

Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas



**“Evaluación de la Toxicidad de Tres Disruptores
Endocrinos a través de Bioensayos con *Lactuca sativa*
y *Eisenia fetida* en Suelos Tratados con Biosólidos”**

**Tesis presentada para optar al grado de Magíster en Bioquímica con
área de especialización de Bioquímica Ambiental y Memoria para
optar al título de Bioquímico.**

Felipe Andrés Miranda Tafuku

Directores de Tesis: MSc Inés Ahumada Torres

Dr. Pablo Richter Duk

Santiago, Chile

Julio 2020

Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Informe de Aprobación de Tesis de Magíster

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

Felipe Andrés Miranda Tafuku

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Ambiental, y Título de Bioquímico, en el examen público rendido el día

Directores de Tesis:

MSc. Inés Ahumada T. _____

Dr. Pablo Richter D. _____

Comisión evaluadora de tesis:

Dr. Alfonso Paredes (Presidente) _____

Dra. Tatiana Garrido _____

Dra. Julieta Orlando _____

Agradecimientos

Cada saga tiene un inicio y un fin, y la saga de mi vida llamada “Estudiante Universitario” ya está concluyendo. Del mismo modo, comenzará una nueva saga en la historia de mi vida en la que participaran nuevas personas, así como compañeros, maestros, amigos y familia. Por ello, uso ésta instancia para agradecer a todos aquellos que han pasado por mi historia, y a aquellos que quiero que continúen junto a mí.

A mis padres, Mariana y Roberto, que se partieron el lomo y se mantuvieron juntos, tanto en la salud como en la enfermedad, apoyándome en cada momento, cada día, para continuar y terminar mis estudios. A mi hermana, Loreto, que aunque pasemos molestándonos y peleando por tonteras, me ha apoyado siempre. A mi Oma, mis tíos y tías, primos y primas, que desde la distancia estaban siempre preocupados e interesados por mi avance en esta etapa.

A mis maestros de la etapa escolar, que han dejado grandes enseñanzas tanto en lo académico como en la vida: Francisco Orellana, Katia Lizama, Julio Reyes y Jessica Barrientos. A mis maestros de la Universidad, que han permitido mi desarrollo académico y profesional: Dra. María Antonieta Valenzuela, Dra. Daniela Seelenfreund, Dr. Davor Cotoras, Dra. Julieta Orlando.

A mis directores de Tesis, MSc. Inés Ahumada y Dr. Pablo Richter, quienes creyeron en mí y en mi loca idea de utilizar lombrices para realizar una investigación seria, y me apoyaron con el conocimiento y sabiduría necesarios para poder desarrollar una tesis en un área alejada de la cual pertenezco, como es la Química Analítica. A mi comisión evaluadora: Dr. Alfonso Paredes, Dra. Tatiana Garrido y Dra. Julieta Orlando, que a pesar de las dudas respecto al modelo de investigación me aconsejaron y permitieron continuar con esta loca idea.

A mis compañeros de laboratorio, tanto docentes como estudiantes, que nos apoyamos mutuamente cuando tenemos dudas de las áreas en las que no estamos acostumbrados, Alejandra, Inmaculada, Daniel, Cristina.

A mi grupo de universidad, que pasamos por varios nombres, “La Orden de las Mariposas Monarcas”, posteriormente “Smac/DIABLO”, y que a pesar de que nos hayamos distanciado seguimos en contacto, manteniendo los chistes y recursos cómicos clásicos de cada uno: Darma, Marcela, Fernando, Alejandro y Joaquín.

A mis amigos de la vida, Jaime, Saúl, Salvador, Cristóbal, Álvaro, Bernardo, Nicolás y Gabriel, quienes, a pesar de molestarme por creer que estaba sintetizando droga con las lombrices, siempre compartimos buenos momentos, y espero que estos no acaben. Y a todos los que han dejado momentos importantes de mi vida que ya no están.

Agradecimientos al proyecto FONDECYT 1180742 por el financiamiento para realizar este trabajo.

Índice de contenidos

| | |
|---|-----------|
| Índice de tablas | ix |
| Índice de figuras | x |
| Lista de abreviaturas, unidades y fórmulas químicas | xii |
| Resumen | xv |
| Summary | xviii |
| | |
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1 Disruptores Endocrinos | 1 |
| 1.1.1 Bisfenol A | 2 |
| 1.1.2 17α-Ethinilestradiol | 6 |
| 1.1.3 Triclosán | 10 |
| 1.2 Biosólidos | 12 |
| 1.2.1 Uso y manejo de Biosólidos | 13 |
| 1.3 Modelos de Estudio | 14 |
| 1.3.1 Problemática asociada a los modelos de estudio | 14 |
| 1.3.2 Germinación de Semillas | 16 |
| 1.3.3 Lombrices | 17 |
| 2. Hipótesis | 21 |
| 3. Objetivos | 22 |
| 3.1 Objetivo General | 22 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 22 |

| | |
|---|-----------|
| 4. Materiales y Métodos | 23 |
| 4.1 Reactivos | 23 |
| 4.2 Estándares | 23 |
| 4.3 Materiales | 23 |
| 4.4 Modelos de Estudio | 24 |
| 4.5 Instrumentos y Aparatos | 24 |
| 4.6 Suelo y Biosólido | 25 |
| 4.6.1 Enriquecimiento de Biosólido | 26 |
| 4.7 Ensayo de germinación de semillas de lechuga | 27 |
| 4.7.1 Preparación de suelo | 27 |
| 4.7.2 Germinación de semillas de lechuga | 28 |
| 4.7.3 Mediciones del ensayo de germinación | 28 |
| 4.8 Ensayo de toxicidad aguda en lombrices y LC₅₀ de biosólido en lombrices | 29 |
| 4.8.1 Aclimatación de lombrices | 29 |
| 4.8.2 Concentración letal media (LC₅₀) de la tasa de aplicación de biosólido | 30 |
| 4.8.3 Ensayos de toxicidad aguda de lombrices en presencia de disruptores endocrinos | 31 |
| 4.8.4 Selección del estado y del número de individuos por tratamiento y número de réplicas | 31 |
| 4.8.5 Mediciones de ensayos con lombrices | 32 |

| | |
|--|-----------|
| 4.9 Cromatografía GC-MS | 33 |
| 4.9.1 Identificación mediante GC-MS | 33 |
| 4.9.2 Preparación de muestras para GC-MS | 34 |
| 4.9.3 Proceso de derivatización | 35 |
| 4.10 Análisis de datos y estadística | 35 |
| 5. Resultados y Discusión | 36 |
| 5.1 Efectos de BPA, EE2 y TCS en la germinación de semillas de lechuga (<i>L. sativa</i>) | 36 |
| 5.2 Efecto de la aplicación de biosólidos en suelo, utilizando lombrices (<i>E. fetida</i>) como indicador de toxicidad | 41 |
| 5.3 Efectos de BPA, EE2 y TCS en lombrices (<i>E. fetida</i>) presentes en el biosólido aplicado al suelo | 45 |
| 5.4 Bioacumulación de BPA, TCS y EE2 en lombrices | 49 |
| 5.4.1 Bioacumulación de BPA | 52 |
| 5.4.2 Bioacumulación de TCS | 53 |
| 6. Conclusión | 55 |
| 6.1 Perspectivas a futuro | 56 |
| 7. Bibliografía | 57 |
| 8. Anexos | 68 |
| 8.1 Figuras | 68 |
| 8.2 Tablas | 80 |

Índice de Tablas

| | |
|--|-----------|
| Tabla 1.- Propiedades físico-químicas de BPA | 3 |
| Tabla 2.- Propiedades físico-químicas de EE2 | 8 |
| Tabla 3.- Propiedades físico-químicas de TCS | 11 |
| Tabla 4.- Características físicas y químicas del suelo y biosólido | 25 |
| Tabla 5.- Metales pesados en suelo y biosólido | 26 |
| Tabla 6.- Disruptores endocrinos en biosólido | 26 |
| Tabla 7.- Composición de las mezclas suelo/biosólido de acuerdo a la tasa de aplicación | 31 |
| Tabla 8.- Tiempos de retención y masas de analitos sililados | 34 |
| Tabla 9.- Factor de bioacumulación de BPA y TCS en lombrices | 52 |

Índice de Figuras

| | |
|---|-----------|
| Figura 1.- Estructura del Bisfenol A (BPA) | 3 |
| Figura 2.- Estructura del 17α-etinilestradiol (EE2) | 7 |
| Figura 3.- Estructura del Triclosán (TCS) | 10 |
| Figura 4.- Esquema de sistema de tratamiento de aguas servidas domiciliarias | 13 |
| Figura 5.- Estructura del Ácido Abscísico (ABA) | 17 |
| Figura 6.- Estructura del Ácido Giberélico (GA) | 17 |
| Figura 7.- Cocoon de lombrices rojas (<i>Eisenia fetida</i>) | 19 |
| Figura 8.- Montaje de enriquecimiento de biosólido en un rotavapor | 27 |
| Figura 9.- Muestras de alimento para lombrices antes de su preparación | 30 |
| Figura 10.- Efectos de BPA, EE2 y TCS sobre el número de semillas que germinan | 37 |
| Figura 11.- Efectos de BPA, EE2 y TCS sobre la longitud de las radículas de lechuga | 37 |
| Figura 12.- Efectos de BPA, EE2 y TCS sobre la longitud de hipocotilo de lechuga | 38 |
| Figura 13.- Índice de germinación de semillas de lechuga | 39 |
| Figura 14.- Determinación de la LC₅₀ de la tasa de aplicación de biosólido en lombrices | 42 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 15.- Efecto de la tasa de aplicación de biosólido en la variación del peso de lombrices | 43 |
| Figura 16.- Efecto de la tasa de aplicación de biosólido en el pH del sustrato | 45 |
| Figura 17.- Variación de pH en sustrato durante ensayo de biotoxicidad | 46 |
| Figura 18.- Variación en el peso de lombrices | 48 |
| Figura 19.- Cromatograma GC correspondiente a solución multiestandar de TCS, EE2 y BPA | 50 |
| Figura 20.- Concentración de BPA en lombrices tras ensayo de toxicidad | 53 |
| Figura 21.- Concentración de TCS en lombrices tras ensayo de toxicidad | 54 |

Lista de abreviaturas, unidades y fórmulas químicas

ABA: ácido abscísico

BPA: bisfenol A

cmol: centimol

DE: disruptor endocrino

df: espesor de fase estacionaria

dS: deciSiemens

E2: 17 β -estradiol

EE2: 17 α -etinilestradiol

EI: impacto electrónico

ER: receptor de estrógeno

EU: Unión Europea

F₁: primera generación filial

F₂: segunda generación filial

g: gramo(s)

GA: ácido giberélico

GC: cromatografía de gases

GmbH: Gesellschaft mit beschränkter Haftung

ha: hectárea

HLB: hydrophilic-lipophilic-balanced

HPLC: cromatografía líquida de alta eficiencia

ID: diámetro interno

IG: índice de germinación
IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry
kg: kilogramo(s)
L: litro(s)
LC₅₀: concentración letal media
m: metro(s)
Mg: megagramo(s)
mg: miligramo(s)
min: minuto(s)
MINSAL: Ministerio de Salud
mL: mililitro(s)
mm: milímetro(s)
MSTFA: N-Metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida
m/z: razón masa/carga
n.d.: no determinado
ng: nanogramo(s)
PCB: 3,3',4,4'-tetraclorobifenilo
PDE4D4: fosfodiesterasa tipo 4 variante 4
Pfr: far-red phytochrome
PND: día(s) post natal
SIM: monitoreo selectivo de iones
SPE: extracción en fase sólida
SSL: split/splitless
TCS: triclosán

TR: receptor de hormona tiroídea

USEPA: United States Environmental Protection Agency

VTG: vitelogenina

w/v: peso/volumen

µg: microgramo(s)

µm: micrómetro(s)

Resumen

Un disruptor endocrino (DE) es un compuesto químico o mezcla de compuestos capaz de alterar la estructura o función del sistema endocrino y causar efectos adversos. Estos compuestos se han encontrado en el aire, efluentes de agua y suelos agrícolas, siendo una de sus principales fuentes los biosólidos generados en las plantas de tratamiento de aguas servidas, los cuales son utilizados como enmienda en agricultura debido a su alto contenido de materia orgánica.

Debido a que estos DE no son eliminados completamente por los tratamientos de aguas servidas, es importante conocer los efectos que estos pueden causar en organismos que se encuentren altamente expuestos, tales como invertebrados y plantas. Es por esto que se han seleccionado tres compuestos con capacidad de DE y se ha planteado la hipótesis: “La toxicidad de los disruptores endocrinos 17α -etinilestradiol (EE2), Bisfenol A (BPA) y Triclosán (TCS) presentes en un biosólido generado en una planta de tratamiento de aguas servidas, se puede determinar a través de la germinación y desarrollo de plántulas de lechuga (*Lactuca sativa*), y su bioacumulación en lombrices (*Eisenia fetida*).”

El objetivo general de este trabajo fue evaluar el efecto tóxico de los disruptores endocrinos EE2, BPA y TCS en lechuga y lombrices, y

determinar su bioacumulación en lombrices. Para el primer punto se considera como criterio de toxicidad el índice de germinación (IG), para lo cual se realiza un ensayo de germinación de semillas de lechuga en presencia de biosólido con una tasa de aplicación de 0 y 90 Mg/ha, y enriquecido con BPA (52mg/kg), TCS (40mg/kg) y EE2 (0,6mg/kg), por separado. Este ensayo dio como resultado que enriquecer con BPA el biosólido afecta en la germinación, disminuyendo el número de semillas que germinan, y entregando un IG del $40 \pm 27\%$, implicando una condición fitotóxica.

En cuanto a las lombrices, se realizó un estudio previo para adecuar la tasa de aplicación de biosólido, estableciéndose ésta en 30 Mg/ha, ya que se encuentra fuera del rango en que puede afectar a las lombrices, con una LC_{50} de 67,5 Mg/ha. El ensayo de lombrices constó de una exposición de éstas por 14 días a suelo tratado con biosólido en las mismas condiciones que el ensayo de germinación, a las que se controló su peso los días 0, 7 y 14. En este ensayo tanto la adición de EE2 como el tratamiento con acetona mostraron un efecto de estancamiento del aumento de peso.

Finalmente, la acumulación de los DE se determinó por medio de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) con lo cual se obtuvo que tanto el BPA como el TCS se acumulan en lombrices mientras que el EE2 no pudo ser detectado.

En conclusión, los bioensayos de germinación de semillas y los bioensayos con lombrices permiten determinar la toxicidad de los DE, mientras que su acumulación puede ser considerada como un complemento de dicha detreminación.

“Toxicity Evaluation of three Endocrine Disruptors through Bioassays with *Lactuca sativa* and *Eisenia fetida* on a biosolid-amended soil”

Summary

An endocrine disruptor (ED) is a chemical compound or a mixture of them that can disrupt the endocrine system function and cause adverse effects. These compounds can be found at air, water effluents and agricultural soils, being one of their main sources the biosolids originated from the wastewater treatment plants, which are used as an amendment due to its high content of organic matter.

Because these EDs are not removed by the wastewater treatment plants, it is important to know the effects that they can cause on highly exposed organisms, like plants and invertebrates. As hypothesis, it is proposed that the toxicity of the endocrine disruptors 17 α -ethinylestradiol (EE2), Bisphenol A (BPA) and Triclosan (TCS) present in a biosolid generated in a wastewater treatment plant, can be determinate by the germination and development of lettuce (*Lactuca sativa*) seedling, and the bioaccumulation on earthworms (*Eisenia fetida*).

The general aim of the present study is to evaluate the toxic effect of the endocrine disruptors EE2, BPA and TCS on lettuce and earthworms, and determinate its bioaccumulation on earthworms.

For the first, it is considered the germination index (GI) as a toxicity criterion, for which a germination test is carried out where the soil were treated with two biosolid rates (0 and 90 Mg/ha), and other treatments with biosolid separately amended with BPA (52mg/kg), TCS (40mg/kg) and EE2 (0,6mg/kg). This assay concludes that a treatment of the biosolid with BPA can affect the germination decreasing the number of seeds that germinate and with a GI of $40 \pm 27\%$, indicating phytotoxicity.

As for the earthworms, a preliminary test was carried out to adequate the biosolid application rate, settling on 30 Mg/ha, because it was out of range of the determinate LC_{50} (67,5 Mg/ha). The earthworm assay consist of exposing them for fourteen days to a substrate with the same conditions of the germination assay, controlling the weight at the beginning, middle and final point of the test. This assay shows that the application of EE2 and acetone have a negative effect on the weight of earthworms, stopping its weight increase at the end of the assay.

Finally, the bioaccumulation of the EDs was determinate by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The assay

shows the accumulation of BPA and TCS on earthworm, while EE2 couldn't be detected.

In conclusion, seed germination and earthworm bioassays can be used to determine the toxicity of EDs, while their accumulation can be considered as a complement to said determination.

1.- Introducción

1.1.- Disruptores endocrinos

Un disruptor endocrino (DE) es un compuesto químico o mezcla de compuestos capaces de alterar la estructura o función del sistema endocrino y causar efectos adversos a nivel de organismo, su progenie, las poblaciones, o sub-poblaciones de organismos, basado en principios científicos, información, peso de la evidencia y el principio de precaución [IUPAC, 2003]. Estos compuestos pueden interferir en la síntesis, transporte y metabolismo de hormonas y tienen la capacidad de unirse a receptores de hormonas tales como receptores nucleares, receptores de hormonas esteroidales no nucleares y receptores no esteroidales [Diamanti-Kandarakis et al., 2009], o afectar otros mecanismos tales como vías enzimáticas, co-activadores transcripcionales y modificaciones epigenéticas [Anway y Skinner, 2008; Matthews et al., 2001; Moral et al., 2008; Novo et al., 2018]. El origen de los DE puede ser natural o, en su mayoría, sintético [Metzler y Pfeiffer, 2001]. Debido a ello, pueden llegar al medio ambiente a través de distintas fuentes, tales como: la aplicación de pesticidas, químicos industriales liberados no intencionalmente debido a su volatilidad o por mala manipulación de sus desechos, hormonas naturales secretadas por organismos que ingresan directamente a compartimientos del medio ambiente [IUPAC, 2003], la combustión incompleta de combustibles fósiles y biomasa, emisión de gases vehiculares, combustión de biomasa

en zonas rurales para cocina o calor, humo de cigarrillos [Zhang et al.,2016], efluentes de hospitales y actividades humanas [Ying et al., 2002]. Una de las fuentes más importantes de DE son los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas servidas, debido a que las instalaciones de las distintas etapas no son capaces de eliminar por completo estos compuestos [Aris et al., 2014; Bedoux et al., 2012; Bertin et al., 2009; Careghini et al., 2015; Gültekin e Ince, 2007; Hecker y Hollert, 2011; Markman et al., 2007; Zenker et al., 2014] y la aplicación de lodos y biosólidos [Kinney et al., 2008 y 2012; Singh y Agrawal, 2008; Zhang et al., 2015].

1.1.1.- Bisfenol A

El Bisfenol A (BPA) (2,2-bis(4-hidroxifenil)propano) es un compuesto orgánico con dos grupos fenol (**Figura 1**), cuyas propiedades físico-químicas se muestran en la **Tabla 1**. El BPA se ha descrito como “xenoestrógeno” [Ferrara et al., 2006; PubChem, www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov; Witorsch, 2002] utilizado como intermediario en la producción de plástico de policarbonato y resinas epóxicas y de poliéster-estireno insaturado, retardantes de fuego, funguicidas, antioxidantes, así como aditivo en tubos de PVC, tubos médicos, sellantes dentales, juguetes, tuberías de agua, contenedores de alimentos en conserva, botellas de refrescos y agua mineral [Al-Hiyasat et al., 2002; Bhandari et al., 2014; Careghini et al., 2015; Ferrara et al., 2006; Gültekin e Ince, 2007; Juan-Garcia et al.,2015; Matthews et al.,

2001;Oehlmann et al., 2009; Rubin, 2011,Welshons et al., 2006; Zhang et al., 2015].

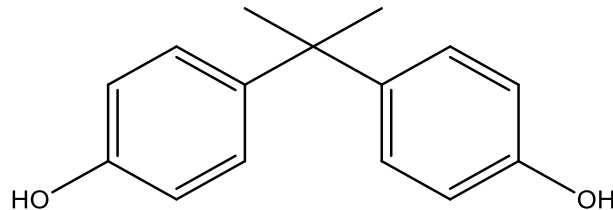


Figura1.-Estructura del Bisfenol A (BPA)

Su producción ha ido en aumento en las últimas dos décadas, alcanzando así cantidades que van de 2,5 a 6,8 millones de toneladas entre 2002 y 2013 [Bhandari et al., 2014; Careghini et al., 2015; Flint et al., 2012; Oehlmann et al., 2009; Welshons et al., 2006; Zhang et al., 2015] con expectativas de alcanzar una producción de 7,3-9,1 millones de toneladas para el año 2020 [Bhandari et al., 2014; GIA,www.strategyr.com].

Tabla 1.- Propiedades físico-químicas de BPA

| Propiedad físico-química | Valor |
|--------------------------|--------------|
| Peso molecular (PM) | 228,29 g/mol |
| pK _a | 9,60 |
| Log K _{ow} | 3,32 |
| Solubilidad en agua | 120 mg/L |

El BPA se considera ubicuo en el medio ambiente, dado a que se puede encontrar en aguas superficiales, agua subterránea, suelos y sedimentos. Su ingreso a estos compartimentos se debe a descargas puntuales tales como residuos industriales, lixiviados de vertederos, fosas sépticas, aguas servidas y desechos plásticos sólidos. Sin embargo, las principales fuentes de BPA son los efluentes de las plantas de tratamientos de aguas residuales municipales y los biosólidos [Al-Hiyasat et al., 2002; Bhandari et al., 2014; Careghini et al., 2015; Ferrara et al., 2006; Flint et al., 2012; Gültekin e Ince, 2007; Oehlmann et al., 2009; Plahuta et al., 2015; Zhang et al., 2015].

Dada su presencia en el medio ambiente se ha investigado su mecanismo de acción en animales y líneas celulares, enfocándose principalmente en su relación con el receptor de estrógeno (Estrogen Receptor, ER). El BPA tiene una menor afinidad por el ER que el estradiol, sin embargo son igual de eficaces en activar la señalización de receptores no nucleares de estrógeno [Bhandari et al., 2014; USEPA(a), www.epa.gov]. A pesar de que se ha considerado como un agonista del ER, también puede ejercer una acción antagónica en algunos tejidos, como cerebro y útero [Bhandari et al., 2014]. Dada la evidencia existente sobre los efectos del BPA se ha determinado su capacidad de generar respuestas a muy baja concentración [Rubin, 2011; Welshons et al., 2006].

Se ha considerado que para aguas superficiales la concentración de 12 µg/L de BPA corresponde a un nivel medioambientalmente relevante

[Flint et al., 2012]. Bajo este “umbral”, se han visto efectos de BPA en distintos modelos animales: En peces (*Danio rerio*, *Pimephales promelas*), la exposición a BPA es capaz de alterar la reproducción, por medio de la supresión de la expresión de aromatasa (23 – 2280 ng/L BPA), reducción de la calidad del espermatozoides y el ratio de ovulación (1,75 µg/L BPA) e inducción de vitelogenina (VTG) en individuos del sexo masculino (40 – 160 µg/L BPA) [Bhandari et al., 2014; Flint et al., 2012; Oehlmann et al., 2009].

En anfibios (*Silurana tropicalis*, *Xenopus laevis*) se han estudiado los efectos del BPA en tiroides debido al control que ésta ejerce sobre la metamorfosis. El BPA actúa como un antagonista del receptor de hormona tiroidea (TR) (2,28 – 22,8 µg/L BPA)[Flint et al., 2012; Rubin, 2011; Welshons et al., 2006], además se establece una tendencia de feminización en renacuajos expuestos [Bhandari et al., 2014; Flint et al., 2012] y acumulación del mRNA de VTG en ranas macho adultas (22,8 µg/L BPA) [Flint et al., 2012; Oehlmann et al., 2009].

En reptiles (*Caiman latirostris*) se ha visto que en huevos expuestos a altas concentraciones de BPA (9 mg/huevo) se produce un cambio en la determinación del sexo, el cual depende de la temperatura, pasando de masculino a femenino [Bhandari et al., 2014; Flint et al., 2012].

Así mismo, en huevos de aves (*Gallus domesticus*) se ha observado un incremento de la mortalidad de embriones, así como la feminización de

embriones masculinos en presencia de una sola dosis de BPA (200 $\mu\text{g/g}$ huevo) [Flint et al., 2012].

En cuanto a mamíferos, ratones expuestos a una dieta en presencia de BPA (200 – 800 mg/kg/día) muestran un aumento en el peso del útero [Matthews et al., 2001], mientras que en machos se produce una disminución de la vesícula seminal (25 ng/kg), disminución del contenido de espermatozoides testicular (25 – 100 ng/kg) y reducción de la eficiencia de producción de espermatozoides (25 – 100 ng/kg) [Al-Hiyasat et al., 2002]. El BPA es capaz de producir modificaciones epigenéticas en el ADN, tales como la disminución de la metilación en sitios citosina-guanina (CpG) en la región promotora del gen A^{vy} asociado al color amarillo del pelaje de ratones, así como aumentar la metilación de un cluster citosina-guanina (CG) del gen de la fosfodiesterasa tipo 4 variante 4 (PDE4D4), asociada a la degradación de cAMP y con la proliferación de células cancerosas [Rubin, 2011].

1.1.2.- 17α -Ethinilestradiol

El 17α -etinilestradiol (EE2) (19-nor- 17α -pregna-1,3,5(10)-trien-20-in-3,17-diol) es un compuesto sintético (**Figura 2**), derivado de la hormona natural estradiol (E2) [Aris et al., 2014]. Sus propiedades físico-químicas se muestran en la **Tabla 2**.

Uno de los principales usos del EE2 es en la formulación de píldoras anticonceptivas [Arcand-Hoy et al., 1998; Aris et al., 2014; Kuster et al.,

2005; Meina et al., 2013; MINSAL, 2018; Moriyama et al., 2004; Ying et al., 2002], cuyo contenido varía entre los 20 y 50 μg [Kuster et al., 2005]. En Chile, la dosis de etinilestradiol en las píldoras anticonceptivas es regulada por el Ministerio de Salud, siendo estas de 30, 20 y 15 μg [MINSAL, 2018]. Se ha estimado que entre 2006 y 2008, 10,7 millones de mujeres entre los 15 y 44 años han utilizado el EE2 como anticonceptivo oral [Laurenson et al., 2014]

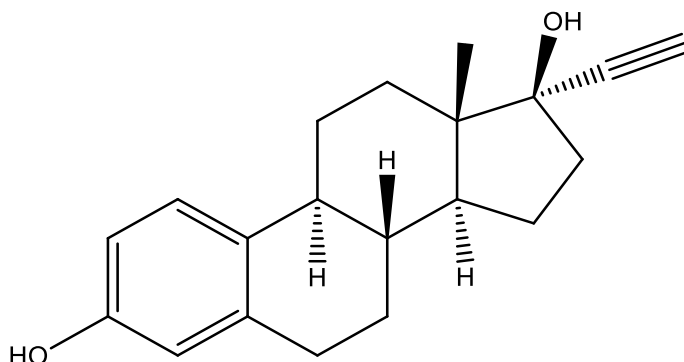


Figura 2.- Estructura del 17 α -etinilestradiol (EE2)

Otros usos que se le ha dado al EE2 y otros estrógenos comprenden la terapia de reemplazo hormonal, promotores de crecimiento, tratamiento de cáncer de mama y de próstata, entre otros [Arcand-Hoy et al., 1998; Aris et al., 2014; Kuster et al., 2005; Ying et al., 2002].

Tabla 2.- Propiedades físico-químicas de EE2

| Propiedad físico-química | Valor |
|---------------------------------|--------------|
| Peso molecular (PM) | 296,40 g/mol |
| pK_a | 10,33 |
| Log K_{ow} | 4,15 |
| Solubilidad en agua | 4,8 mg/L |

El compuesto estrogénico más común encontrado en el ambiente acuático es el EE2 [Meina et al., 2013], siendo la excreción humana su principal fuente de origen [Kuster et al., 2005; Meina et al., 2013; Ying et al., 2002]. Se ha estimado que, en base a la cantidad de EE2 presente en píldoras anticonceptivas, la excreción diaria alcanza los 0,41 - 35 µg/día/persona [Laurenson et al., 2014; Ying et al., 2002]. Las plantas de tratamiento de aguas servidas, no remueven completamente el EE2 [Aris et al., 2014; Meina et al., 2013], el cual parece ser estable en las condiciones aeróbicas del proceso de lodos activados [Ternes et al., 1999]. Un estudio reveló que en la zona centro-sur de Chile, la concentración de EE2 en el efluente de las plantas de tratamiento de aguas servidas se encontraban entre los 0,38 a 30,56 ng/L [Bertin et al., 2009], siendo éste un rango intermedio en comparación a los niveles encontrados en otros países (0,1 a 62 ng/L) [European Commission, 2002] ya que depende principalmente de la ubicación y urbanización del lugar donde se realice el estudio.

Al igual que con el BPA, se ha investigado el comportamiento del EE2 como disruptor endocrino, siendo éste enfocado inicialmente en su interacción con el ER, resultando en que el EE2 es un agonista del receptor, y posee una bioactividad similar al estradiol [USEPA(a), www.epa.gov].

Se han realizado estudios reproductivos multigeneracionales con el fin de ver efectos del EE2 tanto en ratas hembra como en machos, en cuanto a su capacidad como disruptor endocrino. En ratas Sprague-Dawley hembras, se ha visto que al estar expuestas a una concentración de 50 µg/L de EE2 se produce una reducción de la ganancia de peso a partir del día 14 post natal (14PND) en las primeras dos generaciones (F₁ y F₂); además de un aumento en la duración de su ciclo estral, consistente con la prolongación del estro (45% y 44% del ciclo en comparación con el 29% y 23% en controles de F₁ y F₂, respectivamente) y diestro [Delclos et al., 2009]. Por otro lado, en ratas Wistar machos se encontró que la exposición entre el 22PND y 43PND con dosis de 1000 ng/mL de EE2 produce una disminución del peso ganado en comparación con las ratas control [Vosges et al., 2008].

Debido a la presencia de EE2 en ambientes acuáticos, se han realizado una gran cantidad de estudios con el fin de estudiar la respuesta de distintos organismos acuáticos, tanto vertebrados como invertebrados, en

cuanto a su capacidad como potencial disruptor endocrino [European Commission, 2002], los cuales han mostrado que los peces son más sensibles ante los efectos adversos de EE2.

1.1.3.- Triclosán

El triclosán (TCS) (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol) (**Figura 3**) es un compuesto ampliamente usado como agente antibacteriano en una gran cantidad de productos de cuidado personal, tales como jabones, detergentes, pasta dental, desinfectantes y cosméticos, así como también en productos textiles, juguetes, utensilios de cocina y artículos médicos [Bedoux et al., 2012; Ying y Kookana, 2007]. Sin embargo, el TCS fue removido por la Unión Europea en 2010 para su uso en materiales que estén en contacto con alimentos [Bedoux et al., 2012]. Sus propiedades físico-químicas se muestran en la **Tabla 3**.

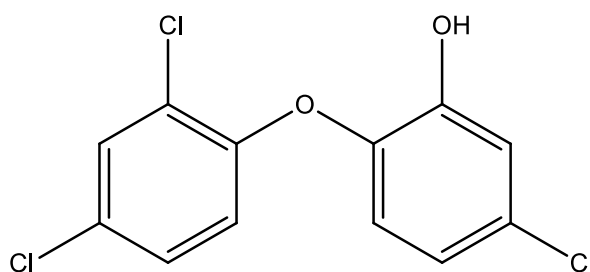


Figura 3.- Estructura del Triclosán (TCS)

Debido a su uso en artículos de aseo personal, el TCS puede llegar a las plantas de tratamiento de aguas servidas y por lo tanto, al efluente de estas plantas. Dependiendo de la ubicación, se han determinado distintas concentraciones de TCS en el efluente, las cuales van de los 10 ng/L

hasta los 5115 ng/L [Halden y Paull, 2005; Heidler y Halden, 2007; Kolpin et al., 2002; Lozano et al., 2013; Singer et al., 2002; Thompson et al., 2005; Ying y Kookana, 2007]. Estas determinaciones han sido importantes, ya que el efluente solo contiene alrededor del 10% del contenido de TCS que llega a la planta de tratamiento [Lozano et al., 2013; Singer et al., 2002] mientras que los lodos activados y biosólidos retienen la mayor cantidad de TCS, alcanzando concentraciones de entre 20000 y 55000 µg/kg [Heidler y Halden, 2007].

Tabla 3.- Propiedades físico-químicas de TCS

| Propiedad físico-química | Valor |
|---------------------------------|--------------|
| Peso molecular (PM) | 289,54 g/mol |
| pK_a | 7,90 |
| Log K_{ow} | 4,76 |
| Solubilidad en agua | 10 mg/L |

Como se mencionó anteriormente, los biosólidos son capaces de retener el TCS, pero se ha visto que no tienen un efecto significativo en su degradación [Wu et al., 2009]. De este modo, se ha puesto atención en cuanto a su capacidad de actuar como disruptor endocrino. A diferencia del BPA y EE2, el TCS no presenta características de ser un agonista o antagonista del ER, ni es capaz de activarlo [USEPA(a)]. Por otro lado, se ha visto que sí es capaz de interactuar con el receptor de hormona tiroidea (TR). El TCS es capaz de afectar el desarrollo de renacuajos de rana *Rana catesbeiana* en concentraciones bajas (0,15±0,03 µg/L),

provocando una pérdida transiente de peso y alterando la expresión del mRNA del TR_β [Veldhoen et al., 2006].

A pesar de tener una baja concentración en agua, se ha visto que el TCS a esas concentraciones es capaz de alterar la densidad celular del fitoplancton *Dunaliella tertiolecta*, ya que a 4,9 µg/L se supera el 50% del efecto esperado, correspondiente a la disminución de la densidad celular [DeLorenzo y Fleming, 2008].

1.2.- Biosólidos

Los biosólidos son subproductos del tratamiento de aguas servidas (**Figura 4**), con un alto contenido de materia orgánica y nutrientes. Una vez tratados y procesados, estos residuos pueden ser reciclados y aplicados como fertilizante para mejorar y mantener la productividad de suelos agrícolas [USEPA (b)]. Debido a la naturaleza heterogénea de los biosólidos producidos en distintas plantas de tratamiento de agua es necesario conocer su composición química previo a su utilización [Singh y Agrawal. 2008].

La directiva europea sobre residuos ha introducido un cambio en la gestión de residuos, la cual considera la capacidad de continuar el ciclo de los materiales desde una perspectiva económica. De este modo, es importante considerar el uso benéfico de estos residuos orgánicos ricos en nutrientes en la agricultura, de modo alternativo al uso en rellenos

sanitarios y la incineración, permitiendo así el reciclaje de la materia orgánica y los nutrientes [Alvarenga et al., 2017].

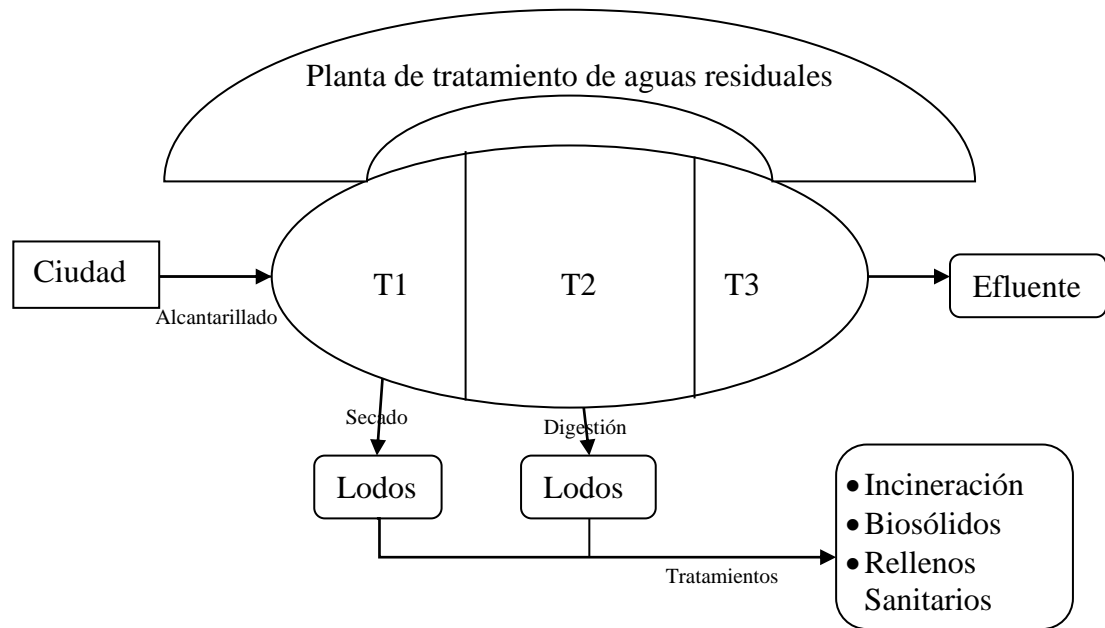


Figura 4.- Esquema de sistema de tratamiento de aguas servidas domiciliarias. T1: Tratamientos primarios (Neutralización, Coagulación, Flotación, Sedimentación, Filtración). T2: Tratamientos secundarios (Lagunas aireadas, Lodos activados). T3: Tratamientos terciarios (Filtración selectiva, Ozonación, Adsorción a Carbón Activado). Tratamientos de lodos (Digestión. Filtración. Secado).

1.2.1.- Uso y manejo de biosólidos en Chile

En 2010 entró en vigencia en Chile el Reglamento para el Manejo de Lodos Generados en Plantas de Tratamiento de Aguas Servidas, siendo éstos clasificados en clase A, sin restricciones sanitarias para su aplicación al suelo; y clase B, aptos para la aplicación al suelo, con restricciones sanitarias de aplicación según tipo y localización de los suelos o cultivos [Decreto 4, 28 de Octubre de 2009], pero dentro de las

características requeridas para su aplicación solo se hace mención a su clasificación sanitaria (clase A o B), contenido total de metales pesados (Artículo 24° del mismo reglamento), el contenido de materia orgánica, contenido de humedad y conductividad eléctrica, sin hacer mención específica de la presencia de contaminantes orgánicos, como los disruptores endocrinos. De acuerdo al “Informe del estado del medio ambiente” de 2016, emitido por el Ministerio del Medio Ambiente, la generación total de lodos en el país para el año 2014 alcanzó las 492846 toneladas. De esto, el 51% se dispusieron en rellenos sanitarios o monorrellenos, mientras que el 35% se destinaron a suelos, cubriendo una superficie de más de 1000 ha. De esta superficie, el 77% corresponden a plantaciones forestales, el 16% a praderas y el 7% se destinó a cereales [Ministerio del Medio Ambiente, Gobierno de Chile, 2016].

1.3.- Modelos de Estudio

1.3.1.- Problemática asociada a los modelos de estudio

Cada vez toma más relevancia la presencia de compuestos con capacidad de tener efectos de disruptores endocrinos presentes en agua y suelo, lo cual ha generado un aumento en la demanda de ensayos biológicos para corroborar estos efectos. Por ejemplo, someter una sola sustancia química a la batería completa de pruebas de nivel 1 (sólo para determinar su capacidad como disruptor endocrino) establecida por la USEPA requeriría aproximadamente 130 ratas, 30 renacuajos/ranas y 60 peces.

Para el total de compuestos químicos de los que se ha considerado su potencial acción como disruptores endocrinos (aproximadamente 80000), se requeriría el sacrificio de millones de animales, lo cual representa un problema tanto ético como económico [Hecker y Hollert, 2011]. Otros modelos comprenden sistemas altamente simplificados o artificiales, lo que no representa la complejidad de un organismo con sus rutas de regulación, comunicación entre vías biológicas, metabolismo, etc. [Hecker y Hollert, 2011].

De este modo, cada vez toma más peso el estudio de los efectos de estos disruptores endocrinos sobre otro tipo de organismos, tales como las plantas, principalmente aquellas de uso agrícola como el tomate (*Lycopersicon esculentum*), la lechuga (*Lactuca sativa*), habas (*Vicia faba*), trigo (*Triticum* sp.), etc. [Ahumada et al., 2014; Amorim et al., 2010; Cantarero et al., 2017; Ferrara et al., 2006; Jachero et al., 2015; Kinney et al., 2012; Pannu et al., 2012].

Alrededor del 95% de las especies conocidas del reino animal son invertebrados, y los estudios relativos a efectos de disruptores endocrinos han ido aumentando ya que ellos poseen un papel importante en las cadenas tróficas de prácticamente todos los ecosistemas [Hecker y Hollert, 2011]. Éstos han sido importantes tanto para los efectos en ambientes acuáticos, cuyo modelo ha sido *Daphnia magna* [Hutchinson,

2002; Zou y Fingerman, 1997], como para ambientes terrestres, cuyos modelos han sido las lombrices [Kinney et al., 2012].

1.3.2.- Germinación de Semillas

La germinación, en el sentido estricto de la palabra, corresponde a los procesos que suceden dentro de la semilla “antes” de la emergencia de la radícula [Nonogaki, 2006]. Generalmente se habla de germinación cuando ya se ha establecido la plántula. La semilla se define como un óvulo maduro, la cual contiene al embrión y el endosperma, y se encuentra cubierta por una capa llamada testa. En algunas especies, el endosperma no se encuentra, o se encuentra en pequeña cantidad (no endospermicas), las cuales se denominan de tipo V, como la lechuga [Nonogaki, 2006]. En ellas, la mayoría del endospermo es digerido durante las etapas de desarrollo. Los procesos de la germinación, así como otros procesos posteriores son regulados por compuesto químicos denominados fitohormonas, las cuales actúan en forma conjunta, y su rol dependerá del tejido en el que se produce un efecto [Nonogaki, 2006]. De forma basal, las semillas se encuentran en un estado de dormancia, dado principalmente por efecto del ácido abscísico (ABA), cuya estructura se ve representada en la **Figura 5**. Las semillas pueden ser sacadas de este estado por medio de la activación del fitocromo, el cual responde a un estímulo lumínico. Por otro lado, la síntesis de ácido giberélico (GA) por parte de la enzima GA 3 β hidroxilasa, inhibe la acción de ABA y

promueve el potencial de crecimiento del embrión [Nonogaki, 2006].. La estructura del GA se muestra en la **Figura 6**.

Otro proceso importante es la degradación de los polisacáridos presentes en la testa, lo cual genera el debilitamiento de la pared celular. Ambos procesos deben ocurrir para que la radícula pueda emerger [Nonogaki, 2006].

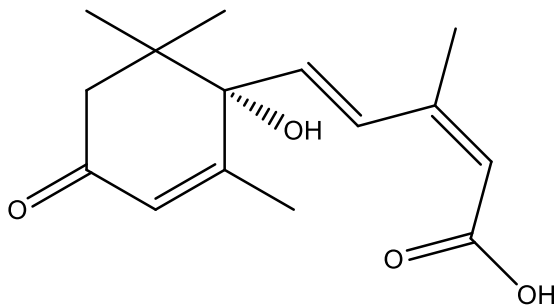


Figura 5.- Estructura del Ácido Abscísico (ABA)

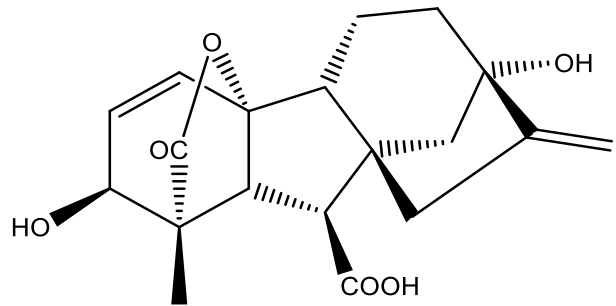


Figura 6.- Estructura del Ácido Giberélico (GA)

1.3.3.- Lombrices

Las lombrices han sido clasificadas en el filo Annelida o Annélidos (“pequeño anillo”). El cuerpo de la lombriz se encuentra segmentado, alcanzando los 100 a 150 segmentos. Las partes segmentadas del cuerpo proveen importantes funciones estructurales, ya que cada uno posee músculos y cerdas llamadas “setae”, las cuales le ayudan a controlar su movimiento [Environmental Technology Centre, 2004].

Su sistema digestivo está dividido en regiones, correspondientes a faringe, esófago, crop, intestino y gizzard. A medida que el suelo

ingerido pasa a través del esófago, se libera carbonato de calcio desde las glándulas calcíferas, con el fin de eliminar el exceso de calcio en la lombriz. Además de suelo, las lombrices comen piedras pequeñas que mantienen en el gizzard, las cuales le ayudan a moler completamente el alimento. En el intestino se secretan enzimas que ayudan a digerir el resto del alimento para que los nutrientes puedan ser absorbidos y distribuidos al resto del cuerpo [Laverack, 1963].

Su sistema circulatorio es cerrado. Poseen tres vasos principales, el “arco aórtico”, y los vasos dorsal y ventral. El arco aórtico funciona como un corazón, formado por 5 pares de arcos que bombean sangre a los vasos dorsales, responsable de llevar la sangre hacia el frente de la lombriz; y ventrales, responsable de llevar la sangre al extremo posterior de la lombriz [Laverack, 1963].

Las lombrices no poseen pulmones, por lo que respiran a través de su piel. El O₂ y el CO₂ atraviesan la piel por difusión, por lo que ésta se debe mantener húmeda [Laverack, 1963].

Son hermafroditas, donde cada una posee los órganos sexuales masculinos y femeninos. Estos se ubican en el clitelo (entre los segmentos 24-32). Alcanzan la madurez sexual a los 52 días, siendo capaces de producir hasta 2 cocoons (**Figura 7**) cada 3 a 4 días, donde

cada uno puede llevar hasta 6 crías [Environmental Technology Centre, 2004].

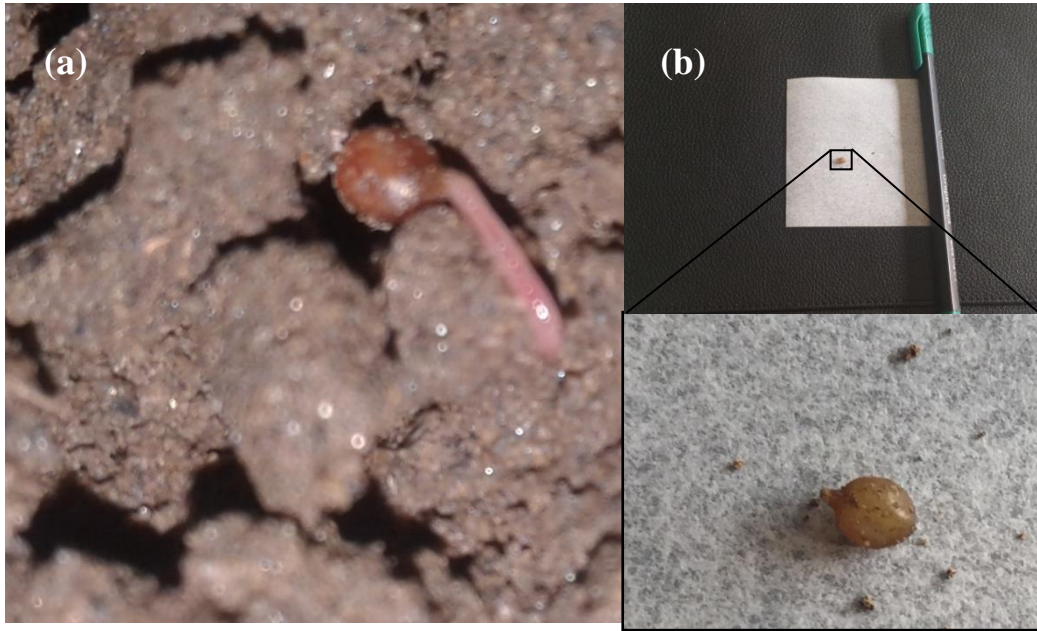


Figura 7.-Cocoon de lombrices rojas (*Eisenia fetida*). Cría saliendo de un cocoon (a). Extrapolación del tamaño de un cocoon (b).

Poseen un sistema nervioso conformado por un ganglio cerebral, un ganglio sub-esofágico y un cordón nervioso ventral. Su función se asocia al movimiento muscular, sensor de luz y poseen una actividad neurosecretora de hormonas. Éstas están asociadas a funciones cíclicas como la reproducción, migración de pigmentos y el desarrollo de caracteres sexuales secundarios. El ganglio cerebral se encarga de regular el ciclo reproductivo mediante las células “a” y el desarrollo de tejido nuevo luego de sufrir daño mediante las células “b”. El ganglio sub-esofágico también participa en la regeneración, pero por medio de las

células “u”. El cordón nervioso ventral modula la postura de huevos, en conjunto con el ganglio cerebral [Laverack, 1963].

1.4.-Planteamiento del problema

En cuanto a los antecedentes presentados, los estudios de efectos y toxicidad de los DE se enfocan principalmente en el ambiente acuático, correspondiente a los sitios de descarga de efluentes de las plantas de tratamiento de aguas servidas. Debido a que éstos compuestos también son retenidos por los biosólidos, pueden llegar a los suelos de uso agrícola, pudiendo generar efectos en los sitios de su aplicación. Es por esto que es crucial realizar estudios en modelos que se encuentren en estos suelos, tales como invertebrados terrestres y plantas de cultivo agrícola, y así poder determinar los efectos que pueden tener los DE provenientes de los biosólidos que han sido aplicados en suelo.

2.- Hipótesis

La toxicidad de los disruptores endocrinos 17α -etinilestradiol (EE2), Bisfenol A (BPA) y Triclosán (TCS) presentes en un biosólido generado en una planta de tratamiento de aguas servidas, se puede determinar a través de la germinación y desarrollo de plántulas de lechuga (*Lactuca sativa*), y su bioacumulación en lombrices (*Eisenia fetida*).

3.- Objetivos

3.1.- Objetivo General

Evaluar el efecto tóxico de los disruptores endocrinos EE2, BPA y TCS en lechuga (*Lactuca sativa*) y lombrices (*Eisenia fetida*), y determinar la bioacumulación de estos compuestos a través de bioensayos con lombrices.

3.2.- Objetivos específicos

- Evaluar los efectos de EE2, BPA y TCS presentes en el biosólido aplicado a los suelos, en la germinación y desarrollo de plántulas de lechuga.
- Evaluar la toxicidad de EE2, BPA y TCS presentes en el biosólido aplicado a los suelos, a través de un bioensayo con lombrices.
- Determinar la bioacumulación de EE2, BPA y TCS presentes en el biosólido aplicado a los suelos, en lombrices.

4.- Materiales y métodos

4.1.- Reactivos

- Acetato de etilo, Acetonitrilo, Acetona, Metanol grado HPLC, Merck (Darmstadt, Alemania).
- Agente derivatizante N-Metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA), Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA).
- Piridina, Merck.
- Nitrógeno extrapuro 99,995%, Linde (Santiago, Chile).
- Sulfato de sodio anhidro (99%), Merck.
- Florisil[®](60-100 mesh) y C18 (70-230 mesh), Sigma Aldrich.

4.2.- Estándares

- Bisfenol A, 17 α -etinilestradiol, Triclosán y PCB 77, Dr Ehrenstorfer GmbH (Ausburg, Alemania).

4.3.- Materiales

- Recipientes de vidrio de 11,5 cm de profundidad.
- Frascos de 500 mL.
- Placas de Petri de 90 mm de diámetro.
- Papel milimetrado.
- Cartuchos OASIS HLB Waters de 3cc.
- Tubos de vidrio de 2, 10 y 30 mL.

4.4.- Modelos de estudio

- Semillas de lechuga (*Lactuca sativa*).
- Lombrices rojas (*Eisenia fetida*).

4.5.- Instrumentos y Aparatos

- Cámara de incubación VWRtm.
- Medidor de pH Microprocessor pH Meter pH 537 WTW.
- Balanza analítica Swiss Quality 124 A.
- Balanza Granataria PJ precisa junior 5000.
- Estufa WTB Binder.
- Liofilizador BenchTop Pro with OmnitronicstmVirtis SP Scientific.
- Bomba de vacío œrlikon leybold vacuum Trivac D2,5E.
- Estabilizador electrónico de tensión, Fernández Fica.
- Timer Complete Digital T-Digi01.
- Manifold para SPE SUPELCO visipred.
- Rotavapor Heidolf HB Digital.
- Vórtex Sci Logex MX-S.
- Equipo de cromatografía de gases Thermo Fisher con detector de espectro de masas con analizador cuadrupolo, ISQTM e inyector SSL.

4.6.- Suelo y Biosólido

La muestra de suelo corresponde a la serie Chicauma y se obtuvo del horizonte superficial entre 0 y 20 cm de profundidad. La muestra de suelo se secó al aire y se tamizó a un tamaño de 2 mm. El biosólido se recolectó de una planta de tratamiento de aguas servidas de la Región Metropolitana (Junio, 2015), el cual se secó al aire y se tamizó a 2 mm. Tanto la caracterización fisicoquímica como la determinación de metales pesados y la presencia de disruptores endocrinos en suelo y biosólido se realizaron como parte de la tesis de la Química Ambiental Paulina Gómez Santander [Gómez, 2016], las cuales se detallan en las **Tablas 4, 5 y 6**.

Tabla 4.- Características físicas y químicas del suelo y biosólido.

| Sustrato | Suelo Chicauma | Biosólido |
|---|----------------|-----------|
| pH | 6,44 | 8,72 |
| Conductividad a 25 °C (dS/m) | 0,10 | 4,43 |
| Carbono orgánico (%) | 1,93 | 43,01 |
| Materia orgánica (%) | 3,33 | - |
| Nitrógeno total (%) | 0,25 | 0,52 |
| Capacidad de intercambio catiónico (cmol/kg) | 12,5 | 47,8 |
| Factor de humedad | 1,01 | 1,12 |
| Densidad aparente (g/mL) | 1,22 | - |
| Capacidad de Campo (%) | 8,7 | - |
| Textura | Arenosa | - |

Tabla 5.- Metales pesados en suelo y biosólido.

| Metal (mg/kg) | Suelo Chicauma Concentración (mg/kg) | Biosólido Concentración (mg/kg) |
|----------------------|---|--|
| Cu | 130±4 | 653±17 |
| Zn | 111±8 | 1546±48 |
| Pb | 20,9±0,6 | 45±2 |
| Ni | 33,5±0,2 | 85±4 |
| Cr | 35,5±0,5 | 243±7 |
| Cd | n.d | 2,68±0,06 |

Tabla 6.-Disruptores endocrinos en biosólido.

| Disruptor Endocrino (mg/kg) | Biosólido |
|------------------------------------|------------------|
| BPA | 13±3 |
| EE2 | 0,150±0,006 |
| TCS | 10 |

4.6.1.-Enriquecimiento de biosólido

Se enriquecieron 30 gramos de biosólido por separado, con 52mg/kg de BPA, 40 mg/kg de TCS y 0,6 mg/kg de EE2. Tanto las soluciones de BPA como TCS se prepararon con 20 mL de acetona, mientras que la solución de EE2 se preparó en 20 mL de metanol. Estas se añadieron al biosólido en un balón de 250 mL. Las mezclas se homogeneizaron por agitación durante 24 horas a temperatura ambiente y se cubrieron con una lámina de aluminio para evitar la fotodegradación de los compuestos

(**Figura 8**). Por otro lado, se prepararon mezclas del biosólido solo con los solventes (20 mL de acetona y 20 mL de metanol), las cuales se homogeneizaron en las mismas condiciones descritas previamente.



Figura 8.- Montaje de enriquecimiento de biosólido en un rotavapor.

4.7.- Ensayo de germinación de semillas de lechuga

4.7.1.-Preparación de suelo

En bolsas de polietileno se prepararon, en triplicado, mezclas de 20 gramos conformadas por suelo de la serie Chicauma a un 70% de humedad de campo y biosólido enriquecido en las cantidades necesarias para obtener una tasa de aplicación de 90Mg/ha (19,2 g de suelo y 0,8 g de biosólido). Por otro lado se preparó, en triplicado, una mezcla de suelo con biosólido sin enriquecer como blanco. Estas mezclas se pusieron en una incubadora por 7 días a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ en oscuridad.

4.7.2.-Germinación de semillas de lechuga

Para cada mezcla preparada en el punto anterior se prepararon placas de Petri de 100 mm de diámetro con un disco de papel filtro Whatman™ N°1 de 90 mm de diámetro, el cual se humedeció con 5 mL de un extracto 1:10 w/v preparado con las mezclas descritas previamente y agua destilada. En cada una de las placas se posicionaron 10 semillas de lechuga (IMPORAGRO®). Cada placa se selló con Parafilm® y son puestas en bolsas de polietileno para evitar pérdida de humedad. Estas se dejaron incubando por 5 días a 22±2°C en una incubadora, en oscuridad. Como testigo, se utilizó agua destilada para proceder con el ensayo de germinación.

4.7.3.-Mediciones del ensayo de germinación

Una vez concluido el período de incubación de las semillas de lechuga, se procedió a contar la cantidad de semillas que germinaron y, con ayuda de una hoja de papel milimetrado, se midió la longitud de la radícula y el hipocotilo de cada plántula. Utilizando los datos obtenidos de cada tratamiento y del testigo, se procede a calcular un índice de germinación de acuerdo a la ecuación:

$$\mathbf{IG = \frac{G * L}{G_t * L_t} * 100}$$

En donde IG es el índice de germinación, G y G_t son el promedio de semillas que germinan en la condición de ensayo y el testigo, respectivamente, y L y L_t son el promedio de la longitud de la raíz de las plántulas de lechuga en la condición de ensayo y el testigo, respectivamente [Castillo, 2004].

4.8.-Ensayo de toxicidad aguda en lombrices y LC₅₀ de biosólido en lombrices

4.8.1.-Aclimatación de lombrices

El sustrato utilizado para la aclimatación de las lombrices correspondió al suelo Chicauma. Se prepararon 2 recipientes de vidrio de 11,5 cm de profundidad con 3.177,97 g y 3.221,99 g de sustrato, los cuales se humedecieron con agua destilada hasta un 70% de humedad de campo y cubiertos con una alusa plástica perforada. Estos recipientes se incubaron a temperatura ambiente y se expusieron a períodos de 12 horas de luz/oscuridad por 14 días, con el fin de controlar el pH y temperatura del sustrato.

Posteriormente se añadieron 200 lombrices a cada recipiente. Para su alimentación, se usaron pellets de alfalfa deshidratada (**Figura 9**), la cual se preparó con agua destilada y fue incubada por una semana antes de su aplicación al sustrato. Por otro lado, se preparó un suplemento correspondiente a restos de materia vegetal (cáscaras de papa y zanahoria, **Figura 9**), los cuales son cocinados y “añejados” por una

semana antes de su aplicación al sustrato, esto con el fin de mantener la salud de las lombrices. Ambas preparaciones se añadieron al sustrato una vez a la semana, luego de la remoción de los restos de alimento que hubiesen quedado de la semana anterior.

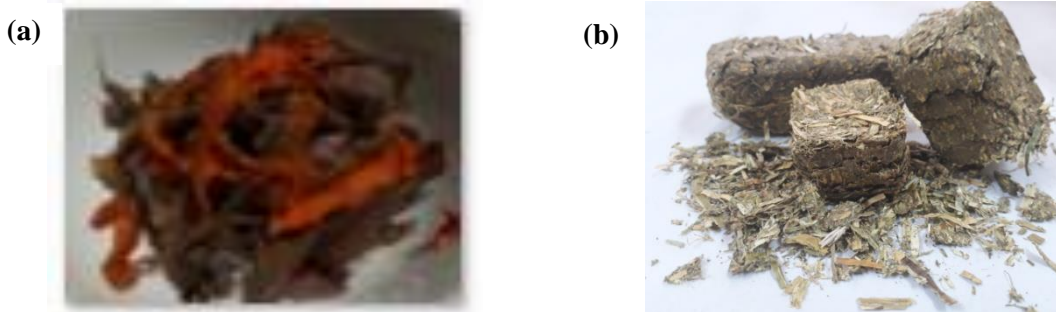


Figura 9.- Muestras de alimento para lombrices antes de su preparación.
Cáscaras secas de papa y zanahoria (a), pellets de alfalfa deshidratada (b)

4.8.2.-Concentración letal media (LC₅₀) de la tasa de aplicación de biosólido

Se escogieron 5 valores de tasa de aplicación de biosólido, correspondientes a 15Mg/ha, 30Mg/ha, 45Mg/ha, 60Mg/ha y 90Mg/ha. Se prepararon mezclas con las cantidades mencionadas en la **Tabla 7**, en frascos de vidrio de 500 mL, los cuales son cubiertos con Parafilm® sujeto a un elástico conservándose las mismas condiciones de período luz/oscuridad y temperatura que los recipientes de aclimatación de lombrices por un día, previo a la adición de lombrices.

Tabla 7.- Composición de las mezclas suelo/biosólido de acuerdo a la tasa de aplicación.

| | Tasa de aplicación de biosólido | | | | | |
|----------------------|---------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | 0Mg/ha | 15Mg/ha | 30Mg/ha | 45Mg/ha | 60Mg/ha | 90Mg/ha |
| Suelo (g) | 387,45 | 384,77 | 382,14 | 379,53 | 376,96 | 371,93 |
| Biosólido (g) | ----- | 2,65 | 5,26 | 7,84 | 10,38 | 15,36 |

4.8.3.-Ensayos de toxicidad aguda de lombrices en presencia de disruptores endocrinos

Como control, se prepararon frascos de mezcla de suelo con biosólido en las mismas cantidades correspondientes a una tasa de aplicación de 30Mg/ha mencionadas en la tabla 7. Del mismo modo, se prepararon frascos con mezclas de suelo y biosólido enriquecido con BPA, EE2 y TCS por separado, y biosólido tratado solo con los solventes en las mismas cantidades que la condición control.

4.8.4.-Selección del estado y del número de individuos por tratamiento y número de réplicas

En todos los ensayos con lombrices se escogieron individuos sin su clitelo desarrollado, y cuyo peso se encontraba entre los 300 mg.

Para determinar la concentración letal media se tienen en consideración los parámetros sugeridos y avalados por el Environmental Technology Centre de Canadá [Environmental Technology Centre, 2004], correspondiente a un triplicado de cada condición de ensayo, en los cuales se adicionan seis lombrices.

En cuanto al ensayo de toxicidad, se consideraron los siguientes parámetros: un nivel de confianza α de 0,05 y una potencia ($1-\beta$) de 0,80. Se compararon 4 condiciones de ensayo, correspondientes al suelo, suelo más biosólido, suelo más biosólido enriquecido con BPA, EE2 o TCS y suelo más biosólido tratado con el solvente correspondiente; teniendo de este modo 4 grupos. Si se considera que el valor f de 0,40 de Cohen equivale a 0,08 cuando se comparan medidas, se tiene que se requieren 18 individuos por grupo. Estos 18 individuos se dividieron en 3, teniendo así 6 individuos por réplica de ensayo.

4.8.5.-Mediciones de ensayos con lombrices

Tanto para la determinación de la LC_{50} como para el ensayo de toxicidad, el tiempo de ensayo comprendió 14 días, con mediciones al inicio, al día 7 y al día 14. Éstas comprendieron la determinación del peso húmedo de las lombrices (tras ser lavadas con agua destilada) y el pH del sustrato [Sadzawka et al., 2006], además de la medición diaria de la temperatura. Por otro lado, se registró el comportamiento, características y ubicación en el frasco (si es posible de ver) de las lombrices en todos los días de ensayo. El régimen de luz/oscuridad fue el mismo que para la aclimatación. Las lombrices en los medios de ensayo no fueron alimentadas durante el experimento, pero sí se adicionó agua destilada con tal de mantener húmedo el sustrato. Una vez concluidos los ensayos, las lombrices fueron almacenadas en placas de Petri y congeladas a -20°C .

4.9.-Cromatografía GC-MS

El modo de ionización en espectrometría de masas es por impacto electrónico (EI). Como gas portador fue utilizado helio con un 99,999% de pureza a un flujo de 1 mL/min y una columna capilar marca Restek RTX-5MS 30 m, 0,32 mm de diámetro interno (ID), 0,25 μm de espesor de fase estacionaria (df), con un máximo de temperatura de 350°C.

El programa de temperatura comenzó a 75°C por 1 min, el cual fue incrementado a 150°C a una razón de 20°C por minuto durante 5 minutos, seguido de un incremento a 300°C a una razón de 10°C por minuto durante 5 minutos con un *solvent delay* de 7 min.

4.9.1.-Identificación mediante GC-MS

Se realizó un barrido completo, con modalidad SCAN, de masas en un rango de 50 a 550 m/z. Luego se realizó un monitoreo selectivo de iones (SIM), para ello se escogieron dos iones representativos y de alta abundancia para cada analito. El ión de mayor abundancia se utilizó para cuantificar y el segundo para confirmar la presencia del analito (ión cualificador). Además, fue necesario confirmar el analito mediante la razón de la abundancia de ambos iones en la muestra, la cual debe corresponder al mismo valor que se ha determinado con el estándar correspondiente del DE ($\pm 20\%$), ya que de lo contrario no se puede confirmar la presencia del analito en la muestra. Los iones (m/z) y tiempos de retención de cada analito se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8.-Tiempos de retención y masas de analitos sililados.

| Analito | Tiempo de retención (min) | Ión Cuantificador m/z | Ión Cualificador m/z |
|----------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| TCS | 19,02 | 345 | 347 |
| BPA | 19,63 | 357 | 358 |
| PCB | 20,07 | 292 | 290 |
| EE2 | 24,53 | 425 | 440 |

4.9.2.-Preparación de muestras para GC-MS

Las lombrices fueron liofilizadas hasta alcanzar una estabilización de su peso, correspondiente a una pérdida de ~ 75% de su peso húmedo. Éstas fueron trituradas en un mortero de ágata.

Para la determinación de BPA, EE2 y TCS en la muestra, ésta fue purificada mediante el método de dispersión de matriz en fase sólida [Sánchez-Brunete et al., 2010]. Fueron preparados cartuchos Oasis HLB de 3cc sin su fase sorbente con 100 mg de Florisil. Por otro lado se preparó una mezcla de 100 mg de muestra, 100 mg de C18 y 50 mg de Na₂SO₄, la cual es empacada en el cartucho. Estos son montados en un sistema manifold, donde los analitos fueron eluidos con 3 mL de acetonitrilo y recolectados en viales ámbar de 10 mL. Posteriormente fueron llevados a sequedad bajo una corriente de nitrógeno y reconstituídos en 3 mL de acetato de etilo.

4.9.3.-Proceso de derivatización

Los analitos (tanto estándar como muestra) deben ser derivatizados con el fin de generar moléculas volátiles para medir en el sistema GC-MS. Para ello se utilizó el protocolo optimizado por Arismendi et al., 2019. Tanto para las preparaciones de multiestándar como de eluido de muestra se tomó una alícuota de 170 μL en un vial de 2 mL, la cual se llevó a sequedad bajo una corriente de gas nitrógeno. Luego se añadieron 50 μL de piridina y 70 μL de derivatizante N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA), la mezcla fue agitada en vórtex y luego se llevó a 80 °C por 35 min. Una vez completada la derivatización se dejó enfriar a temperatura ambiente, se añadieron 50 μL de PCB 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ como estándar interno y se agitó en vórtex. Así, la solución derivatizada fue analizada en el GC-MS. Se inyectaron 2 μL de esta solución en equipo de GC utilizando un inyector con modalidad splitless a 250°C.

4.10.-Análisis de datos y estadística

GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) fue utilizado para el análisis estadístico de los datos obtenidos de los ensayos de germinación de semillas de lechuga, el ensayo de toxicidad en lombrices y la acumulación de DE. Por otro lado fue utilizado para el cálculo de LC50 de la tasa de aplicación de biosólido y la construcción de las curvas de calibración para la cuantificación de DE en lombrices.

5.- Resultados y Discusión

5.1.-Efectos de BPA, EE2 y TCS en la germinación de semillas de lechuga (*L. sativa*)

El ensayo de germinación de semillas de lechuga permite, por medio del cálculo de un índice de germinación (IG), determinar si una “condición” es apta o no (fitotoxicidad) para la germinación [Celis et al., 2006]. Como condición testigo se ha utilizado agua destilada (AD), el control negativo corresponde a suelo tratado con biosólido (S+B), y los tratamientos corresponden a la adición de los DE (S+B*BPA, S+B*TCS y S+B*EE2) y de los solventes (S+B*Acetona y S+B*Metanol).

Luego de 5 días de incubación, las semillas que germinaron fueron contabilizadas y se midió su raíz y su hipocotilo. En cuanto al número de semillas que germinan (**Figura 10**), la adición de BPA al biosólido produce una disminución significativa en comparación con los tratamientos donde se ha adicionado TCS, EE2 y acetona al biosólido, y con el suelo tratado con biosólido ($p < 0,05$).

En cuanto a la longitud de las radículas (**Figura 11**) y del hipocotilo (**Figura 12**), no hay diferencias significativas en comparación con el control de suelo tratado con biosólido ni entre los distintos tratamientos del biosólido con DE y solventes. Esto último estaría indicando que la capacidad fitotóxica del BPA podría estar afectando el proceso de germinación.

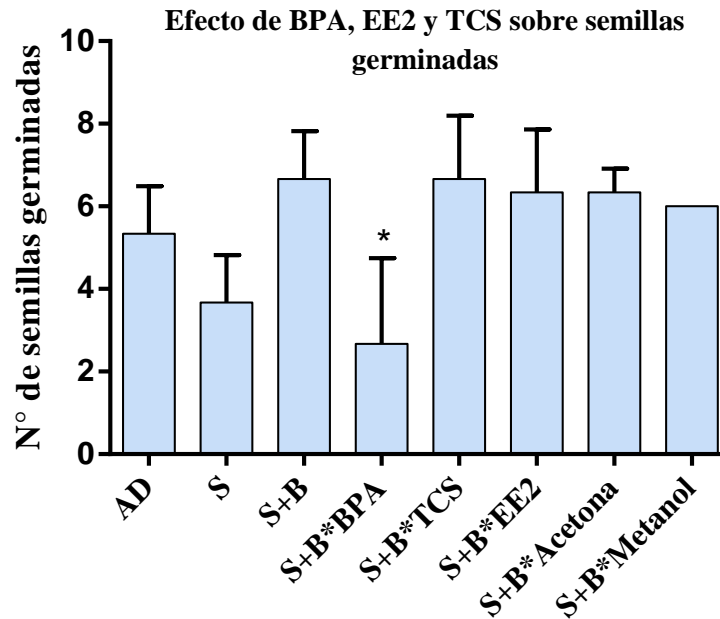


Figura 10.- Efectos de BPA, EE2 y TCS sobre el número de semillas que germinan. Cada tratamiento fue realizado en triplicado con 10 semillas. AD (agua destilada), S (suelo), S+B (suelo + biosólido [90Mg/ha]), B* (biosólido enriquecido con compuesto correspondiente). BPA [52mg/kg], TCS [40mg/kg], EE2 [0,6mg/kg]. * indica diferencia significativa con S+B, S+B*TCS, S+B*EE2 y S+B*Acetona (test de Tukey, $p < 0,01$). Las barras indican desviación estándar (SD).

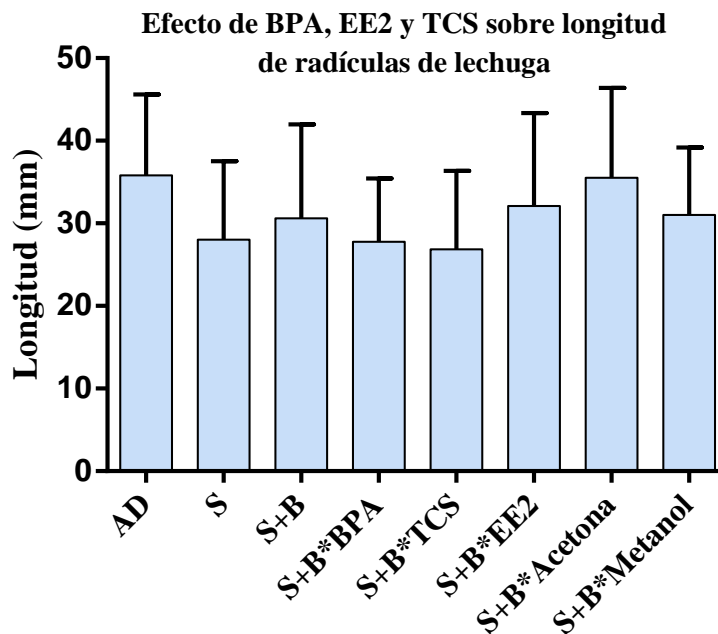


Figura 11.- Efectos de BPA, EE2 y TCS sobre la longitud de las radículas de lechuga. Cada tratamiento fue realizado en triplicado con 10 semillas. AD (agua destilada), S (suelo), S+B (suelo + biosólido [90Mg/ha]), B* (biosólido enriquecido con compuesto correspondiente). BPA [52mg/kg], TCS [40mg/kg], EE2 [0,6mg/kg]. Las barras indican desviación estándar (SD). (test de Tukey, $p > 0,05$).

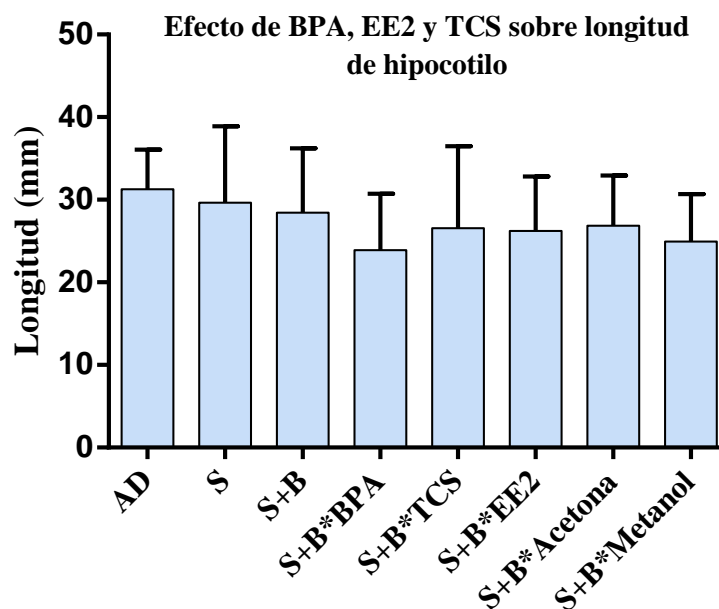


Figura 12.- Efectos de BPA, EE2 y TCS sobre la longitud de hipocotilo de lechuga.

Cada tratamiento fue realizado en triplicado con 10 semillas. AD (agua destilada), S (suelo), S+B (suelo + biosólido [90 Mg/ha]), B* (biosólido enriquecido con compuesto correspondiente). BPA [52mg/kg], TCS [40mg/kg], EE2 [0,6mg/kg]. Las barras indican desviación estándar (SD). (test de Tukey, $p > 0,05$).

Con los datos obtenidos se calculó el IG para cada condición, los cuales se muestran en la **Figura 13**. El IG posee dos umbrales: el de 80% y el de 50%. Si bajo una condición de germinación el IG se encuentra sobre el 80% corresponde a una situación adecuada para ello. Por otro lado, si esta condición de germinación comprende un IG bajo el 50% indicaría capacidad fitotóxica. Si el IG se encuentra en valores intermedios (entre 50 y 80%) indicaría una condición no óptima para la germinación [Celis et al., 2006].

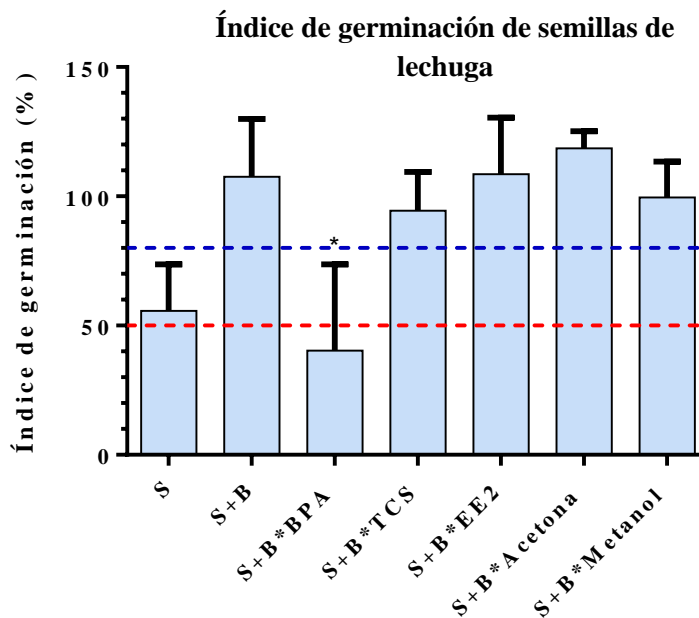


Figura 13.- Índice de germinación de semillas de lechuga.

Cada tratamiento fue realizado en triplicado, comparando cada réplica con un promedio de la condición testigo. AD (agua destilada), S (suelo), S+B (suelo + biosólido [90 Mg/ha]), B* (biosólido enriquecido con compuesto correspondiente). BPA [52mg/kg], TCS [40mg/kg], EE2 [0,6mg/kg]. Las barras indican desviación estándar (SD). * indica diferencia significativa (test de Sidak, $p < 0,01$).

Para efectos de los resultados obtenidos, el enriquecimiento del biosólido con BPA entrega un IG de $40 \pm 27\%$, lo cual está indicando que es una condición fitotóxica para la germinación. En vista del IG obtenido, y los resultados expuestos en la **Tabla suplementaria 1**, el efecto del BPA estaría afectando solo el proceso germinativo. Este proceso depende principalmente del balance entre las fitohormonas ABA y GA [Nonogaki, 2006], las cuales actúan como inhibidor y promotor del potencial de crecimiento, respectivamente. La germinación requiere de la imbibición de la semilla (ingreso de agua a la semilla), lo que promueve la síntesis de la GA 3 β -hidroxilasa, cuya expresión se ve inhibida por la

proteína RGL2 (perteneciente a la familia de proteínas DELLA, represores de la germinación). Ésta enzima es la encargada de la síntesis de GA, lo que promueve la síntesis de la proteína SLY1, perteneciente a la familia de las SCF E3 ubiquitin-ligasas, involucrada en la degradación de proteínas por la vía del proteosoma 26S. De este modo, SLY1 puede ubiquitinar a RGL2 y por ende ser degradada por el proteosoma 26S, aumentando así el potencial de crecimiento [Nonogaki, 2006]. Por su parte, ABA impone una restricción sobre el potencial de crecimiento, y su síntesis se ve promovida por RGL2.

Dado este mecanismo, es posible que el BPA esté interfiriendo la acción del GA, o, lo que parece más probable, actúe como ABA dado al parecido entre sus estructuras (**Figura 1** y **Figura 5**). Un estudio mostró los efectos de BPA en plantas crecidas de manera hidropónica, entre ellas lechuga. En este estudio se germinaron semillas hasta los 6 días, con una posterior incubación hasta los 21 días, exponiéndolas a concentraciones de 10 y 50 mg/L de BPA, resultando en la totalidad de semillas germinadas [Ferrara et al., 2006]. Sin embargo, tanto la longitud de la radícula como del hipocotilo se vieron alteradas, esto aparentemente causado por la capacidad del BPA de inhibir la elongación celular y/o la división celular [Ferrara et al., 2006]. Este resultado implica que, si el ensayo hubiese progresado a más días, las semillas hubiesen germinado en su totalidad, pero con diferencias en la elongación, lo que mantendría un valor bajo de IG.

Otro resultado a considerar es el del suelo sin tratar, ya que su IG posee un valor intermedio ($56 \pm 14\%$), lo cual estaría confirmando su condición como suelo degradado, siendo éste no óptimo para la germinación de las semillas de lechuga. El resto de tratamientos poseen IG que bordean, e incluso pasan del 100%. Es probable que, dada la solubilidad en agua del BPA (120 mg/L), éste haya quedado en mayor proporción en solución que el resto de compuestos al momento de realizar el ensayo, lo que permitiría mostrar efectos más directos de este compuesto en la germinación.

5.2.- Efecto de la aplicación de biosólidos en suelo, utilizando lombrices (*E. fetida*) como indicador de toxicidad.

Con el fin de utilizar las mismas tasas de aplicación de biosólido en suelo, tanto para el ensayo de germinación como para el de lombrices, se procedió con los pasos correspondientes. Sin embargo, las lombrices expuestas a la tasa de aplicación de 90 Mg/ha mueren antes del séptimo día de ensayo. Es por esto que, como estudio preliminar se determinó la LC_{50} de la tasa de aplicación.

La **Figura 14**, muestra la regresión lineal planteada entre las tasas de aplicación que muestran el mínimo y máximo efecto esperado (letalidad), por lo que tasas de aplicación inferiores a 40Mg/ha comprenden una situación no letal.

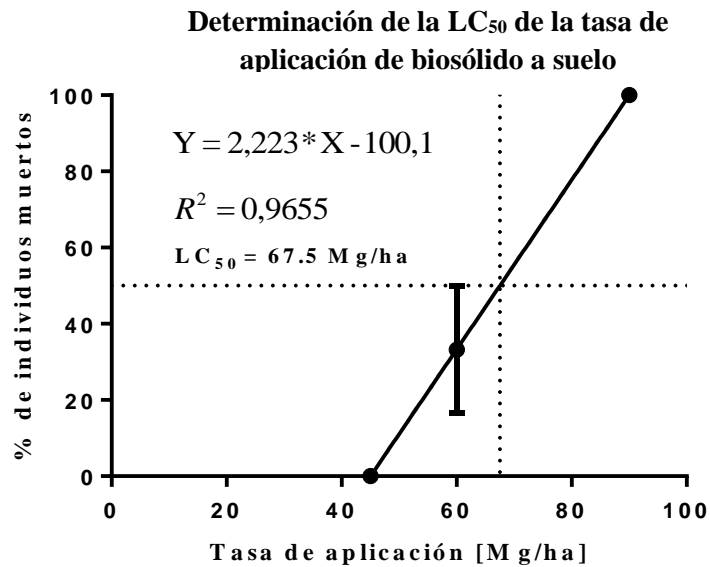


Figura 14.- Determinación de la LC₅₀ de la tasa de aplicación de biosólido en lombrices
 Se utilizan los valores de mortalidad en las tasas de aplicación de 45, 60 y 90 Mg/ha. Cada réplica (3) contiene 6 lombrices. $Y = 2,223 * X - 100,1$; $R^2 = 0,9655$. LC₅₀ calculada para el día 14 de ensayo de toxicidad de biosólido

Otros estudios han visto el efecto de la aplicación de lodos o biosólidos en suelo en cuanto a la letalidad que pudiesen producir en lombrices. Un estudio obtuvo que con 30% y 70% de aplicación de lodos en suelo no hay mortalidad [Babić et al., 2016], mientras que otro estudio mostró que la letalidad del biosólido utilizado, no solo depende de la aplicación, sino que también del tiempo de incubación de la mezcla, obteniendo mayor mortalidad a más tiempo de incubación [Kinney et al., 2012]. Estos antecedentes dejan en claro que los efectos obtenidos por las tasas de aplicación dependen de la composición del biosólido y suelo, y de la incubación del sustrato previo a los ensayos.

Es por lo anterior que, para poder determinar la tasa de aplicación adecuada, se compararon las variaciones en el peso de las lombrices en los días 7 y 14 de ensayo (**Figura 15**).

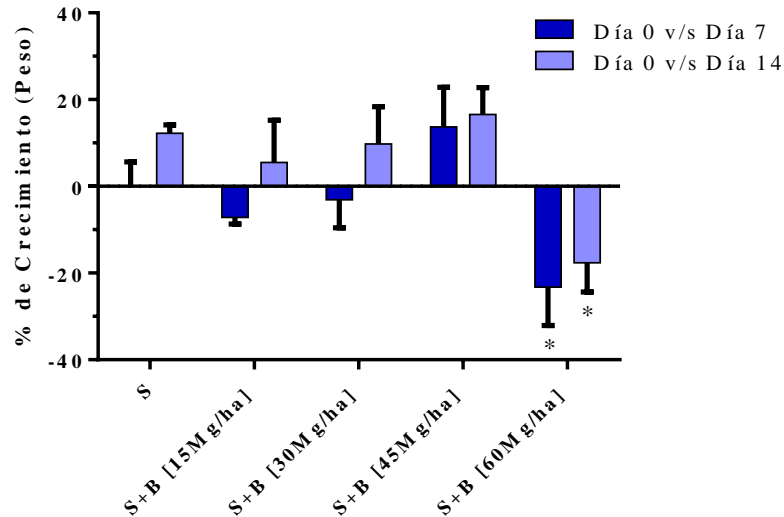


Figura 15.- Efecto de la tasa de aplicación de biosólido en la variación del peso de lombrices.

Cada réplica (3) contiene 6 lombrices. S (suelo), S+B (suelo + biosólido). * indica diferencia significativa con el resto de tratamientos para el tiempo respectivo de la medición (test de Tukey, $p < 0,05$).

Se observó que en el día 7 del ensayo se produce una disminución del peso de las lombrices en los suelos tratados con 15 y 30 Mg/ha, la cual fue revertida el día 14 del ensayo. Pero esta disminución y aumento en el peso, no fue significativa en comparación a las lombrices del suelo sin tratar. Para la tasa de 45 Mg/ha se produjo un aumento en el peso para ambas mediciones, pero que no son significativas respecto al control. Finalmente, para la tasa de 60 Mg/ha se produjo una disminución significativa en el peso de las lombrices en ambos períodos de medición en comparación con el resto de tratamientos, lo que puede deberse al

efecto negativo del alto contenido de materia orgánica que aporta el biosólido al suelo, ya que no solo hay disminución de peso, sino que también algunas lombrices mueren bajo esta condición. Otros estudios han mostrado un efecto similar en lombrices expuestas a BPA en distintas concentraciones, en la que también se apreció una disminución del peso de lombrices [Verdú et al., 2018].

Otro efecto encontrado, fue el cambio de pH del sustrato durante el ensayo (**Figura 16**). A pesar de que se produce una disminución significativa de pH en los distintos tratamientos en el tiempo, éstos se mantuvieron en el rango de pH adecuado para las lombrices (pH 4 – 8) [Laverack, 1963], a excepción de la de 90 Mg/ha, la cual alcanzó pH 8,1 a los siete días, indicando que la condición del suelo no fue la óptima para las lombrices. Sin embargo, las lombrices fueron encontradas muertas desde antes del día 7, por lo que no se puede atribuir solamente al efecto de cambio en el pH del sustrato.

De las tasas aplicadas, el valor máximo en la que no se produce un efecto corresponde a la de 45 Mg/ha. Debido a que este valor es considerado como punto de partida para la LC_{50} , se debe asegurar que la tasa no produzca un efecto considerable, por lo que se escoge la de 30 Mg/ha para los ensayos de toxicidad. Esto último por ser una tasa en que la variación del crecimiento de las lombrices no fue significativa y porque de acuerdo al Decreto 4 correspondiente al Reglamento para el Manejo

de lodos [Decreto 4, 28 de Octubre de 2009], la tasa máxima de aplicación para suelos degradados es de 90 Mg/ha, la que corresponde a la tasa en que las lombrices mueren. Por otro lado, la tasa de aplicación máxima para suelos degradados es de 30 Mg/ha, siendo esta la mejor opción para continuar con el estudio.

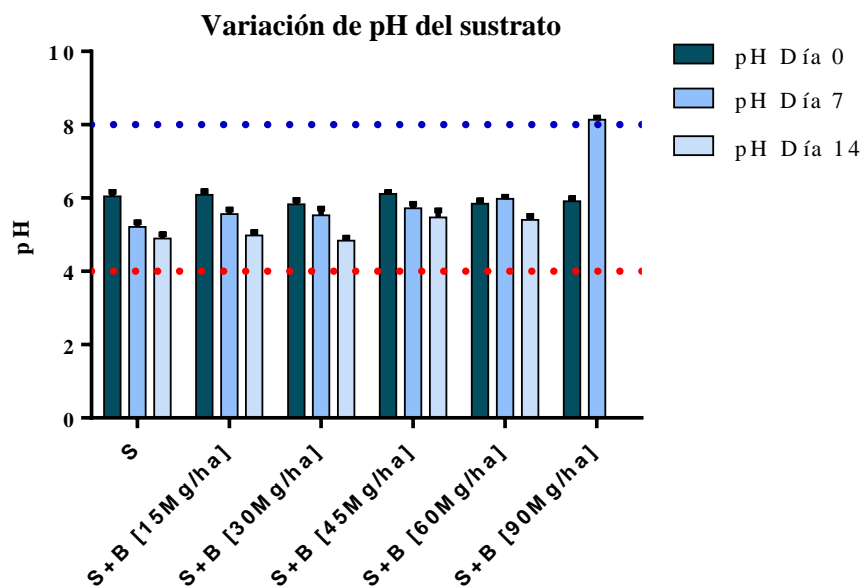


Figura 16.- Efecto de la tasa de aplicación de biosólido en el pH del sustrato.

Cada réplica (3) contiene 6 lombrices. S (suelo), S+B (suelo + biosólido). La línea azul y rojo determinan los límites máximo y mínimo, respectivamente, de pH adecuados para el sustrato que habitan las lombrices.

5.3.- Efectos de BPA, EE2 y TCS en lombrices (*E. fetida*) presentes en el biosólido aplicado al suelo

Ninguna de las lombrices utilizadas en los distintos tratamientos murió durante el período de ensayo, lo que indica que el BPA, EE2 y TCS y los solventes utilizados, no son letales en las concentraciones utilizadas.

Los resultados de la medición de pH del sustrato para cada condición muestran que, a pesar de que disminuye en el transcurso del ensayo, estos se encuentran en el rango óptimo para las lombrices (**Figura 17**).

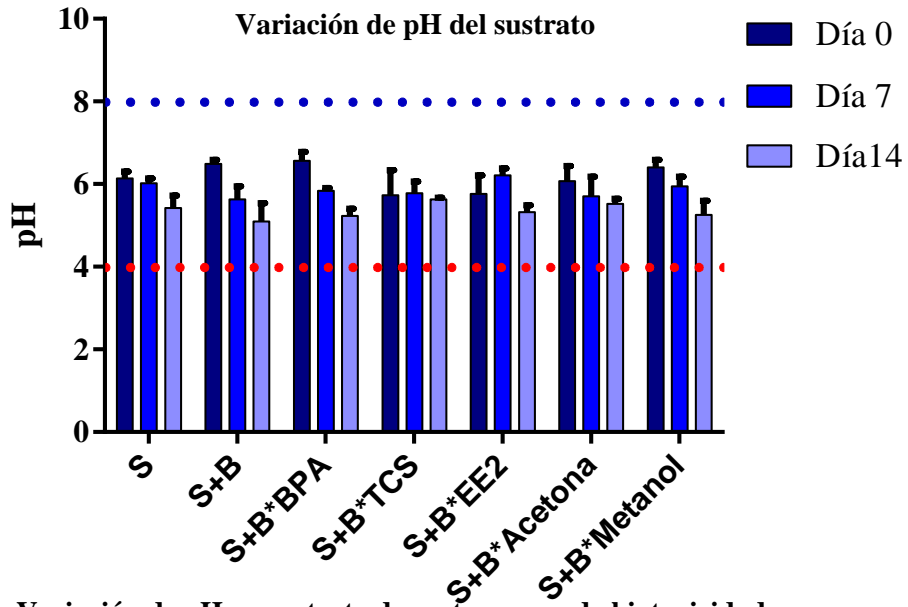


Figura 17.-Variación de pH en sustrato durante ensayo de biotoxicidad.

Cada réplica (3) contiene 6 lombrices. S (suelo), S+B (suelo + biosólido [30 Mg/ha]), B* (biosólido enriquecido con compuesto correspondiente). BPA [52mg/kg], TCS [40mg/kg], EE2 [0,6mg/kg]. La línea azul y rojo determinan los límites máximo y mínimo, respectivamente, de pH adecuados para el sustrato que habitan las lombrices.

Es importante destacar que para el tratamiento con adición de TCS, no se produce una variación significativa en el pH a lo largo del ensayo (test de Tukey, $p > 0,05$), mientras que en el tratamiento con suelo (S) no se aprecian diferencias entre los días 0 y 7, y con adición de acetona no se aprecian diferencias entre los días 7 y 14.

En cuanto a la variación en el peso de las lombrices, no se registran diferencias significativas entre los tratamientos al séptimo día del ensayo (**Tabla Suplementaria 2, Figura 18**). Sin embargo, a los catorce días se obtienen diferentes resultados entre los tratamientos. La adición de BPA en el biosólido, causó el mayor aumento en el peso de las lombrices, siendo éste del 93,7%. En un estudio similar se utilizaron distintas concentraciones de BPA (1, 10, 100, 1000 y 2000 mg/kg), observándose una disminución del peso, con el incremento de la concentración en el mismo período [Verdú et al., 2018]. Estas diferencias entre los resultados se pueden deber a las distintas preparaciones para cada ensayo, ya que este grupo utilizó un suelo artificial como base para el sustrato, y como enmienda utilizaron un estiércol enriquecido con BPA en solución de etanol/agua, por lo que las diferencias entre el contenido de materia orgánica y la fracción biodisponible de BPA son determinantes en el resultado.

A pesar de que la adición de BPA mostró el mayor aumento en el peso, esta diferencia no fue significativa. En cuanto a la adición de TCS, ésta no alcanzó a ser significativa en el aumento de peso de las lombrices, pero fue la de mayor variabilidad. Esto puede estar relacionado al estado de maduración de las lombrices. Las lombrices seleccionadas fueron aquellas que no poseían su clitelo completamente desarrollado y cuyo peso se encontraba entre los 300 mg. El problema fue que, como cada individuo es único, algunas lombrices pueden estar más cercanas a su

edad de madurez o aún continuar en una etapa juvenil. Esto último es importante, ya que se ha visto que el TCS posee efectos distintos que dependen del estado de desarrollo de la lombriz [Amorim et al., 2010].

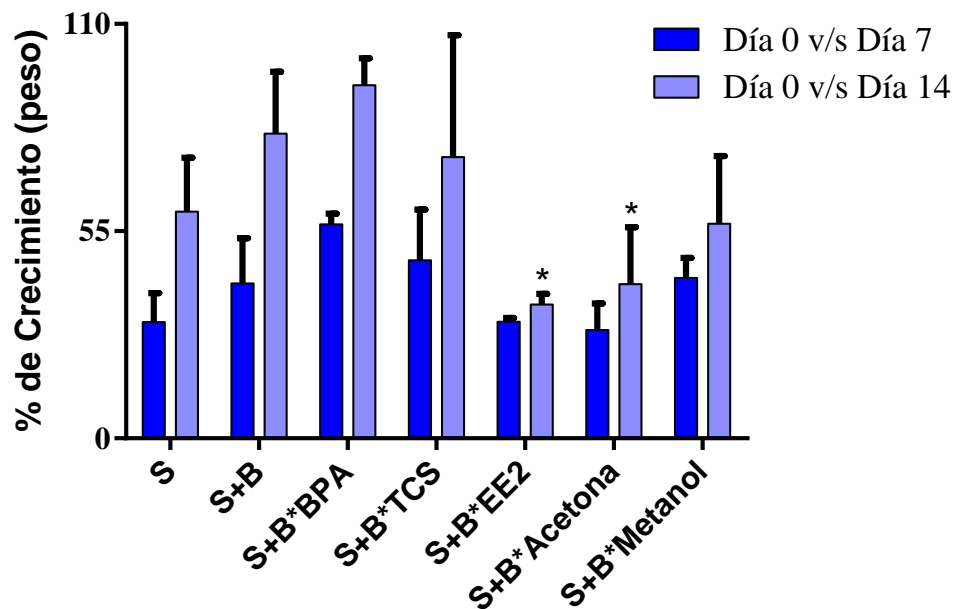


Figura 18.-Variación en el peso de lombrices.

Cada réplica (3) contiene 6 lombrices. S (suelo), S+B (suelo + biosólido [30 Mg/ha]), B* (biosólido enriquecido con compuesto correspondiente). BPA [52mg/kg], TCS [40mg/kg], EE2 [0.6mg/kg]. * indica diferencia significativa con S+B, S+B*BPA y S+B*TCS (test de Tukey, $p < 0.05$).

Los resultados del tratamiento con adición de EE2 mostraron un efecto negativo en el aumento de peso de las lombrices, ya que éstas mantienen un peso similar en comparación al día 7, el cual resultó ser significativo al compararlo con el blanco de suelo tratado con biosólido. No hay información respecto de los efectos que pueda causar el EE2 en

lombrices, ya que se ha visto que este no se acumula, a diferencia del 17β -estradiol (E2) [Markman et al., 2007].

Finalmente, la adición de los solventes al biosólido se realizó con el fin de verificar que ellos no fueran los causantes de los efectos que pudiesen mostrar los disruptores, o que los fuesen a enmascarar. La adición de metanol no mostró una alteración en el peso de las lombrices en comparación con el control de suelo tratado con biosólido. Sin embargo, la adición de acetona mostró un efecto similar al del EE2, en el que el aumento de peso no es significativo entre el día 7 y 14. Este resultado fue importante, ya que puede estar afectando el resultado obtenido para BPA y TCS, por lo que se debería realizar este ensayo con otro solvente en el que se pueda preparar el BPA y TCS y no provoque algún efecto sobre las lombrices. No hay estudios que muestren efectos de la acetona en lombrices, así como también no está catalogada dentro de la lista de posibles disruptores endocrinos de la USEPA, por lo que se debe tener en vista y consideración su uso como solvente.

5.4.- Bioacumulación de BPA, TCS y EE2 en lombrices

La **Figura 19** muestra los tiempos de retención obtenidos del cromatograma correspondiente al multiestándar utilizado para identificar y cuantificar los analitos en las muestras de lombriz.

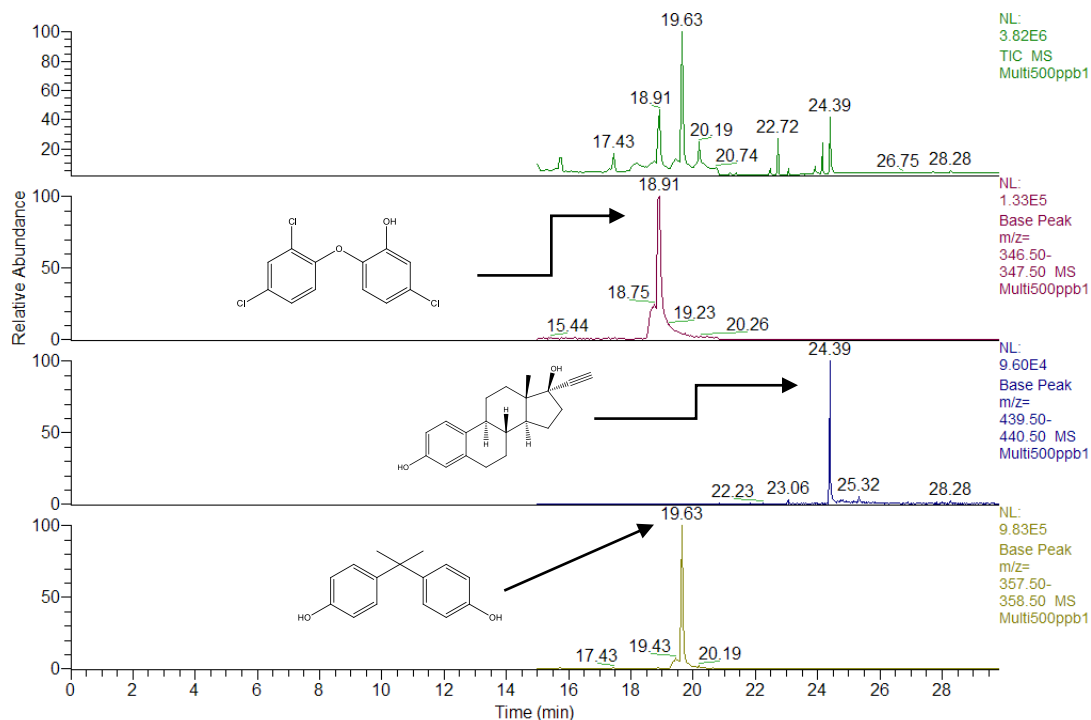


Figura 19.-Cromatograma GC correspondiente a solución multiestandar de TCS, EE2 y BPA. En verde: cromatograma completo de la solución (TIC). En rojo: ión identificador de TCS ($m/z = 347$) y $t_r = 18,91$ min. En azul: ión identificador de EE2 ($m/z = 440$) y $t_r = 24,39$ min. En amarillo, ión identificador de BPA ($m/z = 358$) y $t_r = 19,63$ min.

Debido a la cantidad de condiciones y réplicas utilizadas, se prepararon dos curvas de calibración con el fin de verificar la sensibilidad del equipo de GC durante el análisis de las muestras. Como estas curvas presentaron diferencias en las señales obtenidas, se procedió a comparar las pendientes de las respectivas curvas, lo cual mostró que no hay diferencia significativa entre ellas. Sin embargo, el análisis sugiere utilizar un promedio de ambas curvas de calibración, con el fin de no sobreestimar o subestimar los valores de concentración al interpolar las muestras. De

este modo se obtienen las curvas de calibración para TCS (**Figura suplementaria 1**), BPA (**Figura suplementaria 2**), y EE2 (**Figura suplementaria 3**).

Posterior al análisis por GC de las muestras de lombriz, se procedió a calcular la concentración estimada de cada analito por peso seco de lombriz para cada tratamiento (**Tabla Suplementaria 3**). En ninguno de los tratamientos se logró detectar EE2 en las muestras de lombriz (**Figuras suplementarias 4-10**). Esto se puede deber a que las lombrices no son capaces de acumular el EE2 debido a su metabolismo o la baja concentración de éste en los tratamientos, o porque las lombrices son capaces de degradar el EE2, impidiendo así que pueda ser detectado. Tanto el BPA como el TCS se pudieron encontrar en lombrices, pero el factor de acumulación dependió del tratamiento seguido.

5.4.1.- Bioacumulación de BPA

En cuanto a BPA, las mayores concentraciones se encontraron en los tratamientos con biosólido y con biosólido enriquecido con BPA, siendo ambas similares (**Figura 20**). Por otro lado, al tratar con biosólido enriquecido con TCS y con metanol se obtienen concentraciones menores a las obtenidas en el control y en la de suelo tratado con biosólido enriquecido con BPA, Al comparar estos resultados con los de otros investigadores se sugiere que, tal como se mencionó anteriormente, la variación en la composición del sustrato otorga resultados diferentes, por

lo que cada estudio cobra relevancia por sí solo. Estudios han mostrado que el BPA, bajo condiciones específicas para un sustrato (Suelo + 3% biosólido, incubado por 8 semanas), se pudo encontrar en lombrices a una concentración de 1700 ng/g [Kinney et al., 2008 y 2012]. También se determinó su factor de bioacumulación para cada sustrato, considerando la concentración teórica presente en cada mezcla. Los resultados presentados en la **Tabla 9** muestran que la bioacumulación de BPA fue mayor a bajas concentraciones, coincidiendo con el control de suelo tratado con biosólido (BAF = 3,1). Esto coincide con resultados expuestos por otro estudio [Kinney et al., 2012], donde no fue detectado BPA en la mezcla de suelo y biosólido incubados por 8 semanas, pero sí se obtuvo un BAF para BPA de 104, validando así su acumulación.

Tabla 9.- Factor de bioacumulación de BPA y TCS en lombrices.

| Tratamientos | Factor de bioacumulación (BAF) | |
|--------------------|--------------------------------|------|
| | BPA | TCS |
| S | n.e. | n.d. |
| S+B | 3,1 | 4,0 |
| S+B*BPA | 0,6 | 22,6 |
| S+B*TCS | 1,0 | 4,6 |
| S+B*EE2 | 1,7 | 7,8 |
| S+B*Metanol | 1,5 | 3,6 |
| S+B*Acetona | 2,6 | 7,5 |

Tratamientos: S (suelo), S+B (suelo + biosólido [30 Mg/ha]), B* (biosólido enriquecido con compuesto correspondiente): BPA [52mg/kg], TCS [40mg/kg], EE2 [0.6mg/kg]. n.e.: no encontrado. n.d.: no determinado.

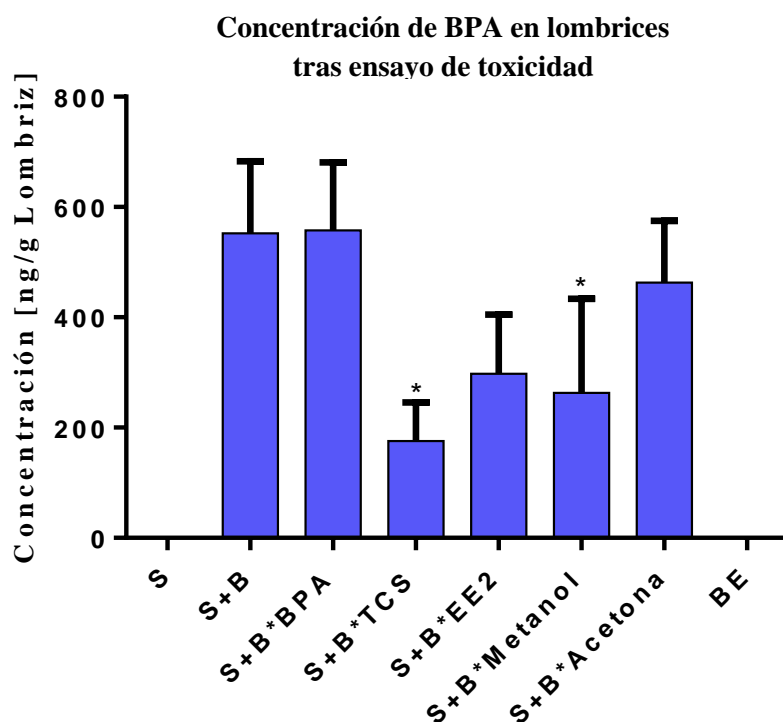


Figura 20.-Concentración de BPA en lombrices tras ensayo de toxicidad.

S (suelo), S+B (suelo + biosólido [30 Mg/ha]), B* (biosólido enriquecido con compuesto correspondiente), BE (blanco de elución). BPA [52mg/kg], TCS [40mg/kg], EE2 [0,6mg/kg]. * indica diferencia significativa con S+B y S+B*BPA (test de Sidak, $p < 0,05$).

Es interesante mencionar que con el tratamiento con acetona, el BPA se acumuló de forma similar al control ($BAF = 2,6$), pero el efecto encontrado en el peso fue negativo.

5.4.2.- Bioacumulación de TCS

El TCS presentó un patrón distinto al del BPA, en donde las mayores concentraciones fueron encontradas en los tratamientos con BPA y TCS, mientras que el resto de tratamientos fueron similares al control (**Tabla Suplementaria 3, Figura 21**).

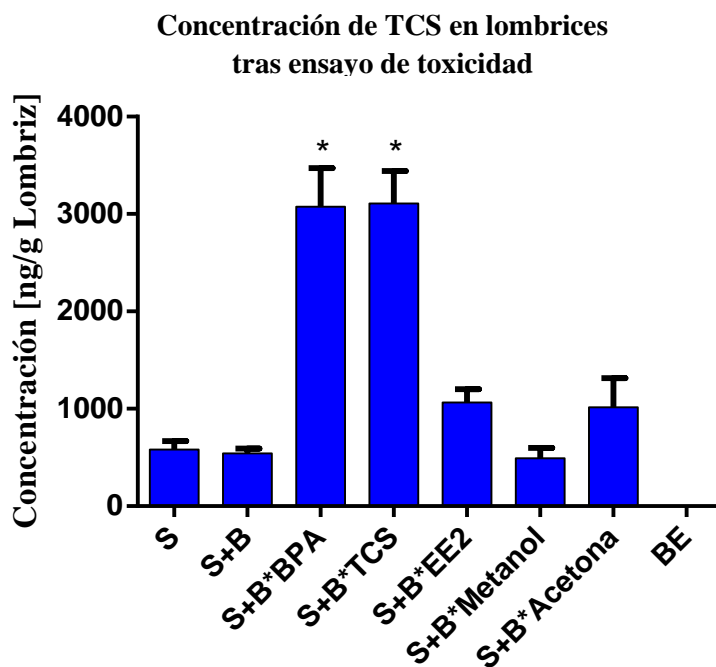


Figura 21.-Concentración de TCS en lombrices tras ensayo de toxicidad.

S (suelo), S+B (suelo + biosólido [30 Mg/ha]), B* (biosólido enriquecido con compuesto correspondiente), BE (blanco de elución). BPA [52mg/kg], TCS [40mg/kg], EE2 [0,6mg/kg]. * indica diferencia significativa con el resto de tratamientos (test de Tukey, $p < 0,05$).

Se ha detectado una concentración basal de TCS presente en las lombrices con suelo sin tratar, lo cual sugiere una posible contaminación en este tratamiento. Sin embargo, no es suficiente para provocar alguna alteración en el resultado, ya que no se ve un efecto en la concentración de BPA similar al del suelo tratado con TCS. Esto permitiría inferir que el TCS desfavorece la acumulación de BPA, mientras que el BPA favorece la acumulación de TCS (**Tabla 9**).

Otros ensayos han mostrado la presencia de TCS [Kinney et al., 2008 y 2012; Macherius et al., 2014] en lombrices, con valores entre los 15,7 a los 4200 ng/g, mostrando así que los resultados encontrados en este

trabajo, se encuentran en dicho rango de concentración. Por otro lado, los BAF encontrados en este trabajo son comparables con los mostrados en dichas publicaciones (BAF = 2,7 – 43), indicando de este modo que el TCS se bioacumula en las lombrices en todos los tratamientos del ensayo.

6.- Conclusión

Los resultados encontrados muestran la capacidad fitotóxica que posee el BPA en la germinación de semillas de lechuga, asociado aparentemente a la inhibición de la promoción de la elongación en el desarrollo del embrión de la planta, mientras que el TCS y EE2 no mostraron efectos negativos ni positivos en dicho proceso. Por otro lado, se encontró que EE2 y la acetona, usada como solvente, muestran un efecto negativo en el peso de las lombrices, impidiendo que este suba; mientras que BPA y TCS, a pesar de aumentar el peso, no logró ser significativo. Sin embargo, la determinación de la bioacumulación de estos compuestos en lombrices, por sí sola, no determina toxicidad, ya que aunque no se detecte un DE, éste puede estar provocando igualmente un efecto. Con estos resultados, se puede aceptar la hipótesis de que la toxicidad de DE se puede determinar a través de los bioensayos de germinación y desarrollo de plántulas de lechuga y bioensayos con lombrices, siendo éste último complementado con la determinación de la bioacumulación de dichos DE en lombrices.

6.1.- Perspectivas a futuro

Ya que se ha tomado más consciencia respecto a los efectos de los disruptores endocrinos en plantas e invertebrados terrestres, tal como ocurre con la germinación de semillas y las lombrices, han surgido nuevas investigaciones en cuanto a la selección de nuevos biomarcadores, siendo algunos de ellos asociados a efectos a nivel morfológico [Ferrara et al., 2006], genético [Novo et al., 2018], metabólico [McKelvie et al., 2011; Zhang et al., 2006] y reproductivo [Oumi et al., 1996]. Es por ello que la resolución de esta investigación asegura que los ensayos realizados pueden ser utilizados para determinar la capacidad de otros compuestos en generar efectos tóxicos.

7.- Bibliografía

Ahumada, I.; Sepúlveda, K.; Fernández, P.; Ascar, L.; Pedraza, C.; Richter, P. y Brown, S. Effect of Biosolid Application to Mollisol Chilean Soils on the Bioavailability of Heavy Metals (Cu, Cr, Ni, and Zn) as Assessed by Bioassays with Sunflower (*Helianthus annuus*) and DGT Measurements. Journal of Soils and Sediments. 14(5): 886-896, 2014.

Al-Hiyasat, A.; Darmani, H. y Elbetieha, A. Effects of Bisphenol A on Adult Male Mouse Fertility. European Journal of Oral Sciences. 110: 163-167, 2002.

Alvarenga, P.; Palma, P.; Mourinha, C.; Farto, M.; Dores, J.; Patanita, M.; Cunha-Queda, C.; Natal-da-Luz, T.; Renaud, M. y Sousa, J. Recycling Organic Wastes to Agricultural Land as a Way to Improve its Quality: A Field Study to Evaluate Benefits and Risks. Waste Management. 61: 582-592, 2017.

Amorim, M.; Oliveira, E.; Soares, A. y Scott-Fordsmand, J. Predicted No Effect Concentration (PNEC) for Triclosan to Terrestrial Species (Invertebrates and Plants). Environment International. 36: 338-343, 2010.

Anway, M. y Skinner, M. Epigenetic Programming of the Germ Line: Effects of Endocrine Disruptors on the Development of Transgenerational Disease. Reproductive BioMedicine Online. 16(1): 23-25, 2008.

Arcand-Hoy, L.; Nimrod, A. y Benson, W. Endocrine-Modulating Substances in the Environment: Estrogenic Effects of Pharmaceutical Products. International Journal of Toxicology. 17: 139-158, 1998.

Aris, A.; Shamsuddin, A. y Praveena, S. Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the Environment and Effect on Exposed Biota: a Review. Environment International. 69: 104-119, 2014.

Arismendi, D.; Becerra-Herrera, M.; Cerrato, I. y Richter, P. Simultaneous Determination of Multiresidue and Multiclass Emerging Contaminants in Waters by Rotating-Disk Sorptive Extraction-Derivatization-Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Talanta. 201: 480-489, 2019.

Babić, S.; Barišić, J.; Malev, O.; Klobučar, G.; Topić Popović, N.; Strunjak-Perović, I.; Krasnići, N.; Čož-Rakovac, R. y Sauerborn Klobučar, R. Sewage Sludge Toxicity Assessment Using Earthworm *Eisenia fetida*: Can Biochemical and Histopathological Analysis Provide Fast and Accurate Insight?. Environmental Science and Pollution Research. 2016, <DOI 10.1007/s11356-016-6097-3>.

Bhandari, R.; Deem, S.; Holliday, D.; Jandegian, C.; Kassotis, C.; Nagel, S.; Tillitt, D.; vom Saal, F. y Rosenfeld, C. Effects of the Environmental Estrogenic Contaminants Bisphenol A and 17 α -Ethinyl Estradiol on Sexual Development and Adult Behaviors in Aquatic Wildlife Species. General and Comparative Endocrinology. 2014, <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.09.014>>.

Bedoux, G.; Roig, B.; Thomas, O.; Dupont, V. y Le Bot, B. Occurrence and Toxicity of Antimicrobial Triclosan and By-Products in the Environment. Environmental Science and Pollution Research. 19: 1044-1065, 2012.

Bertin, A.; Inostroza, P. y Quiñones, R. A Theoretical Estimation of the Concentration of Steroid Estrogens in Effluents Released from Municipal Sewage Treatment Plants into Aquatic Ecosystems of Central-Southern Chile. Science of the Total Environment. 407: 4965-4971, 2009.

Cantarero, R.; Richter, P.; Brown, S.; Ascar, L. y Ahumada, I. Effects of Applying Biosolids to Soils on the Adsorption and Bioavailability of 17 α -ethinylestradiol and Triclosan in Wheat Plants. Environmental Science and Pollution Research. 24(14): 12847-12859, 2017.

Careghini, A.; Mastorgio, A.; Saponaro, S. y Sezenna, E. Bisphenol A, Nonylphenols, Benzophenones, and Benzotriazoles in Soils,

Groundwater, Surface Water, Sediments, and Food: a Review. Environmental Science and Pollution Research. 22: 5711-5741, 2015.

Castillo, G. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. IDRC, IMTA, Canadá. 2004. 202 pp.

Celis, J.; Sandoval, M.; Zagal, E. y Briones, M. Effect of Sewage Sludge and Salmon Wastes Applied to a Patagonian Soil on lettuce (*Lactuca sativa* L.) Germination. Journal of Soil Science and Plant Nutrition. 6(3): 13-25, 2006.

Decreto 4. Reglamento para el Manejo de Lodos Generados en Plantas de Tratamiento de Aguas Servidas. Ministerio Secretaría General de la Presidencia, Santiago, Chile, 28 de Octubre de 2009.

Delclos, K.; Weis, C.; Bucci, T.; Olson, G.; Mellick, P.; Sadovova, N.; Latendresse, J.; Thorn, B. y Newbold, R. Overlapping but Distinct Effects of Genistein and Ethinyl Estradiol (EE₂) in Female Sprague-Dawley Rats in Multigenerational Reproductive and Chronic Toxicity Studies. Reproductive Toxicology. 27: 117-132, 2009.

DeLorenzo, M. y Fleming, J. Individual and Mixture Effects of Selected Pharmaceuticals and Personal Care Products on the Marine Phytoplankton Species *Dunaliella tertiolecta*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 54: 203-210, 2008.

Diamanti-Kandarakis, E.; Bourguignon, J.; Giudice, L.; Hauser, R.; Prins, G.; Soto, A.; Zoeller, R. y Gore, A. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. Endocrine Reviews. 30(4): 293-342, 2009.

Environmental Technology Centre. Biological Test Method: Test for Toxicity of Contaminated Soil to Earthworms (*Eisenia Andrei*, *Eisenia fetida*, or *Lumbricus terrestris*). Method Development and Application

Section, Environmental Technology Centre, Environment Canada, Ottawa, Ontario. 2004.

European Commission. Johnson, I. y Harvey, P. Study on the Scientific Evaluation of 12 Substances in the Context of Endocrine Disrupter Priority List of Actions. WRC-NSF. Noviembre de 2002.

Ferrara, G.; Loffredo, E. y Senesi, N. Phytotoxic, Clastogenic and Bioaccumulation Effects of the Environmental Endocrine Disruptor Bisphenol A in Various Crops Grown Hydroponically. Planta. 223: 910-916, 2006.

Flint, S.; Markle, T.; Thompson, S. y Wallace, E. Bisphenol A Exposure, Effects, and Policy: A Wildlife Perspective. Journal of Environmental Management. 104: 19-34, 2012.

Global Industry Analysts, Inc., GIA. The Global Bisphenol A Market, Trends, Drivers & Projections. [En línea] <www.strategyr.com/MarketResearch/Bisphenol_A_Market:Trends.asp> [Consulta: 07 de Octubre de 2019].

Gómez, P. Evaluación de la Presencia y Biodisponibilidad de Estrona, 17 β -estradiol y de α -etinilestradiol en Suelos Agrícolas Restaurados con Biosólidos. Tesis (Químico Ambiental). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias, 2016. 84 h.

Gütelkin, I. e Ince, N. Synthetic Endocrine Disruptors in the Environment and Water Remediation by Advanced Oxidation Processes. Journal of Environmental Management. 85: 816-832, 2007.

Halden, R. y Paull, D. Co-Occurrence of Triclocarban and Triclosan in U.S. Water Resources. Environmental Science & Technology. 39: 1420-1426, 2005.

Hecker, M. y Hollert, H. Endocrine Disruptor Screening: Regulatory Perspectives and Needs. Environmental Sciences Europe. 23: 15, 2011 <<http://www.enveurope.com/content/23/1/15>>

Heidler, J. y Halden, R. Mass Balance Assessment of Triclosan Removal During Conventional Sewage Treatment. Chemosphere. 66: 362-369, 2007.

Hutchinson, T. Reproductive and Developmental Effects of Endocrine Disrupters in Invertebrates: in vitro and in vivo Approaches. Toxicology Letters. 131: 75-81, 2002.

IUPAC, Division of Chemistry and the Environment Commission on Water and Soil. Endocrine Disruptors in the Environment. Pure and Applied Chemistry. 75(5): 631-681, 2003.

Jachero, L.; Ahumada, I.; Fuentes, E. y Richter, P. New Biomimetic Approach to Determine the Bioavailability of Triclosan in Soils and its Validation with the Wheat Plant Uptake Bioassay. Chemosphere. 119: 1062-1067, 2015.

Juan-García, A.; Gallego, C. y Font, G. Toxicidad del Bisfenol A: Revisión. Revista de Toxicología. 32: 144-160, 2015.

Kinney, C.; Campbell, B.; Thompson, R.; Furlong, E.; Kolpin, D.; Burkhardt, M.; Zaugg, S.; Werner, S. y Hay, A. Earthworm Bioassays and Seedling Emergence for Monitoring Toxicity, Aging and Bioaccumulation of Anthropogenic Waste Indicator Compounds in Biosolids-Amended Soil. Science of the Total Environment. 433: 507-515, 2012.

Kinney, C.; Furlong, E.; Kolpin, D.; Burkhardt, M.; Zaugg, S.; Werner, S.; Bossio, J. y Benotti, M. Bioaccumulation of Pharmaceuticals and Other Anthropogenic Waste Indicators in Earthworms from Agricultural Soil Amended With Biosolid or Swine Manure. Environmental Science & Technology. 42(6): 1863-1870, 2008.

Kolpin, D.; Furlong, E.; Meyer, M.; Thurman, E.; Zaugg, S.; Barber, L. y Buxton, H. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. Environmental Science & Technology. 36: 1202-1211, 2002.

Kuster, M.; López de Alda, M. y Barceló, D. Estrogens and Progestogens in Wastewaters, Sludge, Sediments, and Soil. The Handbook of Environmental Chemistry. 5: 1-24, 2005.

Laurenson, J.; Bloom, R.; Page, S. y Sadrieh, N. Ethinyl Estradiol and Other Human Pharmaceutical Estrogens in the Aquatic Environment: A Review of Recent Risk Assessment Data. The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal. 16(2): 299-310, 2014.

Laverack, M. International Series of Monographs on Pure and Applied Biology. The Physiology of Earthworms. New York, The Macmillan Company, 1963. Volumen 15.

Lozano, N.; Rice, C.; Ramirez, M. y Torrents, A. Fate of Triclocarban, Triclosan and Methyltriclosan During Wastewater and Biosolids Treatment Processes. Water Research. 47(13): 4519-4527, 2013.

Macherius, A.; Lapen, D.; Reemtsma, T.; Römbke, J.; Topp, E. y Coors, A. Triclocarban, Triclosan and its Transformation Product Methyl Triclosan in Native Earthworm Species Four Year After a Commercial-Scale Biosolid Application. Science of the Total Environment. 472: 235-238, 2014.

Matthews, J.; Twomey, K. y Zacharewski, T. In Vitro and In Vivo Interactions of Bisphenol A and Its Metabolite, Bisphenol A Glucuronide, with Estrogen Receptors α and β . Chemical Research in Toxicology. 14(2): 149-157, 2001.

Markman, S.; Guschina, I.; Bransley, S.; Buchanan, K.; Pascoe, D. y Müller, C. Endocrine Disrupting Chemicals Accumulate in Earthworms Exposed to Sewage Effluent. Chemosphere. 70: 119-125, 2007.

McKelvie, J.; Wolfe, D.; Celejewski, M.; Alae, M.; Simpson, A. y Simpson, M. Metabolic Responses of *Eisenia fetida* After Sub-Lethal Exposure to Organic Contaminants with Different Toxic Modes of Action. Environmental Pollution. 159: 3620-3626, 2011.

Meina, E.; Lister, A.; Bosker, T.; Servos, M.; Munkittrick, K. y MacLachy, D. Effects of 17 α -ethinylestradiol (EE2) on Reproductive Endocrine Status in Mummichog (*Fundulus heteroclitus*) Under Differing Salinity and Temperature Conditions. Aquatic Toxicology. 134-135: 92-103, 2013.

Metzler, M. y Pfeiffer, E. Chemistry of Natural and Anthropogenic Endocrine Active Compounds. En: Metzler M. (eds) Endocrine Disruptors – Part I. The Handbook of Environmental Chemistry. Estados Unidos, Springer, Berlin, Heidelberg. 2001. pp. 63-80.

Ministerio del Medio Ambiente. Informe del Estado del Medio Ambiente. Ministerio del Medio Ambiente. Gobierno de Chile. Santiago de Chile, Diciembre de 2016.

Ministerio de Salud de Chile (MINSAL), Programa Nacional Salud de la Mujer; Instituto Chileno de Medicina Reproductiva (ICMER); Asociación Chilena de Protección de la Familia (APROFA). Normas nacionales Sobre Regulación de la Fertilidad. Santiago, Chile, 30 de Enero de 2018.

Moral, R.; Wang, R.; Russo, I.; Lamartiniere, C.; Pereira, J. y Russo, J. Effects of Prenatal Exposure to the Endocrine Disruptor Bisphenol A on Mammary Gland Morphology and Gene Expression Signature. Journal of Endocrinology. 196: 101-112, 2008

Moriyama, K.; Matsufuji, H.; Chino, M. y Takeda, M. Identification and Behavior of Reaction Products Formed by Chlorination of Ethynylestradiol. Chemosphere. 55: 839-847, 2004.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Bisphenol A, CID=6623. [En línea]. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bisphenol-A>> [Consulta: 03 de Octubre de 2019].

Nonogaki, H. Seed Germination-The Biochemical and Molecular Mechanisms. Breeding Science. 56: 93-105, 2006.

Novo, M.; Verdú, L.; Trigo, D. y Martínez-Guitarte, J. Endocrine Disruptors in Soil: Effects of Bisphenol A on Gene Expression of the Earthworm *Eisenia fetida*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 150: 159-167, 2018.

Oehlmann, J.; Schulte-Oehlmann, U.; Kloas, W.; Jagnytsch, O.; Lutz, I.; Kusk, K.; Wollenberger, L.; Santos, E.; Paull, G.; Van Look, K. y Tyler, C. A Critical Analysis of the Biological Impacts of Plasticizers on Wildlife. Philosophical Transactions of the Royal Society B. 364: 2047-2062, 2009.

Oumi, T.; Ukena, K.; Matsushima, O.; Ikeda, T.; Fujita, T.; Minakata, H. y Nomoto, K. Annetocin, an Annelid Oxytocin-Related Peptide, Induces Egg-Laying Behavior in the Earthworm, *Eisenia foetida*. The Journal of Experimental Zoology. 276: 151-156, 1996.

Pannu, M.; Toor, G.; O'Connor, G. y Wilson, P. Toxicity and Bioaccumulation of Biosolids-Borne Triclosan in Food Crops. Environmental Toxicology and Chemistry. 31(9): 2130-2137, 2012.

Plahuta, M.; Tišler, T.; Pintar, A. y Toman, M. Adverse Effects of Bisphenol A on Water Louse (*Asellus aquaticus*). Ecotoxicology and Environmental Safety. 117: 81-88, 2015.

Rubin, B. Bisphenol A: An Endocrine Disruptor with Widespread Exposure and Multiple Effects. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 127: 27-34, 2011.

Sadzawka, A.; Carrasco, M.; Grez, R.; Mora, M.; Flores, H. y Neaman, A. Métodos de Análisis Recomendados para Suelos de Chile. Revisión 2006. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Serie Actas INIA-N° 34, Santiago, Chile. 164p, 2006.

Sánchez-Brunete, C.; Miguel, E.; Albero, B. y Tadeo, J. Determination of Triclosan and Methyl Triclosan in Environmental Solid Samples by Matrix Solid-Phase Dispersion and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Journal of Separation Science. 33: 2768-2775, 2010.

Schug, T.; Janesick, A.; Blumberg, B. y Heindel, J. Endocrine Disrupting Chemicals and Disease Susceptibility. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 127: 204-215, 2011.

Singer, H.; Müller, S.; Tixier, C. y Pillonel, L. Triclosan: Occurrence and Fate of a Widely Used Biocide in the Aquatic Environment: Field Measurements in Wastewater Treatment Plants, Surface Waters, and Lake Sediments. Environmental Science & Technology. 36: 4998-5004, 2002.

Singh, R. y Agrawal, M. Potential Benefits and Risks of Land Application of Sewage Sludge. Waste Management. 28: 347-358, 2008.

Ternes, T.; Kreckel, P. y Mueller, J. Behaviour and Occurrence of Estrogens in Municipal Sewage Treatment Plants – II. Aerobic Batch Experiments with Activated Sludge. The Science of the Total Environment. 225: 91-99, 1999.

Thompson, A.; Griffin, P.; Stuetz, R. y Cartmell, E. The Fate and Removal of Triclosan During Wastewater Treatment. Water Environment Research. 77: 63-67, 2005.

United States Environmental Protection Agency, USEPA(a). Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) Estrogen Receptor Bioactivity. [En línea]. <www.epa.gov/endocrine-disruption/endocrine-disruptor-screening-program-edsp-estrogen-receptor-bioactivity> [Consulta: 09 de Octubre de 2019].

United States Environmental Protection Agency, USEPA(b). What are Biosolids?. [En línea]. <www.epa.gov/biosolids/frequent-questions-about-biosolids> [Consulta: 28 de Octubre de 2017].

Veldhoen, N.; Skirrow, R.; Osachoff, H.; Wigmore, H.; Clapson, D.; Gunderson, M.; Aggelen, G. y Helbing, C. The Bactericidal Agent Triclosan Modulates Thyroid Hormone-Associated Gene Expression and Disrupts Postembryonic Anuran Development. *Aquatic Toxicology*. 80: 217-227, 2006.

Verdú, I.; Trigo, D.; Martínez-Guitarte, J. y Novo, M. Bisphenol A in Artificial Soil: Effects on Growth, Reproduction and Immunity in Earthworms. *Chemosphere*. 190: 287-295, 2018.

Vosges, M.; Braguer, J. y Combarous, Y. Long-Term Exposure of male Rats to Low-Dose Ethinylestradiol (EE2) in Drinking Water: Effects on Ponderal Growth and on Litter Size of their Progeny. *Reproductive Toxicology*. 25: 161-168, 2008.

Welshons, W.; Nagel, S. y vom Saal, F. Large Effects from Small Exposures. III. Endocrine Mechanisms Mediating Effects of Bisphenol A at Levels of Human Exposure. *Endocrinology*. 147(6): S56-S69, 2006.

Witorsch, R. Endocrine Disruptors: Can Biological Effects and Environmental Risks Be Predicted?. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 36: 118-130, 2002.

Wu, C.; Spongberg, A. y Witter, J. Adsorption and Degradation of Triclosan and Triclocarban in Soils and Biosolids-Amended Soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 4900-4905, 2009.

Ying, GG. y Kookana, R. Triclosan in Wastewaters and Biosolids from Australian Wastewater Treatment Plants. Environment International. 33: 199-205, 2007.

Ying, GG.; Kookana, R. y Ru, YJ. Occurrence and Fate of Hormone Steroids in the Environment. Environment International. 28: 545-551, 2002.

Zenker, A.; Cicero, M.; Prestinaci, F.; Bottoni, P. y Carere, M. Bioaccumulation and Biomagnification Potential of Pharmaceuticals with a Focus to the Aquatic Environmet. Journal of Environmental Management. 133: 378-387, 2014

Zhang, W.; Song, Y.; Gong, P.; Sun, T.; Zhou, Q. y Liu, M. Earthworm Cytochrome P450 Determination and Application as a Biomarker for Diagnosing PAH Exposure. Journal of Environmental Monitoring. 8: 963-967, 2006.

Zhang, Y.; Dong, S.; Wang, H.; Tao, S. y Kiyama, R. Biological Impact of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (ePAHs) as Endocrine Disruptors. Environmental Pollution. 213: 809-824, 2016.

Zhang, Z.; Le Velly, M.; Rhind, S.; Kyle, C.; Hough, R.; Duff, E. y McKenzie, C. A Study on Temporal Trends and Estimates of Fate of Bisphenol A in Agricultural Soils after Sewage Sludge Amendment. Science of the Total Environment. 515-516: 1-11, 2015.

Zou, E. y Fingerman, M. Effects of Estrogenic Xenobiotics on Molting of the Water Flea, *Daphnia magna*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 38: 281-285, 1997.

8.- Anexos

8.1.- Figuras

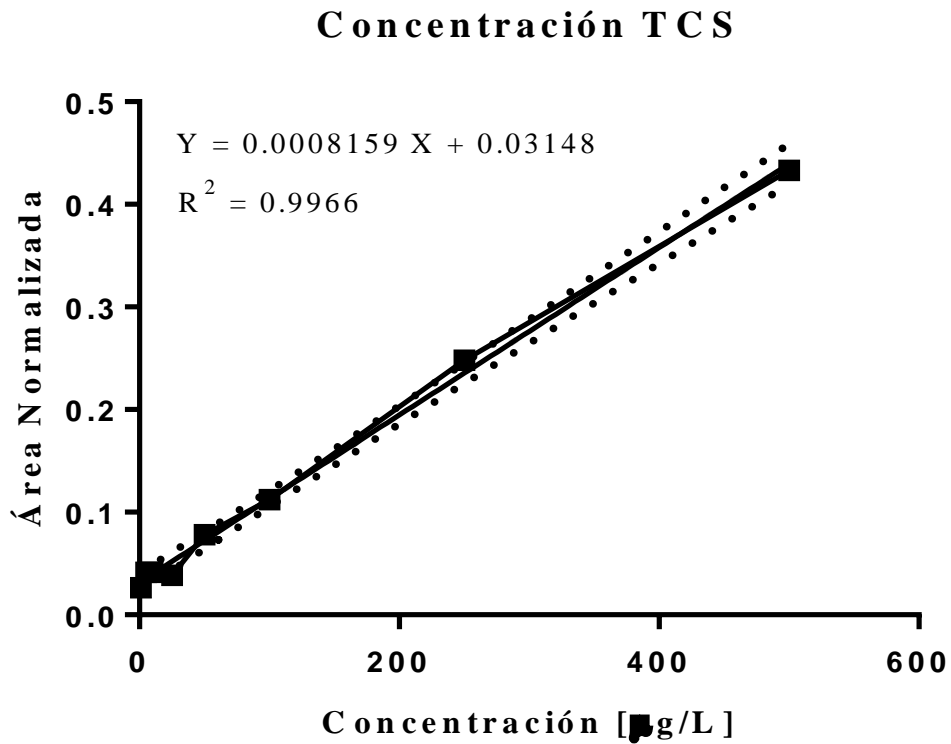


Figura Suplementaria 1.- Curva de calibración de TCS para análisis GC. ■ indica las concentraciones utilizadas para la construcción de la curva (1, 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 $\mu\text{g/L}$). El área obtenida para cada analito fue normalizada por PCB (razón TCS/PCB) para los iones 347 y 290 m/z, respectivamente.

Concentración BPA

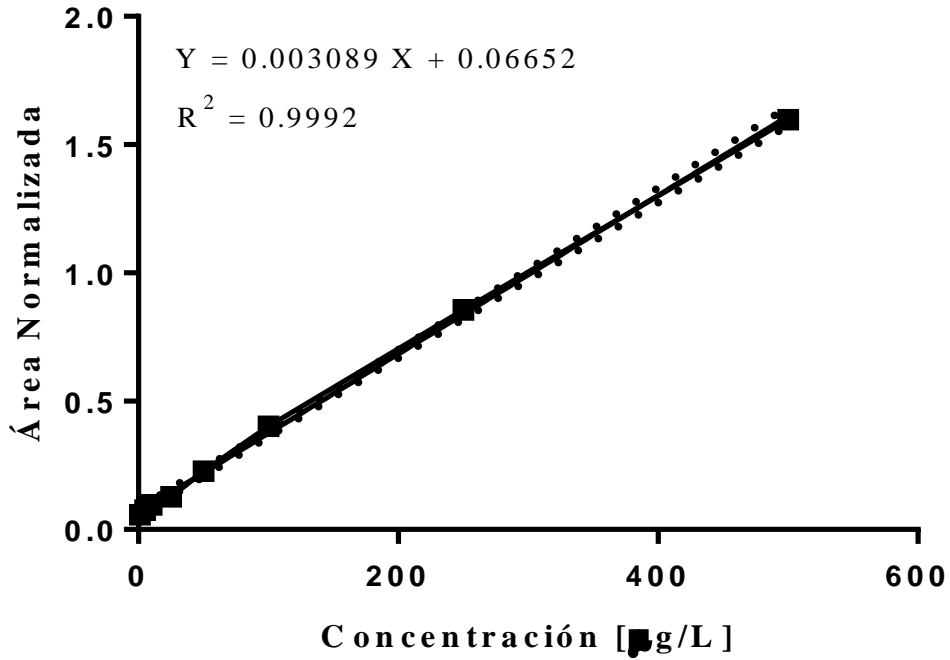


Figura Suplementaria 2.- Curva de calibración de BPA para análisis GC. • indica las concentraciones utilizadas para la construcción de la curva (1, 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 µg/L). El área obtenida para cada analito fue normalizada por PCB (razón BPA/PCB) para los iones 358 y 290 m/z, respectivamente.

Concentración EE 2

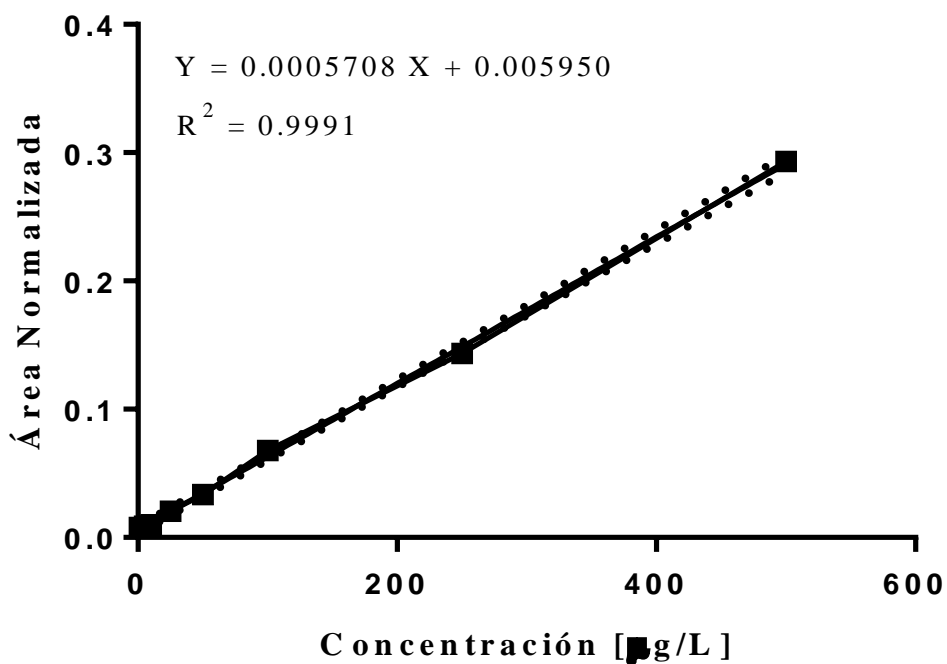


Figura Suplementaria 3.- Curva de calibración de EE2 para análisis GC.

▪ indica las concentraciones utilizadas para la construcción de la curva (1, 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 µg/L). El área obtenida para cada analito fue normalizada por PCB (razón EE2/PCB) para los iones 425 y 292 m/z, respectivamente.

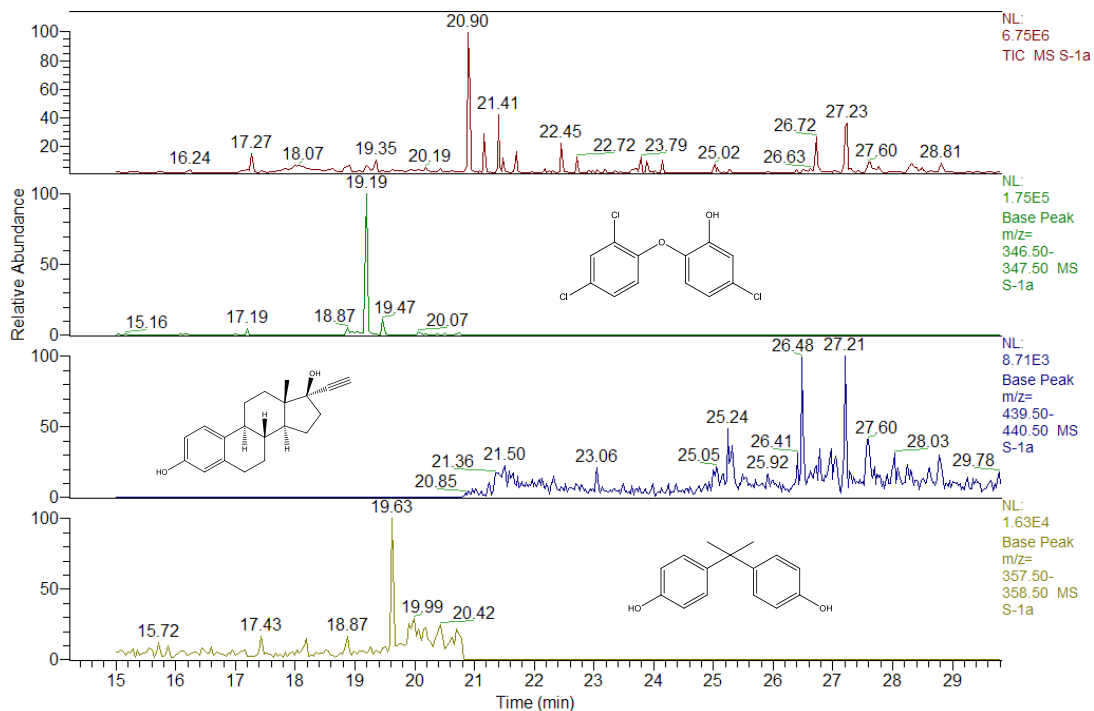


Figura Suplementaria 4.-Cromatograma GC correspondiente a Lombrices en sustrato (Suelo). En rojo: cromatograma completo de la solución (TIC). En verde: ión identificador de TCS ($m/z = 347$) y $t_r = 18.87$ min. En azul: ión identificador de EE2 ($m/z = 440$) y $t_r = 24.39$ min. En amarillo, ión identificador de BPA ($m/z = 358$) y $t_r = 19.63$ min.

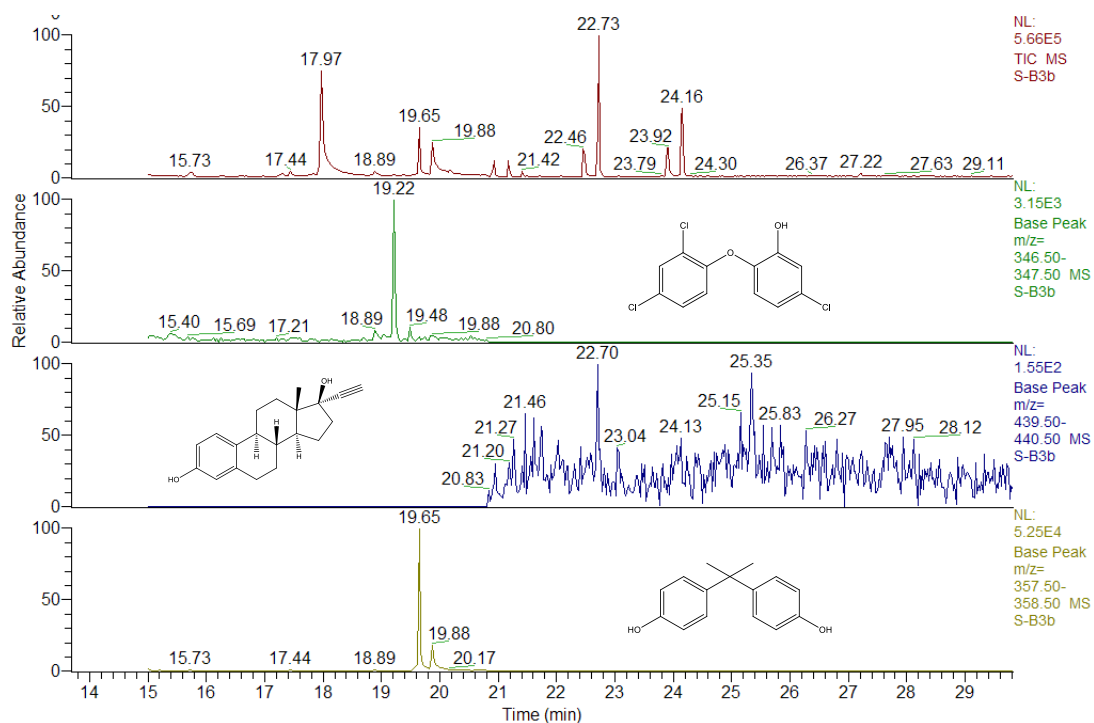


Figura Suplementaria 5.-Cromatograma GC correspondiente a Lombrices en sustrato (Suelo + Biosólido). En rojo: cromatograma completo de la solución (TIC). En verde: ión identificador de TCS ($m/z = 347$) y $t_r = 18.89$ min. En azul: ión identificador de EE2 ($m/z = 440$) y $t_r = 24.39$ min. En amarillo, ión identificador de BPA ($m/z = 358$) y $t_r = 19.65$ min.

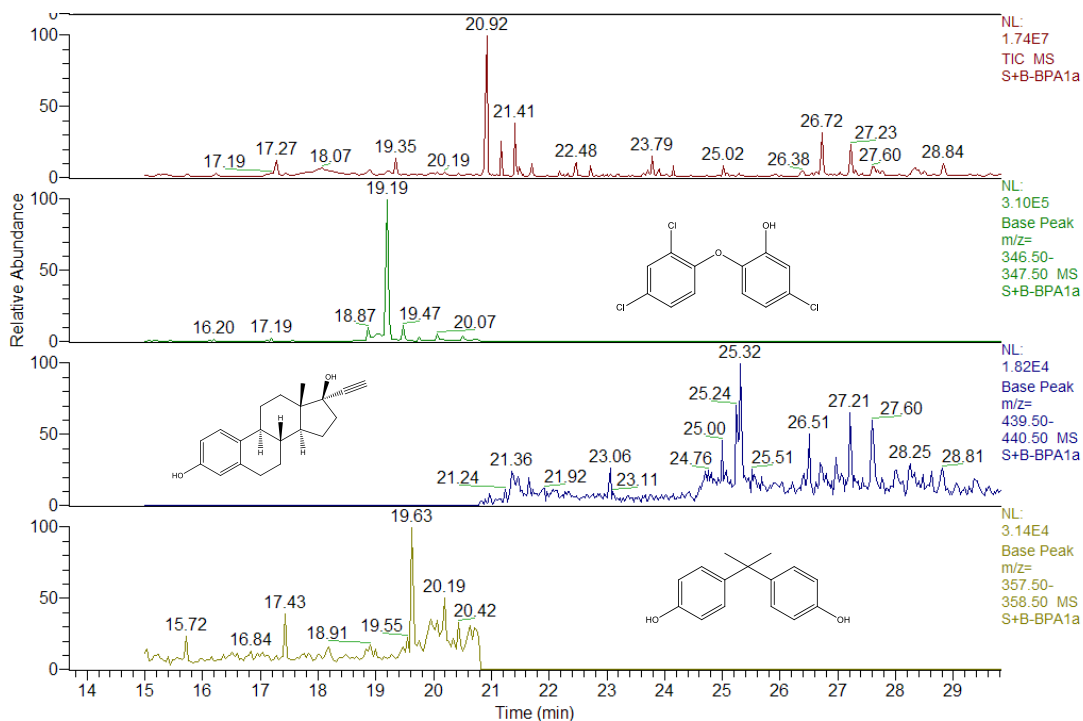


Figura Suplementaria 6.-Cromatograma GC correspondiente a Lombrices en sustrato (Suelo + Biosólido*BPA). En rojo: cromatograma completo de la solución (TIC). En verde: ión identificador de TCS ($m/z = 347$) y $t_r = 18.87$ min. En azul: ión identificador de EE2 ($m/z = 440$) y $t_r = 24.39$ min. En amarillo, ión identificador de BPA ($m/z = 358$) y $t_r = 19.63$ min.

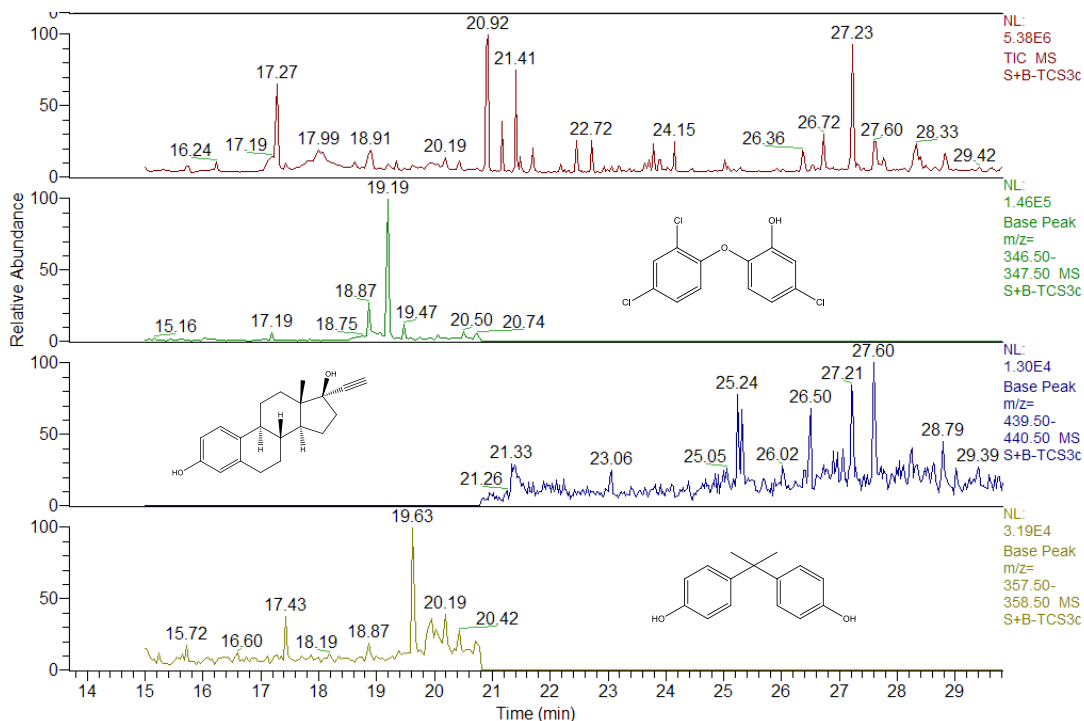


Figura Suplementaria 7.-Cromatograma GC correspondiente a Lombrices en sustrato (Suelo + Biosólido*TCS). En rojo: cromatograma completo de la solución (TIC). En verde: ión identificador de TCS ($m/z = 347$) y $t_r = 18.87$ min. En azul: ión identificador de EE2 ($m/z = 440$) y $t_r = 24.39$ min. En amarillo, ión identificador de BPA ($m/z = 358$) y $t_r = 19.63$ min.

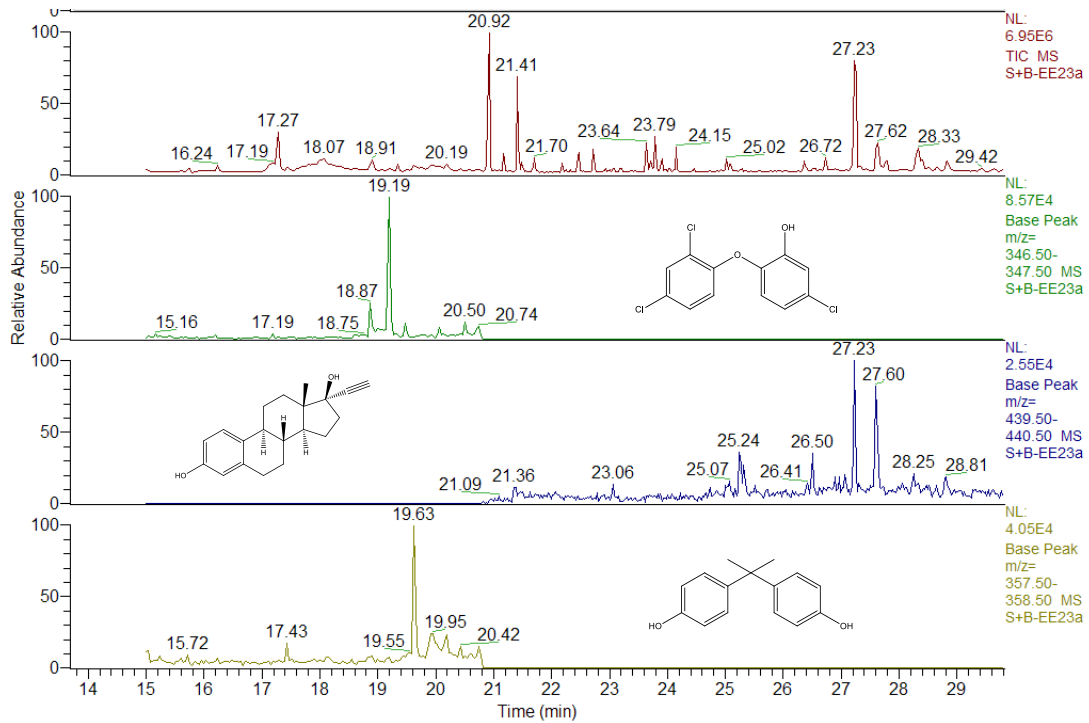


Figura Suplementaria 8.-Cromatograma GC correspondiente a Lombrices en sustrato (Suelo + Biosólido*EE2). En rojo: cromatograma completo de la solución (TIC). En verde: ión identificador de TCS ($m/z = 347$) y $t_r = 18.87$ min. En azul: ión identificador de EE2 ($m/z = 440$) y $t_r = 24.39$ min. En amarillo, ión identificador de BPA ($m/z = 358$) y $t_r = 19.63$ min.

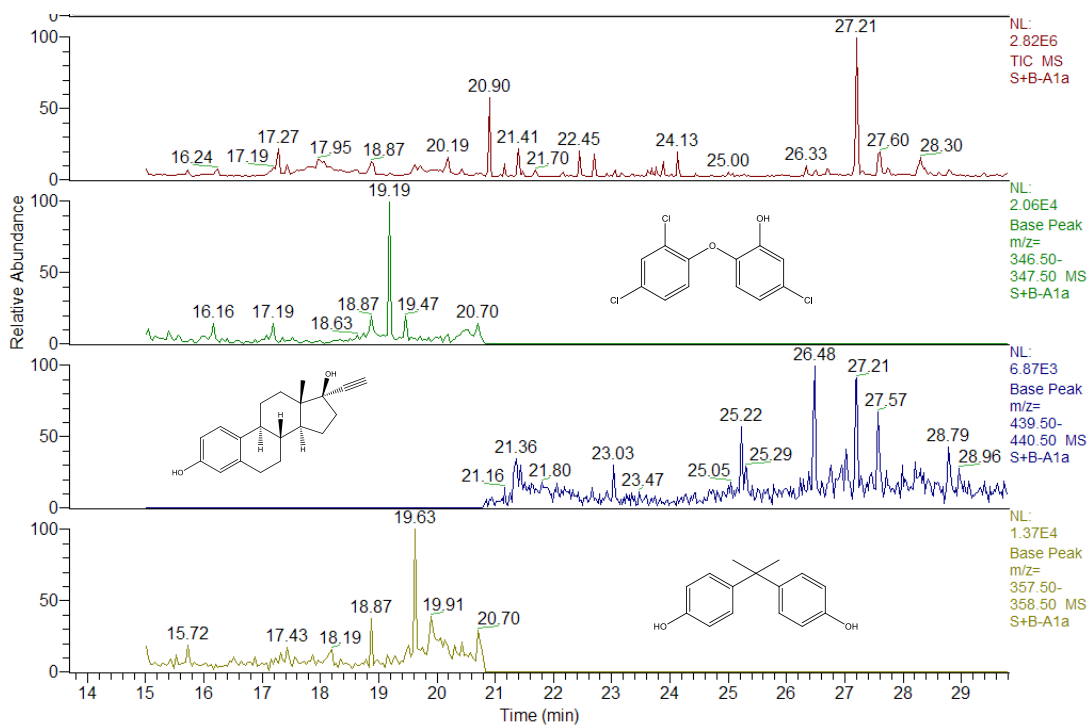


Figura Suplementaria 9.-Cromatograma GC correspondiente a Lombrices en sustrato (Suelo + Biosólido*Acetona). En rojo: cromatograma completo de la solución (TIC). En verde: ión identificador de TCS ($m/z = 347$) y $t_r = 18.87$ min. En azul: ión identificador de EE2 ($m/z = 440$) y $t_r = 24.39$ min. En amarillo, ión identificador de BPA ($m/z = 358$) y $t_r = 19.63$ min.

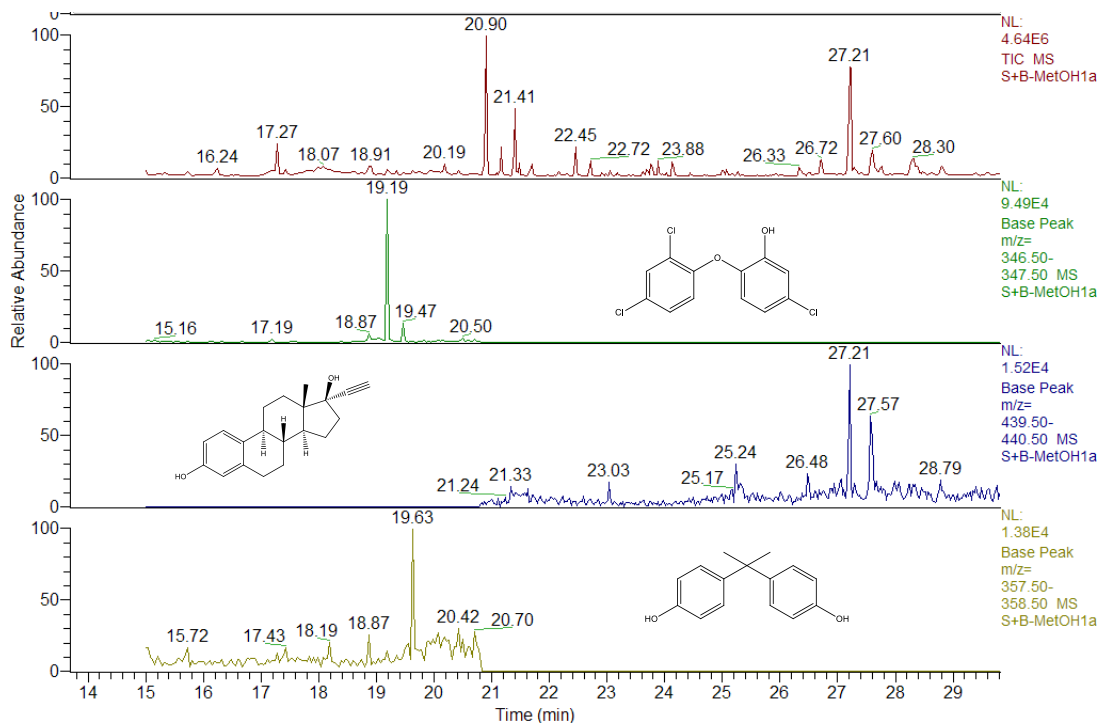


Figura Suplementaria 10.-Cromatograma GC correspondiente a Lombrices en sustrato (Suelo + Biosólido*metanol). En rojo: cromatograma completo de la solución (TIC). En verde: ión identificador de TCS ($m/z = 347$) y $t_r = 18.87$ min. En azul: ión identificador de EE2 ($m/z = 440$) y $t_r = 24.39$ min. En amarillo, ión identificador de BPA ($m/z = 358$) y $t_r = 19.63$ min.

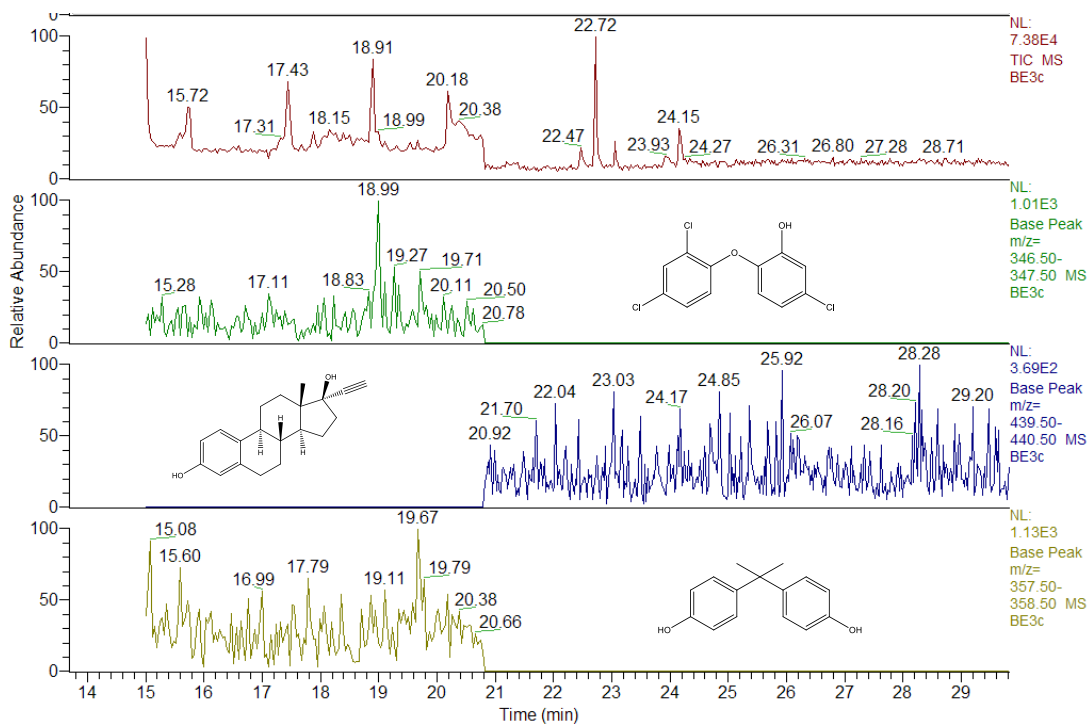


Figura Suplementaria 11.-Cromatograma GC correspondiente a Blanco de Elución. En rojo: cromatograma completo de la solución (TIC). En verde: ión identificador de TCS ($m/z = 347$) y $t_r = 18.87$ min. En azul: ión identificador de EE2 ($m/z = 440$) y $t_r = 24.39$ min. En amarillo, ión identificador de BPA ($m/z = 358$) y $t_r = 19.63$ min.

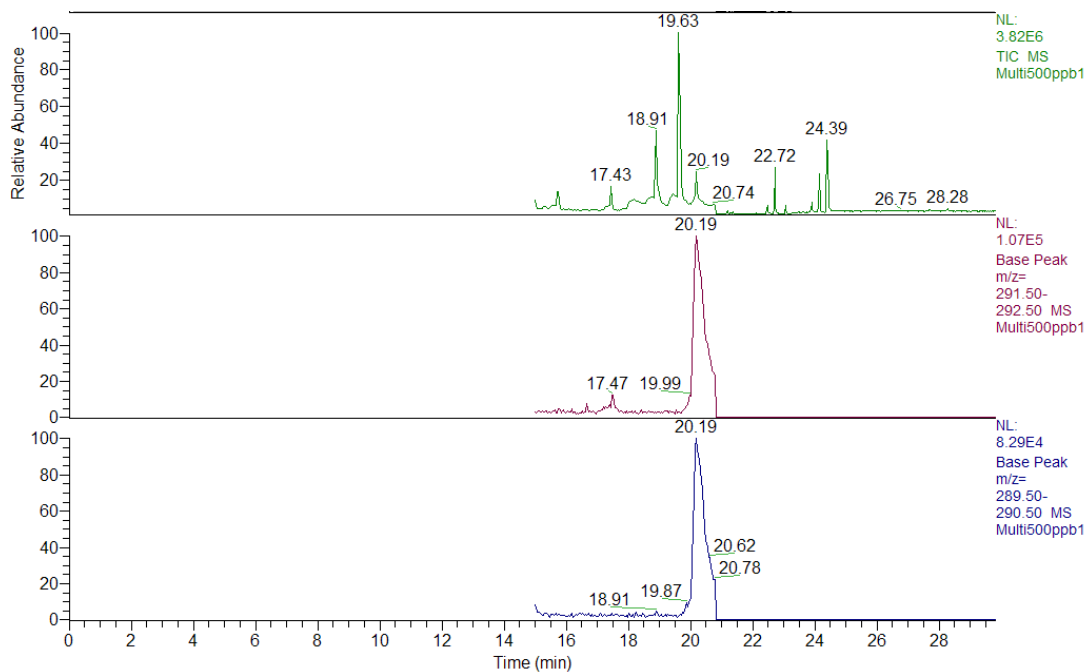


Figura Suplementaria 12.-Cromatograma GC correspondiente a Estándar interno (PCB). En verde: cromatograma completo de la solución (TIC). En rojo: ión cuantificador de PCB ($m/z = 292$) y en azul: ión identificador de PCB ($m/z = 290$), $t_r = 20.19$ min.

8.2.- Tablas

Tabla Suplementaria 1.- Longitud promedio de radículas e hipocotilo y promedio de semillas que germinan.

| Tratamiento | Longitud de raíces (mm) | Longitud de hipocotilo (mm) | Cantidad de semillas que germinan |
|---|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| Agua Destilada | 36 ± 9 | 31 ± 5 | 5 ± 1 |
| Suelo Chicauma | 28 ± 9 | 30 ± 9 | 4 ± 1 |
| Suelo + Biosólido [90Mg/ha] | 31 ± 11 | 28 ± 8 | 7 ± 1 |
| Suelo + Biosólido [90Mg/ha] * BPA [52mg/kg] | 28 ± 7 | 24 ± 6 | 3 ± 2 |
| Suelo + Biosólido [90Mg/ha] * EE2 [0.6mg/kg] | 32 ± 11 | 26 ± 6 | 6 ± 1 |
| Suelo + Biosólido [90Mg/ha] * TCS [40 mg/kg] | 27 ± 9 | 27 ± 10 | 7 ± 1 |
| Suelo + Biosólido [90Mg/ha] * Acetona | 36 ± 11 | 27 ± 6 | 6 ± 0 |
| Suelo + Biosólido [90Mg/ha] * Metanol | 31 ± 8 | 25 ± 6 | 6 ± 0 |

Tabla Suplementaria 2.- Variación del peso de lombrices en los distintos tratamientos

| Tratamiento | Variación peso día 7 (%) | Variación peso día 14 (%) |
|---|--------------------------|---------------------------|
| Suelo Chicauma | 30,9 ± 6,3 | 60,2 ± 11,7 |
| Suelo + Biosólido [30Mg/ha] | 41,1 ± 9,8 | 80,9 ± 13,4 |
| Suelo + Biosólido [30Mg/ha] * BPA [52mg/kg] | 56,8 ± 2,3 | 93,7 ± 5,9 |
| Suelo + Biosólido [30Mg/ha] * TCS [40mg/kg] | 42,3 ± 10,9 | 74,7 ± 26,4 |
| Suelo + Biosólido [30Mg/ha] * EE2 [0,6mg/kg] | 30,9 ± 0,8 | 35,5 ± 2,3 |
| Suelo + Biosólido [30Mg/ha] * Acetona | 28,7 ± 5,8 | 40,9 ± 12,3 |
| Suelo + Biosólido [30Mg/ha] * Metanol | 42,6 ± 4,3 | 56,9 ± 14,7 |

Tabla Suplementaria 3.- Concentración (ng/g) de BPA y TCS en lombrices y sustrato.

| Tratamientos | Concentración en Lombrices (ng/g) peso seco | | Concentración en sustrato (ng/g) | |
|--------------------|--|----------|-------------------------------------|---------------|
| | BPA | TCS | BPA | TCS |
| S | n.e. | 583±75 | n.e. | n.e. |
| S+B | 552±117 | 543±44 | 176,49±0,02 | 135,76±0,02 |
| S+B*BPA | 557±111 | 3074±364 | 882,4±0,2 | 135,75±0,03 |
| S+B*TCS | 176±63 | 3108±312 | 176,48±0,01 | 678,78±0,04 |
| S+B*EE2 | 297±93 | 1064±114 | 176,48±0,02 | 135,76±0,02 |
| S+B*Metanol | 263±148 | 493±91 | 176,506±0,004 | 135,774±0,003 |
| S+B*Acetona | 463±79 | 1015±269 | 176,506±0,006 | 135,774±0,005 |

Tratamientos: S (suelo), S+B (suelo + biosólido [30 Mg/ha]), B* (biosólido enriquecido con compuesto correspondiente): BPA [52mg/kg], TCS [40mg/kg], EE2 [0.6mg/kg]. n.e.: no encontrado.