales, son muy pocos los estudios de los nanomateriales en el medio acuático natural, en el medio vegetal e incluso los ensayos *in vivo* con animales de experimentación. La mayor parte de los estudios realizados se producen en procesos de simulación en laboratorio con disoluciones acuosas «fáciles», es decir, sencillas, con muy bajo contenido salino, sin materia orgánica, y la mayoría de los ensayos con vegetales no se producen en condiciones reales. En los estudios sobre animales se experimenta generalmente sobre animales «sencillos» y existe una enorme dispersión, sin que se hayan establecido criterios de selección de tipos de seres vivos. Utilizando organismos acuáticos, como peces cebra, *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri* y la trucha arcoíris, un grupo español ha presentado algunos resultados parciales interesantes (214, 215).

El avance y progreso en el conocimiento de las interacciones con tejidos celulares de todo tipo de nanomateriales (metales nobles, quantum dots, nanomateriales base carbono, semiconductores, plata, TiO_2 , CeO_2 , etc.) ha crecido exponencialmente en los últimos cinco años, lo que está permitiendo empezar a conocer las respuestas de captación celular, el «tráfico» de nanomateriales en las estructuras celulares, la potencial toxicidad inducida, los factores que realmente influyen en los efectos biológicos (tamaño, forma, propiedades químicas de la superficie, proteínas corona, etc.) (216).

Todo ello ha de tomarse todavía con muchas reservas, dada la heterogeneidad de las conclusiones que se van obteniendo, incluso considerando otro factor aún no citado: la transformación que puede sufrir un nanomaterial de cualquier tipo en contacto con el medio natural (217, 218).

En realidad, la entrada de un determinado tipo de nanomaterial en un «compartimiento ambiental» no garantiza que sea esa la especie que está produciendo el posible efecto adverso. Pueden presentarse transformaciones químicas alterando de forma importante la reactividad de los nanomateriales, transformaciones físicas que afectan a su tamaño y forma, transformaciones biológicas y bioquímicas asociándose a distintas estructuras «bio» e interacciones con macromoléculas que comparten el mismo espacio. Además, las transformaciones pueden conducir a nanomateriales que pueden ser más heterogéneos que los originales, provocando una mayor dispersión de efectos. Sin embargo, también es posible que las transformaciones puedan disminuir la heterogeneidad, por ejemplo, por recubrimiento con ácidos húmicos, materia orgánica natural, proteínas o procesos de sulfuración, que conducen a comportamientos que están menos influenciados por el

núcleo del nanomaterial que por el recubrimiento. Así que, en ciertos casos, el comportamiento toxicológico de un nanomaterial dependerá en última instancia más del entorno en el que se encuentra y del orden de los entornos a los que ha estado expuesto. Por todo ello, a día de hoy existen todavía muchas incertidumbres en el comportamiento de nanomateriales en medios reales naturales.

Un caso muy especial de nanomaterial con opciones de poder ser considerado contaminante emergente y a la vez beneficioso como bactericida son las nanopartículas de plata, que nos sirve como ejemplo significativo de las consideraciones que pueden hacerse sobre otra situación de posible doble efecto perjudicial/beneficioso de un nanomaterial.

Las nanopartículas de plata, solas o sobre diversos soportes, son posiblemente el nanomaterial más utilizado en contacto con el ser humano junto al SiO_2 y al TiO_2 ; los nanomateriales de plata tienen una amplia actividad antibacteriana. Están siendo utilizadas en productos de cuidado personal, pinturas, contenedores de almacenamiento de alimentos, electrodomésticos, aditivos de lavandería, ropa, procedimientos generales de desinfección, enología, etc. Los estudios *in vitro* han confirmado que las nanopartículas de plata pueden entrar en las células a través de endocitosis, alojándose en vesículas en el citoplasma y en el núcleo (219, 220).

Igualmente, se han descrito (221) mecanismos según los cuales las nanopartículas de plata son fagocitadas y localizadas después en el retículo endoplasmático y mitocondrias. A día de hoy parecen claramente definidos los mecanismos de interacción de nanopartículas de plata con organismos celulares; sin embargo, dado que la nanopartícula de plata puede liberar iones plata (I) que son suficientemente pequeños como para también poder

Figura 17

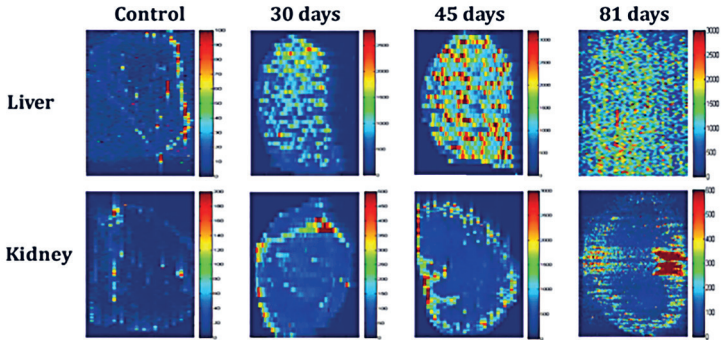


Fig. 3 Images of the rat liver and kidneys from control rats and AgNPs fed rats from 30, 45 and 81 d exposure. Scale bar: ^{107}Ag signal, cps.

penetrar en cualquier órgano celular, pueden provocar toxicidad debida a la interacción del ion plata con los ácidos nucleicos; el proceso sigue rutas diferentes en el caso de nanopartículas de plata con distintos tipos de recubrimiento o soportes físicos (222).

Los estudios de seguimiento de nanopartículas de plata *in vivo* son más bien escasos (223). Nuestro grupo de investigación, en colaboración con colegas del CNRS francés de la Universidad de Pau, de la Universidad de Montpellier, y de la Universitat Rovira i Virgili, ha llevado a cabo un estudio *in vivo* sobre ratas (224), demostrando que después de una etapa de administración oral de nanopartículas de plata a las ratas puede observarse una significativa acumulación de plata en riñón e hígado, siendo este órgano el principal objetivo de las nanopartículas. La plata es relativamente lábil y es eliminada después de 30 días. Además, está distribuida uniformemente en el hígado, mientras que en el riñón está localizada en el córtex.

Existen claras pruebas experimentales de que el tamaño de las nanopartículas juega un papel fundamental en la retención y/o distribución, ya que, mientras tamaños

de 22 a 71 nm se observan en hígado, pulmón, riñón, estómago y cerebro en ratas, después de alimentación oral, tamaños de más de 300 nm no se detectan. Sin embargo, parece existir acuerdo en que las nanopartículas de plata producen efectos degenerativos a concentraciones bastante altas en células de piel (225), hígado (226), pulmón (227), retina (228), sistema nervioso (229) y órganos reproductores (230).

Nos enfrentamos en el caso de los nanomateriales de plata a un formidable reto, que está dando lugar a una enorme profusión de estudios experimentales de nanotoxicidad, debido a su amplia utilización y la dicotomía que se presenta por la acción diferencial de las propias nanopartículas o los iones plata que puede liberar y todas las posibles transformaciones que ambas especies de plata pueden sufrir en contacto con medios biológicos y bioquímicos naturales.

El vertiginoso avance producido en los últimos años en el conocimiento de los efectos de los nanomateriales en el ser humano, en su caracterización, en la definición de sus destinos, movilidad, biodisponibilidad e interacciones con sistemas celulares, etc., ha sido solo posible gracias a la forma impresionantemente rápida en que la Ciencia Analítica ha respondido a las necesidades de nuevas técnicas y métodos analíticos que permiten profundizar en todos los aspectos de las implicaciones de nanomateriales con sistemas medioambientales y seres vivos. El párrafo del profesor Whiteside reproducido en la página 11 estaría plenamente justificado solo desde la consideración de lo que ha aportado la Ciencia Analítica (Química Analítica) a este nueva rama de la ciencia, es decir, la Nanotecnología Medioambiental.

Actualmente, aunque queda un largo camino por recorrer, el desarrollo de la Ciencia Analítica en los últimos

quince años nos permite disponer de metodologías analíticas para la detección, identificación, caracterización y cuantificación de los nanomateriales que están representados en la figura 18 a título de ejemplo (no son todos).

No es objetivo de este trabajo una pormenorizada exposición de dichas metodologías. Sin embargo, merece la pena, para terminar, detenernos en algunas cuestiones de estricto contenido analítico que, con gran éxito de aceptación, han sido acuñados por nuestro grupo de investigación. En primer lugar nos referiremos a la denominada *Plataforma de técnicas analíticas para caracterización de nanomateriales*. Hemos insistido en que la condición toxicológica o no de un nanomaterial no depende solo de un par de factores. En realidad, tal y como vemos en la figura 19, son una docena de parámetros, condicionados a su vez por el medio en el que se encuentren los nanomateriales y las transformaciones que en función

Figura 18

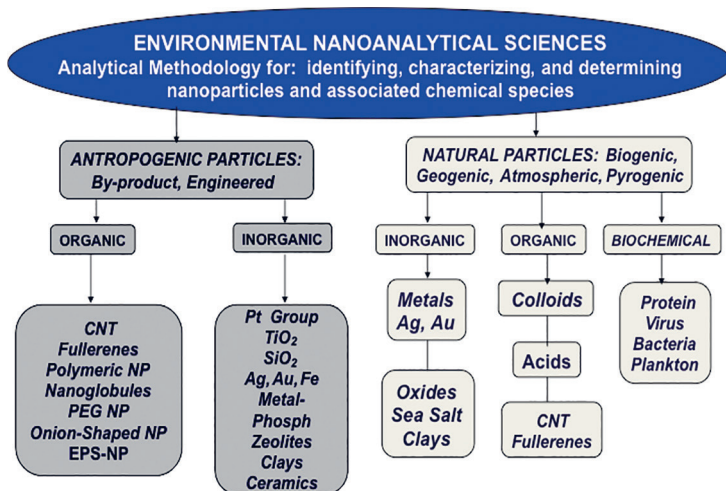
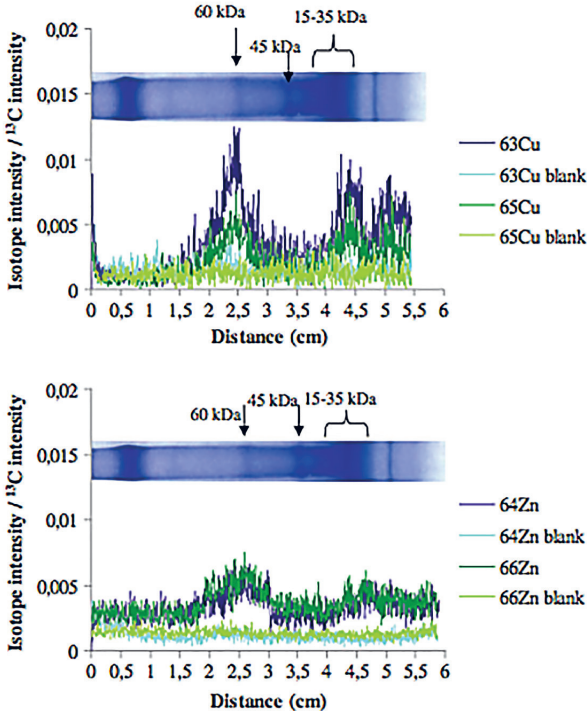


Figura 19



de esos medios pueden sufrir. Estos parámetros y propiedades son: estado de agregación, forma, área superficial, carga superficial, porosidad superficial, composición química superficie, composición química núcleo, estructura, tamaño/distribución de tamaños, concentración. Si consideramos la enorme variedad de nanomateriales (figura 18), con este abanico de parámetros por determinar, *¿cuántas técnicas analíticas necesitamos para una completa caracterización de todos los parámetros y propiedades que influyen en procesos nanotoxicológicos? Hasta donde conocemos, las técnicas más utilizadas son:*

- SEC-HPLC-UV-VIS
- SEC-HPLC-ICP-MS
- PAGE-LA-ICP-MS
- Cromatografía Hidrodinámica
- FIFFF-UV-VIS
- FIFFF-Fluorescence
- FIFFF-Ligth scattering
- FIFFF-ICP.MS
- FIFFF-ICP-AES
- Electroforesis de Movilidad Molecular
- Solid Particle Voltammetry
- Cyclic Voltammetry Stripping
- Voltammetry Anodic Particle
- Coulometry
- Diferencial Pulse Voltammetry
- Particle Impact Voltammetry
- Cronoamperometry
- Tag Redox Coulometry
- Single Nanoparticle Collision Events
- TEM
- SEM
- AFM
- Potential Measurements
- Sensores: fluorescencia, inmunoensayo, magnetoinmunoensayo, Sticky electrodes, Piezoelectric sensors, SPCEs
- ELISA
- Surface Plasmon Resonance
- Raman Spectroscopy
- X-Ray spectroscopy: XAS, XANES, XRD, EDS, ESRE, EXAFS, etc.

No es nuestra intención confundir al lector con esta sopa de letras y términos analíticos, pero es la realidad de un complejísimo marco de trabajo. No existe laboratorio

en el mundo que pueda disponer de todos estos medios instrumentales analíticos ni grupo de trabajo capaz de dominar su utilización. Y todos permiten obtener información valiosísima sobre uno o varios de los parámetros y/o propiedades de nanomateriales citadas anteriormente en relación con las propiedades toxicológicas de los mismos. *¿Qué hacer?* Pues, claramente, profundizar en la colaboración intergrupos de investigación definiendo prioridades de conocimiento e información a obtener y una cuidadosa selección de las técnicas y métodos a utilizar en función de la naturaleza del nanomaterial y del medio en el que se encuentre. De esa forma podremos definir una *plataforma de técnicas analíticas* específica para cada necesidad. En nuestro caso y desde 2001 hemos intentado definir de acuerdo con nuestras necesidades de caracterización un marco bien definido de técnicas y métodos de caracterización de nanomateriales.

Nuestra aproximación al tema se inició en 2001, antes de las primeras noticias sobre posibles efectos nanotoxicológicos, a raíz de una entrañable colaboración de investigación durante una estancia mía de un año en el grupo del profesor Joseph Caruso (recientemente fallecido), del Chemistry Department de la Universidad de Cincinnati (Ohio, EE.UU.), puerta con puerta con la sede central de la Environmental Protection Agency. Aunque la idea de abordar directamente la caracterización en escala nano rondaba en la cabeza de ambos, pareció más prudente iniciar el camino con estructuras algo más grandes que la escala nano. En efecto, a lo largo de aquel año llegamos a obtener los perfiles de distribución de As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, U, Th y Zn asociados a fracciones de estructuras de ácidos húmicos extraídas de compost y diferenciadas en rangos de peso molecular 15 kDa, 1-15 kDa y 1 kDa utilizando cromatografía

de exclusión acoplada al tándem detector de UV-VIS e ICP-MS (231). Igualmente, demostramos utilizando cromatografía de exclusión acoplada al tándem detector de UV-VIS e ICP-MS que en la unión o aglomeración de ácidos húmicos entre pequeñas moléculas y la formación de complejos de moléculas individuales desempeñan un papel fundamental los iones metálicos de Co, Cu, Ni, Pb, Zn unidos a las sustancias húmicas (232).

Sin embargo, la información que puede obtenerse solo con la técnica SEC-HPLC-UV-VIS. ICP-MS, siendo importante, tenía limitaciones. Es a nuestro regreso de EE. UU. cuando desarrollamos, optimizamos y propusimos en colaboración con H. Geckels del Forschungszentrum Karlsruhe, Institut für Nukleare Entsorgung lo que podemos denominar nuestra primera plataforma de técnicas analíticas (233), la utilización combinada de cromatografía de exclusión, fraccionamiento asimétrico de campo de flujo (conocida entonces por AsFIFFF, actualmente 4F) y ultrafiltración, con técnicas de detección y cuantificación de UV-VIS e ICP-MS. De esta forma pudimos identificar tres grupos de elementos con interacciones distintas y efectos diferentes respecto a las fracciones de ácidos húmicos de alrededor de 1 kDa de peso molecular. El primer grupo está constituido iones metálicos alcalinos monovalentes y especies aniónicas de B, W, Mo y As sin una relación directa con los ácidos húmicos. El segundo grupo está constituido por elementos tales como Ni, Cu, Cr y Co parcialmente asociados a la fracción de tamaño más pequeña de los ácidos húmicos. El tercer grupo son iones metálicos tri y tetra-valentes como Al, Fe, lantánidos, Sn y Th asociados a las fracciones más grandes de ácidos húmicos. Es el uso combinado de las técnicas analíticas citadas lo que permite esta diferenciación.

A partir de aquí se fueron desarrollando distintas aplicaciones sobre muestras reales en donde estaba implicada materia orgánica natural junto a iones metálicos (234, 235, 236), lo que nos permitió desarrollar conceptos nuevos relacionados con procesos de especiación química y funcional de los elementos unidos a moléculas orgánicas en muestras reales medioambientales.

Con objeto de facilitar métodos más rápidos de detección aun a costa de perder algo de reproducibilidad y sensibilidad, incorporamos la técnica de ablación láser-ICP-MS, con excelentes resultados, resolviendo además algunos importantes problemas que se plantean con los sistemas de calibración de esta técnica (237). La técnica de detección por ablación láser nos permitió caracterizar algunos complejos metal-ácido húmico separados por electroforesis de gel de poliacrilamida (PAGE, 238) en sus variantes de 1D.PAGE (monodimensional), 2D-PAGE (bidimensional) e IEF (focalización isoeléctrica), lo que constituía una nueva metodología de especiación analítica que confirmaba totalmente los datos obtenidos por cromatografía líquida de alta resolución de exclusión, 4F y ultrafiltración utilizadas en trabajos anteriores.

La experiencia adquirida con la técnica de ablación láser-ICP-MS nos permitió abordar temas relacionados con especiación química y funcional de metales asociados a plancton marino (remito al lector al apartado de nanomateriales naturales, donde ya hemos explicado que el plancton se está empezando a considerar como tal en función de su tamaño) mediante métodos sencillos y de detección rápida y que proporcionan una valiosa información sobre una materia viva de importancia fundamental en el ciclo biogeoquímico de los océanos y otros ecosistemas, siendo el responsable de la eliminación de

aproximadamente el 52 % del CO₂ que se produce en nuestro planeta. Elaboramos una nueva estrategia para caracterizar (239) Cu y Zn contenido en proteínas extraídas de plancton, separando las proteínas mediante Blue-Native PAGE midiendo los metales contenidos en las bandas electroforéticas de las proteínas por ablación láser-ICP-MS. En colaboración con un grupo del Departamento de Química Analítica de Santiago de Compostela (profesora Pilar Bermejo) ampliamos este estudio a fitoplancton marino y proteínas disueltas en agua de mar (240), demostrando por vez primera la presencia de metales Cd, Cr, Cu y Zn en distintas fracciones de proteínas disueltas aisladas de agua de mar con pesos moleculares en el rango de 10 a 14 kDa, asociándose cada metal a proteínas de distinto peso molecular.

En 2013 publicamos el primer trabajo (241) dedicado específicamente a la optimización y desarrollo de una metodología que nos permitiera con medios convencionales obtener la máxima información posible en la detección, caracterización y cuantificación de nanomateriales, después de una etapa anterior de tres años trabajando en ello. Se investigó sobre los criterios metodológicos para la implantación de una metodología basada en ICP-MS que permitiera ser aplicada a la caracterización de tamaños y cuantificación de nanomateriales. No hubiera sido posible sin la experiencia adquirida en la plataforma de técnicas analíticas anteriormente referenciada con una utilización exhaustiva del ICP-MS. La selección de una concentración numérica crítica de nanopartículas, basada en los parámetros de introducción de muestra al plasma y adquisición de medidas, seguida de la minimización de eventos multinanopartícula y del control de precisión asociado con el conteo de eventos mononpartículas, facilitó una metodología en la

que podían medirse nanopartículas de entre 40 y 100 nm, además de cuantificar la concentración del nanomaterial. El método aplicado y contrastado con nanopartículas de plata permitió demostrar la posibilidad de utilizar la técnica de *single particle* ICP-MS para la comprobación de la aplicación de la definición de *nanomaterial* propuesta por la Comisión Europea.

Hasta la fecha, nuestro grupo en estos últimos años ha desarrollado, dentro del concepto de nanometrología y en el marco orientado hacia la Nanotecnología Medioambiental, distintas aplicaciones metodológicas en estudios de nanotoxicidad y caracterización de nanomateriales, siempre combinando varias técnicas analíticas con objeto de obtener la máxima información sobre las características «reales» del nanomaterial estudiado en el seno de un medio no artificial. En (242) y en colaboración con el grupo de nutrigénómica de la Universitat Rovira i Virgili se detectaron y caracterizaron nanopartículas de plata y sus especies disueltas en medios de cultivo y líneas celulares humanas utilizando AsFIFFF acoplado a UV-VIS-ICP-MS y microscopía electrónica de transmisión TEM, lo que permitió conocer mejor los procesos de liberación de ion plata (I) así como la formación de proteínas corona sobre las nanopartículas de plata. Desde el punto de vista nanotoxicológico se pudo confirmar sin dudas que, para alcanzar un grado de nanotoxicidad similar entre nanopartículas de plata y iones plata (I), la relación de concentración debe ser de 16 a 1.

Las últimas dos aportaciones en este ámbito de nanometrología en Nanotecnología Medioambiental basada en plataformas de técnicas analíticas tienen dos orientaciones distintas. En un caso, y en colaboración con el mismo grupo de la Universidad de Santiago citado anteriormente, se evaluaron y compararon métodos de cuantificación de concentración numérica de nanomateriales por *single*

particle ICP-MS (243) en función del *dwell time* (microsegundos *versus* nanosegundos); y en otro (244), se consiguió una interesantísima aportación a un caso real e inexplorado de detección y caracterización de nanopartículas de óxido de cerio (CeO_4) en residuos de combustión de motores diésel. Este nanomaterial se usa actualmente como aditivo o como catalizador en motores diésel para mejorar su rendimiento y disminuir las emisiones de óxidos de carbono, sin que hasta la fecha se haya hecho un estudio de qué es lo que realmente sucede durante el proceso de combustión. Hemos iniciado el trabajo desarrollando una metodología de detección y caracterización de nanopartículas de óxido de cerio basada en una plataforma analítica instrumental utilizando AsFIFFF, Hollow Fiber-FFFF, TEM, EXAFS, Dinamic Light Scattering (DLS) utilizando nanopartículas de SiO_2 con éxito para los procesos de calibración ante la falta de nanomateriales de referencia de cerio (uno de los principales problemas de este campo de trabajo) y alcanzando un límite de detección de 0,9 microg/L.

Terminamos con una idea o prueba de concepto que ya tiene realizaciones prácticas. Hemos explicado que la detección, caracterización y cuantificación de nanomateriales en muestras reales presenta todavía muchas dificultades y que por ello los estudios de nanotoxicidad proporcionan resultados muy dispersos, lo que está provocando un considerable retraso en su consideración como contaminantes y en la implantación de normativa legal que controle su utilización en productos de consumo, industriales, fármacos, etc. Esas dificultades están reflejadas en (245), donde por vez primera hemos recogido todo lo que se conoce sobre el análisis de nanomateriales en muestras reales. En la citada publicación, que ha visto la luz en enero de 2016, decimos textualmente:

Chemical sensors selective to nanoparticles are in their early stages, but they are very promising considering their portability and simplicity. Although the field is in continuous evolution, at this moment it is moving from proofs-of-concept in simple matrices to methods dealing with matrices of higher complexity and relevant analyte concentrations.

Efectivamente, junto con unos pocos grupos a nivel internacional (los de R. G. Compton, L. G. Galperin, Allen J. Bard), estamos trabajando en pruebas de concepto para el desarrollo de sistemas de biorreconocimiento para nanomateriales acoplados a procesos de transducción electroquímicos y/o espectrofotométricos. Es decir, para el desarrollo de sensores o biosensores sencillos, portables, robustos y seguros para la detección, caracterización y cuantificación de nanomateriales. Es sin duda una apasionante línea de investigación y un formidable reto con muchos riesgos, pero que, de dar resultado, supondría disponer de herramientas analíticas sencillas y muy baratas para controlar uno de los tipos de contaminantes emergentes que más amenazan actualmente a nuestra sociedad. Y, para muestra, los dos primeros sensores *reales* para detectar nanomateriales de plata y de cerio que hemos desarrollado y que el amable lector puede consultar en nuestras publicaciones (246, 247).

Solo somos, o tratamos de ser, notarios de una realidad que a veces provoca vértigo y preocupantes alarmas, pero solo desde el conocimiento del problema se le podrá poner solución en beneficio de un desarrollo social y económico respetuoso con nuestro hogar común, único y no reemplazable..., *el planeta Tierra*.

8
CONCLUSIÓN

Vive como si fueras a morir mañana.
Aprende como si fueras a vivir siempre.

M. Gandhi

BIBLIOGRAFÍA

1. R. Naidu, M.H. Wong. *Sci Total Environ.* 2013; 463-464: 1077-1078.
2. D.W. Kolpin et al. *Environ Sci Technol.* 2002; 36:1202-11.
- 2a. P. Verlicchi et al. *Sci Total Environ.* 2012; 429: 123-55.
3. M. Focazio. American Water Works Association Research Symposium: Emerging Organic Contaminants Austin, Texas. February 12, 2009.
4. M.J. Focazio et al. *Sci Total Environ.* 2008; 402: 201-216.
5. Ph. Brown et al. *Health Affairs.* 2011; 30(5): 1-9.
6. B.H. MacGillivray et al. *Analysis.* 2011; 31(2): 266-281.
7. A. Blum et al. *Science.* 2007; 318(5848): 194b-195b.
8. K. Hooper et al. *Environmental Health Perspectives.* 2000; 108(5): 387-392.
9. K. Betts et al. *Environmental Science & Technology.* 2004; 38(20): 386A-387A.
10. R. A. Hites. *Environmental Science & Technology.* 2004; 38(4): 945-956.
11. R.A. Rudel et al. *Atmospheric Environment.* 2009; 43(1): 170-181.
12. D.K. Meironyte et al. *J. of Toxicology and Environmental Health.* 1999; 58(6): 329-341.
13. N. Eckley et al. *J. of European Public Policy.* 2004; 11(1): 78-105.
14. R.E. Dodson et al. *Environ. Sci. & Technology.* 2012; 46(24): 13056-13066.

15. R.A. Rudel et al. *Atmospheric Environment*. 2009; 43(1): 170-181.
16. A. Zota et al. *Environ Sci & Technology*. 2008; 42(21): 8158-8164.
17. A. Messer. *Physiology & Behavior*. 2010; 100(3): 245-249.
18. J. Herbstman et al. *Environmental Health Perspectives*. 2010; 118(5): 712-719.
19. E. Roze et al. *Environmental Health Perspectives*. 2009; 117(12): 1953-1958.
20. J. Meeker et al. *Health Perspectives*. 2010; 118(3): 318-323.
21. K. Harley et al. *Environmental Health Perspectives*. 2010; 118(5): 669-704.
22. J. Chevrier et al. *Environmental Health Perspectives*. 2010; 118(10): 1444-1449.
23. Ph. H. Abelson. *Science*. 1977; 197(4299): 113.
24. A. Blum et al. *Science*. 1977; 195(4273): 17-23.
25. J. Egginton. *American Journal of Public Health*. 2009 [1980] 73(3): 302-313.
26. O.A. Jones et al. *Environ. Toxicol*. 2001; 22: 1383.
27. N. Litz et al. *Sediments*. 2007; 7: 36-44.
28. C. Kinney et al. *Environ Sci Technol*. 2008; 42: 1863-1870.
29. J. Reiner et al. *Water Air Soil Pollut*. 2011; 214: 335-342.
30. R. Gatermann et al. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2002; 42: 437-446.
31. H. Nakata et al. 2007; 41: 2216-2222.
32. K. Kannan et al. *Chemosphere*. 2005; 61: 693-700.
33. H. Hutter et al. *Chemosphere*. 2005; 59: 487-492.
34. H. Hutter et al. *Sci Total Environ*. 2009; 407: 4821-4825.
35. H. Hutter et al. *Int J Hyg Environ Health*. 2010; 213: 124-130.
36. S. Kang et al. *Chemosphere*. 2010; 80: 116-122.
37. S. Lignell et al. *Environ Sci Technol*. 2008; 42: 6743-6748.
38. J. Reiner et al. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2007a; 52: 451-457.
39. J. Reiner et al. *Environ Sci Technol*. 2007b; 41: 3815-3820.
40. S.D. Richardson et al. *Anal. Chem*. 2005; 77(12): 3807-3838.

41. M. Schlumpf et al. *Chemosphere*. 2010; 81: 1171-1183.
42. L.H. Leal et al. *Sci. Technol.* 2010; 44: 6835-6842.
43. Z.F. Zhang et al. *Environ. Sci. Technol.* 2011; 45: 3909-3916.
44. P. Gago-Ferrero et al. *Chemosphere*. 2011; 84: 1158-1165.
45. K.E. Wommack et al. *Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems. Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 69-114.
46. M. Muniesa et al. *A. R. Environ.* 163: 191-197.
47. S.C. Jiang. *Environ. Sci. Technol.* 2006; 40(23): 7132-7140.
48. N. Albiñana-Giménez. *Environ. Sci. Technol.* 2006; 40(23): 7416-7422.
49. Y. Masago et al. *Environ. Sci. Technol.* 2006; 40(23): 7428-7433.
50. J.A. Heinemann et al. *Environ. Sci. Technol.* 2006; 40(23): 7150-7156.
51. C. Medana et al. *Curr. Org. Chem.* 48(3): 239-245 (195).
52. D.W. Kolpin et al. *S. T. Sci. Total Environ.* 2006; 354, 114(2): 220-227.
53. J. Kjaer et al. *Qual.* 2005; 34(2): 608-620.
54. J.T. Watson, O.D. Sparkman. *Introduction to Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, West Sussex, England, 2008.
55. S.D. Richardson. *Anal. Chem.* 2012; 84: 747.
56. L.N. Williamson, M.G. Bartlett. *Biomed. Chromatogr.* 2007; 21: 567.
57. A.C. Hogenboom et al. *J. Chromatogr. A.* 2009; 1216: 510.
58. D. Barceló, M. Petrovic. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2007; 26: 2.
59. P. Schmitt-Kopplin, M. Englmann. *Electrophoresis.* 2005; 26: 1209.
60. K.T.N. Nguyen et al. *Talanta.* 2011; 85: 2375.
61. A.F. Lagalante, T.D. Oswald. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008; 391: 2249.
62. L. Alder et al. *Mass Spectrom. Rev.* 2006; 25(6): 838-865.
63. M. Ibanez et al. *Anal. Bioanal. Chem.* 2006; 384(2): 448-457.

64. H.V. Botitsi et al. *Mass Spectrom. Rev.* 2011; 30: 907-939.
65. V.S. Morozova et al. *J. Anal. Chem.* 2005; 60(3): 202-217.
66. S. Durand et al. *Chemosphere.* 2010; 81: 372-380.
67. Y. Zhao et al. *Anal. Chem.* 2010; 82: 4599-4605.
68. J. Anichina et al. *Environ. Sci. Technol.* 2010; 44: 9557-9563.
69. S.D. Richardson. *Disinfection By-Products: Formation and Occurrence in Drinking Water.* In *The Encyclopedia of Environmental Health*; Nriagu, J.O., Ed.; Elsevier: Burlington, MA. 2011; Vol. 2, 110-136.
70. W.H. Krkosek et al. *Water Res.* 2011; 454: 1414-1422.
71. C. Schmalz et al. *Water Health.* 2011; 9: 586-596.
72. M.J. Cardador, M.J. Gallego, M.J. *Chromatogr. B.* 2010; 878: 1824-1830.
73. M.J. Cardador, M. Gallego. *Environ. Sci. Technol.* 2011; 45: 5783-5790.
74. S.D. Richardson et al. *Environ. Health Perspect.* 2010; 118: 1523-1530.
75. M.D. Hernando et al. *Talanta.* 2006; 69: 334.
76. M. Bedner, W.A. Maccrehan. *Environ. Sci. Technol.* 2006; 40: 516.
77. K. Fent et al. *Aquatic Toxicol.* 2006; 76: 122.
78. M.D. Hernando et al. *Anal. Bioanal. Chem.* 2006; 385: 985.
79. S.A. Morais et al. *Chemosphere.* 2013; 04074.
80. J. Tolls. *Environ. Sci. Technol.* 2001; 35: 3397-3406.
81. K.C. Hyland et al. *Water Res.* 2012; 46: 1958-1968.
82. J. Corcoran, M.J. Winter, C.R. Tyler. *Crit. Rev. Toxicol.* 2010; 40: 287-304.
83. L.H. Santos et al. *J. Hazard. Mater.* 2010; 175: 45-95.
84. T. Kosjek, E. Heath. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2011; 30: 1065-1087.
85. S.D. Richardson. *Ternes, Anal. Chem.* 2005; 77(12): 3807-3838.
86. C.W. Cui, S.L. Ji., H.Y. Ren. *Environ. Monit. Assess.* 2006; 121(1-3): 409-419.
87. C. Basheer et al. *J. Chromatogr. A.* 2005; 1100(2): 137-143.
88. T. Hintemann et al. *J. Water Res.* 2006; 40(12): 2287-2294.

89. C. Almeida, J.M. Nogueira, J. Pharm. Biomed. Anal. 2006; 41(4): 1303-1311.
90. M. Petrovic et al. Occurrence and sources of emerging contaminants in wastewaters. Handbook of Environmental Chemistry. Springer, 2008.
91. S. Castiglioni et al. Eds. Illicit Drugs in the Environment: Occurrence, Analysis, and Fate Using Mass Spectrometry; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, 2011.
92. A.L.N. van Nuijs et al. Water Res. 2009; 43: 1341-1349.
93. D.R. Baker et al. 2014; Sci. Total Environ. 487: 629-641.
94. D.R. Baker, B. Kasprzyk-Hordern. J. Chromatogr. A. 2011; 1218: 1620-1631.
95. D.R. Baker, B. Kasprzyk-Hordern. J. Chromatogr. A. 2011; 1218: 7901-7913.
96. D.R. Baker et al. J. Environ. Int. 2012; 48: 28-38.
97. D.R. Baker, B. Kasprzyk-Hordern. Sci. Total Environ. 2013; 454-455: 442-456.
98. E.J. Carpenter, K.L. Smith. Science. 1972; 175(4027): 1240-1241.
99. C. Arthur, C.J. Baker, J.H. Bamford (Eds.). Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects and Fate of Microplastic Marine Debris, Sept. 9-11, 2008, NOAA Technical Memorandum NOS-OR&R-30, 2009.
100. A.L. Andrady. Mar. Pollut. Bull. 2011; 62(8): 1596-1605.
101. M. Cole et al. Mar. Pollut. Bull. 2011; 62(12): 2588-2597.
102. Plastic Europe. Plastics-the Facts 2014/2015 An analysis of European plastics production, demand and waste data. Plastic Europe, Brussels, 2015.
103. J.R. Jambeck et al. Science. 2015; 347: 768-771.
104. Eriksen et al. PLoS One. 2014; 9-111913.
105. N. Seltnerich. Environ. Health Perspect. 2015; 123(2): 35-41.
106. L.C. Thompson et al. RC Royal Soc Open Sci. 2014; 1: 140317.
107. M.A. Browne et al. Environ Sci Technol. 2010; 44: 3404-3409.

108. Y.K. Song et al. *Environ Sci Technol.* 2014, Aug 19; 48(16): 9014-21.
109. K.L. Law, R.C. Thompson. *Science.* 2014; 345: 144-145.
110. Y. Ogata et al. *Mar. Pollut. Bull.* 2009; 58: 1437.
111. E.L. Teuten et al. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2009; 364: 2027.
112. M.A. Browne et al. *Curr. Biol.* 2013; 23: 2388.
113. C.M. Rochman et al. *Nat. Sci. Rep.* 2013; 3: 3263.
114. A. Bakir, S.J. Rowland, R.C. Thompson. *Environ. Pollut.* 2014; 185: 16.
115. T. Romeo et al. *Marine Pollution Bulletin* 95. 2015; 358-361.
116. M.J. Doyle et al. *Mar. Environ. Res.* 2011; 71(1): 41-52.
117. M.C. Goldstein et al. *Biology Lett.* 2012; 8(5): 817-820.
118. L.R. Gilfillan et al. *Cal. Coop. Ocean. Fish.* 2009; 50: 123-133.
119. M.C. Goldstein et al. *Plos One.* 2013; 8(11): e80020.
120. M. Eriksen et al. *Mar. Pollut. Bull.* 2013; 68: 71-76.
121. K.L. Law et al. *Science.* 2010; 329(5996): 1185-1188.
122. R.C. Thompson et al. *Science.* 2004; 304: 838.
123. J.P. Frias et al. *Mar. Environ. Res.* 2014; 95: 89-95.
124. J.A. Ivar do Sul et al. *Mar. Pollut. Bull.* 2013; 75(1): 305-309.
125. J.A. Ivar do Sul et al. *Water. Air. Soil. Poll.* 2014; 225(7): 1-13.
126. A. Cozar et al. *Plos One.* 2015; 10(4): e0121762.
127. G.A. de Lucia. *Mar. Environ. Res.* 2014; 100: 10-16.
128. A. Collignon et al. *Mar. Pollut. Bull.* 2012; 64: 861-864.
129. R.W. Obbard et al. Global warming releases microplastic legacy frozen in Arctic Sea ice. *Earth's Future.* 2014; 2: 315-320.
130. K.L. Law, R.C. Thompson. Microplastics in the seas. *Science.* 2014; 345: 144-145.
131. M.-Th. Nuelle et al. *Pollution.* 2014; 184: 161-169.
132. J.P. Harrison et al. *Sci. Total Environ.* 2012; 416: 455-463.
133. L.V. Cauwenberghe et al. *Environ. Pollut.* 2013; 182: 495-499.
134. M.O. Moss. *Fungal Metabolites. Encyclopedia of Life Sciences,* 2011.

135. C. Vidal et al. *Biosensors & Bioelectronics*. 2013; 49: 146-158.
136. M.O. Moss. *Mycological Research*. 1996; 100: 513- 523.
137. D. Bhatnagar et al. *Mycotoxins*. In *Encyclopedia of Life*, 2001.
138. EMAN, European Mycotoxin Awareness Network, <http://www.mycotoxins.org>, 2004.
139. G.S. Shephard et al. *World Mycotoxin Journal*. 2012; 5: 3-30.
140. J.C. Larsen et al. *Toxicology Letters*. 2004; 153: 1-22.
141. M. Olsen et al. *Advances in Food Mycology*. 2006; 571: 317-342.
142. M.R. Adams et al. *Food Microbiology: The Royal Society of Chemistry*. 1995.
143. H.P. van Egmond. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2004; 376: 1152-1161.
144. Recommendation (EC) no 1881/2006 of 19 December 2006. *Official Journal of the European Union* 364. 2006, pp. 5-24.
145. H.P. van Egmond. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2004; 376: 1152-1161.
146. R. Koeppen et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010; 86: 1595.
147. T. Kuiper-Goodman et al. *Food Addit. Contam. Part A*. 2010; 27: 212.
148. D. Benford et al. *Joint FAO/WHO Experts Committee on Food Additives (JECFA), Ochratoxin A, WHO Food Additives Series 47*, 2001.
149. K. Jorgensen et al. *Food Additives and Contaminants*. 2005; 22: 26-30.
150. J.J. Pestka. *Archives of Toxicology*. 2010; 84(9): 663-679.
151. S.C. Bezuidenhout et al. *J. Chem. Soc. Chem. Commun*. 1988; 743-745.
152. W.F.O. Marasas et al. *Journal of Veterinary Research*. 1988; 55: 197-203.
153. W.M. Haschek et al. *Mycopathologia*. 1992; 117: 83-96.
154. W.M. Wan et al. *American Journal of Infectious Diseases*. 2009; 5: 283-291.

155. J.P. Rheeder et al. *Phytopathology*. 1991; 83: 353-357.
156. A. Ariño Moneva. Informe relativo a las micotoxinas fumonisinas. Agencia Aragonesa de Seguridad Alimentaria, 2008.
157. G.S. Shephard et al. *J. AOAC Int.* 1996; 79: 671-687.
158. Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States (<http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/task3210>).
159. GENVCE, *Vida Rural*. 2007; 245: 70-75.
160. J.L. Richard. *Journal of Food Microbiology*. 2007; 119: 3-10.
161. J.C. Larsen et al. *Toxicology Letters*. 2004; 153: 1-22.
162. R.C. Schothorst, H.P. van Egmond. Report from SCOOP task 3.2.10 collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states. Subtask: trichothecenes. *Toxicology Letters*. 2004; 153: 133-143.
- 162a. M.S. El-Makawy, Hassanane, E.S.A.M. Abb Alla, *Reprod. Nutr. Dev.* 2001; 41: 79.
163. E.E. Creppy, *Toxicol. Lett.* 2002; 127: 19.
164. A. Zinedine et al. *Food and Chemical Toxicology*. 2007; 45(1): 1-118.
165. S. Daenicke et al. *Food and Chemical Toxicology*. 2015; 84: 225-249.
166. R. Krska, A. Molinelli. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2007; 387: 145-148.
167. S.G. Shephard. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009; 395: 1215-1224.
168. N.W. Turner et al. *Analytica Chimica Acta*. 2009; 632: 168-180.
169. M.R. Smyth, C.G.B. Frischkorn. *Analytica Chimica Acta*. 1980; 115: 293-300.
170. M. Campas, D. Garibo, B. Prieto-Simon. *Analyst*. 2012; 137: 1055-1067.
171. P.R. Perrotta et al. *Electroanalysis*. 2011; 23: 1585-1592.
172. M. Zougagh et al. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008; 391: 709-714.

173. F. Ricci et al. *World Mycotoxin Journal*. 2009; 2: 239-245.
174. N.W. Turner et al. *Analytica Chimica Acta*. 2015; 901: 12-33.
175. J. C. Vidal et al. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013; 49: 146-158.
176. Y. Andreu et al. *Talanta*. 2004; 64: 196-201.
177. J. C. Vidal et al. *Anal Bioanal Chem*. 2009; 394: 575-582.
178. L. Bonel et al. *Anal. Methods*. 2010; 2: 335-341.
179. J.C. Vidal et al. *Anal. Methods*. 2011; 3: 977.
180. L. Bonel et al. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011; 26: 3254-3259.
181. J.C. Vidal et al. *Analytical Letters*. 2012, 45: 51-62.
182. J.C. Vidal et al. *Anal B. Chem*. 2012; 403: 1585-1593.
183. A. Ezquerro et al. *Anal. Methods*. 2015; 7: 3742.
184. A. Nel et al. *Science*. 2006; 311: 622-627.
185. A. D. Maynard et al. 2006; 444: 267-269.
186. M. R. Wiesner et al. *Sci. Technol*. 2006; 40: 4336-4345.
187. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCE-NIHR), European Commission. Health and Consumer Protection Directorate, 2006, pp. 18-19.
188. Nanomaterial Research Strategy, Office of Research and Development. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., 2009, pp. 11-12.
189. C. Buzea et al. *Biointerphases*. 2007; 2: 17.
190. J.S. Weitz et al. *The ISME Journal*. 2014; 1-13.
191. M. Paction. *Nature Communications*. 2014; 5: 4298.
192. L.F. Jover et al. *Nature Reviews Microbiology*. 2014, 12: 519-528.
193. S.C. Jang et al. *ACS Nano*. 2013; 7(9): 7698-7710.
194. M. Hassellöv, F.V.D. Kammer. *Elements*. 2008; 4(6): 401-406.
195. Y. Liang et al. *PLoS ONE*. 2014; 9(11): 111634.
196. C.P.D. Brussaard et al. *Manual of Aquatic Viral Ecology*. Waco, TX: American Society of Limnology and Oceanography. 2010.
197. E. Oberdoirster. *Environ. Health Perspect*. 2004; 112(10): 1058-1062.

198. M.R. Wiesner et al. *Environ. Sci. Technol.* 2006; 40(14): 4336-4345.
199. S. Orrenius et al. *Toxicol Sci.* 2011; 119: 3-19.
200. C. Pacheco, K. Robbie. *Biointerphases.* 2007; 2: 17-71.
201. R.K. Srivastava et al. *Nanotoxicology.* 2011; 5: 195-207.
202. A.M. Schrand et al. *Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2010; 2: 544-568.
203. Y.N. Wu et al. *Biomaterials.* 2011; 32: 4565-4573.
204. D.N. Johnson-Lyles et al. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010; 248: 249-258.
205. J.S. Kim et al. *Toxicol Sci.* 2006; 89: 338-347.
206. S. Kashiwada. *Environ Health Perspect.* 2006; 114: 1697-1702.
207. H.K. Lindberg et al. *Toxicol Lett.* 2009; 186: 166-173.
208. Y. Totsuka et al. *Part Fibre Toxicol.* 2009; 6: 1-11.
209. E. Valsami-Jones, I. Lynch. *Science.* 2015; 350: 388.
210. L. Cristina Pereira et al. *Environ Sci Pollut Res.* 2015; 22: 13800-13823.
211. R.D. Handy, B.J. Shaw. *Health Risk Soc.* 2007; 9: 125-144.
212. R.D. Handy, B.J. Shaw. *Integr Environ Assess Manag.* 2007; 3: 458-460.
213. R.D. Handy et al. *Ecotoxicology.* 2008; 17: 287-314.
214. M. Farre et al. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009; 393: 81-95.
215. S. Pérez, S.M. Farré, M.D. Barceló. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 2009; 38: 820-832.
216. Liang-Chien Cheng et al. *Nanoscale.* 2013; 5: 3547-3569.
217. Gregory V. Lowry et al. *Environ. Sci. Technol.* 2012; 46: 6893-6899.
218. B.D. Anderson, J.B. Tracy. *Nanoscale.* 2014; 6, 12195.
219. S. Hackenberg et al. *Toxicol. Lett.* 2011; 201: 27-33.
220. P. AshaRani et al. *ACS Nano.* 2008; 3: 279-290.
221. L. Wei et al. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008; 233: 404-410.
222. M. Ahamed et al. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008; 233: 404-410.
223. M. Ahamed et al. *Clin. Chim. Acta.* 2010; 411: 1841-1848.
224. J. Jiménez-Lamana et al. *Szpunar Metallomics.* 2014; 6: 2242.

225. V. Rattanaruengsriikul, N. Pimpha, P. Supaphol, J. Appl. Polym. Sci. 2012; 124: 1668-1682.
226. K. Kawata, M. Osawa, S. Okabe. Environ. Sci. Technol. 2009; 43: 6046-6051.
227. C. Carlson et al. J. Phys. Chem. B. 2008; 112: 13608-13619.
228. E. Kalishwaralal et al. Colloids Surf. B. 2009; 73: 51-57.
229. J. Wang et al. Neurotoxicology. 2009; 30: 926-933.
230. N. Asare et al. Toxicology. 2012; 291: 65-72.
231. B. Sadi, K. Wrobel, S. Kannamkumarath, J.R. Castillo, J.A. Caruso. J. Environ. Monit. 2002; 4: 1010-1016.
232. K. Wrobel, B. M. Sadi, J.R. Castillo, J.A. Caruso. Anal. Chem. 2003; 75: 761-767.
233. E. Bolea et al. J. of Chromat A. 2006; 1129: 236-246.
234. F. Laborda, M.P. Górriz, E. Bolea, J.R. Castillo. Science of the Total Environment. 2007; 373: 383-390.
235. F. Laborda et al. Anal. Chim. Act. 2008; 606: 1-8.
236. F. Laborda, S. Ruiz-Beguería, E. Bolea, J.R. Castillo. Spectrochimica Acta Part B. 2009; 64(5): 392-398.
237. M.S. Jiménez, M.T. Gómez, J.R. Castillo. Talanta. 2007; 72: 1141-1148.
238. M.S. Jiménez et al. Anal. Chim. Acta. 2010; 676: 9-14.
239. M.S. Jiménez et al. Anal Bioanal Chem. 2013; 405: 359-368.
240. N. García-Otero et al. Anal. Chim. Acta. 2013; 804: 59-65.
241. F. Laborda et al. At. Spectrom. 2013; 28: 1220-1232.
242. E. Bolea et al. Analyst. 2014; 139: 914.
243. I. Abad et al. Anal. Bioanal. Chem. 2015; enviado 30 noviembre.
244. L. Sánchez et al. J. of Chromat A. 2015; enviado manuscrito JCA. 15-2028.
245. F. Laborda et al. Anal. Chim. Act. 2016; 904: 10-32.
246. G. Cepriá et al. Anal. Methods. 2014; 6: 3072.
247. G. Cepriá et al. Characterization and reactivity of cerium oxide (IV) nanoparticles: Structure and size.

LISTA DE ACRÓNIMOS UTILIZADOS

4-MBC	Alcanfor de 4-metil-bencilideno
4F	Fraccionamiento en flujo cruzado
AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
AFM1	Aflatoxina M1
AMPA	aminometilfosfónico
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization
APPI	Atmospheric pressure laser ionization
AsFIFFF	Fraccionamiento en flujo cruzado asimétrico
AuNPs	Nanopartículas de oro
BH	benzohidrol
BP-3	Benzofenona-3
BPMP	1-(4-terc-butilfenil)-3-(4-metoxifenil)-1,3-propanediona
CAFO	Concentrated Animal Feeding Operation
CCL	Listas EPA
CE	Electroforesis capilar
CNRS	Consejo Nacional de la Investigación Científica (Francia)
CPVO	Community Bureau of Plant
DBPs	Drinking products
DDT	1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil) etano
DHB	2,4-dihidroxi-benzofenona
DHMB	dihidroxi-4- 2,2' dihi-metoxibenzofenona

DNA	Deoxyribonucleic acid
DON	Deoxinivalenol
DPV	Differential Pulse Voltammetry
E2	17-estradiol
E3	estriol
EDAR	Estación depuradora de aguas residuales
EDB	Dibromuro de etileno
EDDP	2-etilidieno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina
EDS	Energy-dispersive X-ray spectroscopy
EE2	17-etinilestradiol
EFM	Microscopia de epifluorescencia
EFSA	European Food Safety Authority
EHMC	etilhexil metoxicinnamato
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
EMDP	2-etil-5-metil-3,3-difenil-1-pirrolina
EPA	Environmental Protection Agency (EE. UU.)
ESA	Alachlor etanosulfónico
ESEM-EDS	Microscopia de barrido-Espectroscopia de rayos X de dispersión de energía
ESI	Ionización electrospray
ESI-MS/MS	Ionización Electrospray-Espectrometría de Masas Tándem
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility
ETBE	etil-tert butil éter
EXAFS	Extended X-ray Absorption Fine Structure
FAO/WHO	Food and Agriculture Organization/World Health
FB1	Fumonisina B1
FCM	Citometría de flujo
FIFFF-Fluorescence	Fraccionamiento en flujo cruzado-Espectroscopia de Fluorescencia
FIFFF-ICP-AES	Fraccionamiento en flujo cruzado-Ionización en Plasma-Espectroscopia de Emisión
FIFFF-ICP.MS	Fraccionamiento en flujo cruzado-Ionización en Plasma-Espectrometría de Masas

FIFFF-Ligth scattering	Fraccionamiento en flujo cruzado-Dispersión de luz
FIFFF-UV-VIS	Fraccionamiento en Flujo cruzado-Espectroscopia de Absorción Visible/Ultravioleta
FT	Transformada de Fourier
FT-MS	Espectrometría de Masas-Transformada de Fourier
GC	Cromatografía de Gases
GC-MS/MS	Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas Tándem
GC/MS	Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas
HBP	4-hidroxibenzofenona
HHCB	Galaxolide
HMB	2-hidroxi-4-metoxibenzofenona
IR-FT	Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier
IUCA	Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón. Universidad de Zaragoza
JEFCA	Comité de expertos de la FAO/WHO sobre Aditivos de alimentos
LC-ESI/MS/MS	Cromatografía Líquida/Ionización Electrospray/E. Masas en tándem
LC/MS	Cromatografía Líquida/Espectrometría de Masa
LC/MS/MS	Cromatografía Líquida/Espectrometría de Masa tándem
LC/RMN	Cromatografía Líquida/Resonancia Magnética Nuclear
mAbOTA	Anticuerpo monoclonal de Ocratoxina A
MDA	3,4-metilendioxianfetamina
MDEA	metildietanolamina
MDMA	3,4-metilendioximetanfetamina
MRM	Monitorización de reacción múltiple

MS	Espectrometría de Masas
MTBE	metil tert-butil éter
NADH	nicotin adenin dinucleótido
NCSL	National Conference of State Legislatures
NOAA	National Oceanic and Atmospheric Administration
NOM	Natural Organic Matter
NSAID	Nonsteroidal anti-inflammatory drug
OA	Acetocloro
OAV	Food and Veterinary Office
OMC	octilmetoxicinamato
OMS	Organización Mundial de la Salud
OTA	Ocratoxina A
OTA-BSA	Ocratoxina A-Albúmina de suero bovino
OTA-HRP	Ocratoxina A-Peroxidasa del rábano (Horseradish peroxidasa)
PAGE	Polyacrilamide Gel Electroforesis
PAGE 2d	Polyacrilamide Gel Electroforesis 2-Dimension
PAGE-LA-ICP-MS	Polyacrylamide Gel Electrophoresis-Laser Ablation. Ionización en Plasma-Espectrometría de masas
PBDE	Éteres polibromodifenilos
PBSA	Ácido fenilbenzimidazol sulfónico
PCB	Bifenilos policlorados
PCR	Polimerasa
PET	Tereftalato de polietileno
PPB	partes por billón
PPT	partes por trillón
PVC	Policloruro de vinilo
Q-TOF-MS	Espectrometría de masas con cuadrupolo y detector de tiempo de vuelo
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	Residual Oxygen Substance

SEC-HPLC-ICP.MS	Cromatografía de Exclusión Molecular-Ionización en Plasma-Espectrometría Masas
SEC-HPLC-UV-VIS	Cromatografía Exclusión Molecular-Ionización en Plasma-Espectrometría UV-VIS
SEM	Microscopia electrónica de barrido
SEM-EDS	Microscopia electrónica de barrido con dispersión de energía
SP-ICP/MS	Single Particle Analysis-Ionización en Plasma-Espectrometría de Masas
SPCEs	Screen Printed Carbon Electrodes
SPR	Surface Plasmon Resonance
TDI	Ingesta diaria tolerable
TEM	Microscopia Electrónica de Transmisión
THB	2,3,4-trihidroxibenzofenona
TOF	Tiempo de Vuelo
TOF-MS	Espectrometría de masas con detector de tiempo de vuelo
XANES	X-ray Absorption Near Edge Structure
XAS	Espectroscopia de Absorción de Rayos X
XRD	Difracción de Rayos X
ZEN	Zearalenona

AGRADECIMIENTOS

Esta alocución ha sido posible gracias a la inmerecida invitación del Rector Magnífico de la Universidad de Zaragoza, profesor Manuel López. Gracias por todos tus desvelos por nuestra Universidad en estos años de tu rectorado y por tu excelente trabajo.

Gracias a mis dos padrinos por acompañarme, ambos representan lo mejor de las esencias universitarias: el profesor Domingo González Álvarez, mi magistral profesor de Mecánica y Termología de 2.º de Químicas (año 1965), artífice, además, de brillantes y sólidas iniciativas de estructuras de investigación en nuestra Universidad y en Aragón; y el profesor Francisco Laborda García, genuino ejemplo de una nueva generación de profesores e investigadores universitarios en Ciencia Analítica.

Mi intervención sobre «Ciencia Analítica sin fronteras: contaminantes emergentes» y haber llegado hasta aquí con el equipaje de nuestra producción científica, que otros ya han juzgado y juzgarán, espero que con benevolencia, no hubiera sido posible sin el constante y esforzado trabajo, muchas veces en condiciones muy complicadas y difíciles, de los componentes PDI del Grupo de Espectroscopia Analítica y Sensores del Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA), Departamento

de Química Analítica, Facultad de Ciencias. En especial, los doctores Francisco Laborda, Juan Carlos Vidal, María Sierra Jiménez, Gemma Cepriá, Josefina Pérez-Arantegui, Eduardo Bolea y María Teresa Gómez. Gracias también a todos nuestros tesinandos, becarios, TFM, TFG y doctores.

Mi reconocimiento al personal técnico-administrativo del Instituto, que desde su fundación, en 2008, ha desarrollado en unas precarias condiciones de instalaciones un brillante y ejemplar trabajo de apoyo a la labor investigadora de los grupos de investigación del IUCA.

A mi familia, mujer, hijos, nietos, mi agradecimiento por su paciencia y mi petición de perdón por el tiempo que mi vocación universitaria, docente-investigadora y de gestión les ha robado. Gracias.

ÍNDICE

1. Presentación	9
2. Introducción	13
3. Concepto de contaminante emergente	15
4. Incertidumbres científicas y transmisión de conocimiento «conflictivo»	21
Aspectos éticos: del laboratorio a la norma; el caso de los retardantes de llama bromados	21
5. Una aproximación al problema general de los contaminantes emergentes	27
6. De los casos actuales más significativos	33
Aromas sintéticos	33
Filtros solares	35
Microorganismos	37
Productos de degradación de pesticidas y nuevos pesticidas	40
Productos derivados de procesos de tratamiento y desinfección de aguas.....	44
Productos farmacéuticos, hormonas y compuestos disruptores endocrinos	47
Microplásticos	61
7. Ciencia Analítica y contaminantes emergentes en el siglo XXI: Nuestras aportaciones a dos casos destacados	69
Micotoxinas	69
Nanomateriales	87
8. Conclusión	111
Bibliografía	113
Lista de acrónimos utilizados	125
Agradecimientos	131

Esta obra se terminó de imprimir
el 25 de febrero de 2016
en los talleres gráficos
del Servicio de Publicaciones
de la Universidad de Zaragoza

