

1º SIMPOSIO NOVEDAR

Novedar

2019

PRESENCIA Y ELIMINACIÓN DE MICROCONTAMINANTES EN AGUA

Dr. Antonio J. García Fernández
G.I. "Toxicología y Evaluación de Riesgos"
IMIB-Arrixaca
Universidad de Murcia
www.sertoxmur.com
ajgf@um.es

Santiago de Compostela, 13 y 14 de junio 2019

Evaluación de la toxicidad de contaminantes traza orgánicos en aguas residuales desde una perspectiva europea

IMIB Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria Virgen de la Arrixaca

UNIVERSIDAD DE MURCIA

1º SIMPOSIO NOVEDAR

*Sustancias químicas de interés Ecotoxicológico
Antes*

- **Tóxicos** y, muchas veces, sus metabolitos también
- Estables tanto química como ambientalmente
- **Persistentes** y ubicuitarios en el medio
- Biodisponibles y en la mayoría de casos **bioacumulables** y **biomagnificables** (cadena trófica)

↓
Listas prioritarias de sustancias potencialmente peligrosas

2

Sustancias químicas de interés Ecotoxicológico
Ahora

Directiva 2013/39/UE

“La contaminación de las aguas y los suelos con residuos farmacéuticos es un problema medioambiental emergente”

Artículo 8 quater
Disposiciones específicas para sustancias farmacéuticas



Fuente: <http://www.market.com>

Buitres-DICLOFENACO



Fuente: <http://www.tusiances.com>

Hormonas-Medio acuático



Fuente: <http://www.chalver.com>

3

Directiva 2013/39/UE



EFFLUENTS

Pharmaceuticals products
COPs **Mixtures** Personal Care Products
Heavy metals

CONTAMINACIÓN QUÍMICA EN AGUAS ES UNA AMENAZA

- Toxicidad aguda y crónica en **organismos acuáticos**
- Acumulación de contaminantes en **el ecosistema**
- Pérdida de **hábitats** y de **biodiversidad**
- Amenaza para la **salud humana**.

datos sobre los efectos ecotoxicológicos y toxicológicos, para efectuar las evaluaciones de riesgo

4

PRIORITIES before 2013?

- **Mixtures**
- **Endocrine disruption** (and other potential sublethal effects)
- **Aquatic ecosystems**
- **Emerging contaminants?**
 - Pharmaceutical compounds
 - Personal care products
 - Steroid compounds and hormones
 - Surfactants, Gasoline additives, Flame retardants,

Additive effect

Potentiation

Synergism

Antagonism

5

Evaluación del Riesgo Ecológico Ecological Risk Assessment (ERA)

1. La exposición es calculada en escenarios genéricos (local or regional).

Compartimentos Ambientales

PEC_{AIRE} PEC_{SUE} PEC_{AGU} PEC_{SED} PEC_{BIO}
2. Los efectos esperados son evaluados según la información ecotoxicológica disponible.

Especies clave

Tests de Toxicidad en cada compartimento
(p.e. mezclándolo con agua, suelo, alimento, etc)
3. El riesgo es caracterizado individualmente para cada compartimento.

PEC vs. PNEC
(Especies relevantes para cada compartimento en particular)

Tarazona y Vega (2002)

6

Ecotoxicology
The science of contaminants in the biosphere and their effects

Ecosystem Ecotoxicology
Community Ecotoxicology
Population Ecotoxicology
Organismal Ecotoxicology


Es una ciencia jerárquica en la cual un nivel no es mejor que otro a la hora de identificar la causa o atribución de efectos. (Newman and Clements, 2008).



20.4.2018 ES Diario Oficial de la Unión Europea L 101/33

REGLAMENTO (UE) 2018/605 DE LA COMISIÓN
de 19 de abril de 2018
por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) n.º 1107/2009 al establecer criterios científicos para la determinación de las propiedades de alteración endocrina
(Texto pertinente a efectos del EEE)

OECD Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption



A Guidance document was issued in 2012 on standardised test guidelines for evaluating chemicals for endocrine disruption (see document No. 150 published in the Series on Testing and Assessment).

The objective of the Guidance Document is to provide guidance on how to interpret the outcome of individual tests and how to increase evidence on whether or not a substance may be an endocrine disruptor. However, testing strategies or guidance on interpretation from a suite of tests are not given.

<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/>


What is an Endocrine Disrupter ?

Endocrine disrupting chemicals (EDSs) are substances in our environment, food and consumer products that can disrupt hormonal balance **in humans and wildlife** and result in adverse health effects.

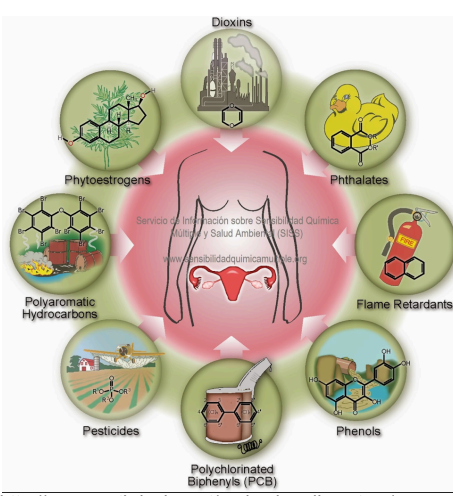
The GD only covers:

- Estrogen receptor mediated
- Androgen receptor mediated
- Thyroid hormone mediated
- Steroidogenesis interference

9


 **Testing and Assessment of Endocrine disruptors**
BETTER POLICIES FOR BETTER LIVES

- Un grupo asesor sobre pruebas y evaluación de alteraciones endocrinas (EDTA AG);
- Un grupo de gestión de validación de pruebas de ecotoxicidad;
- Un grupo de gestión de validación de ensayos sin animales;
- Un grupo de gestión de validación para pruebas en mamíferos.




Servicio de Información sobre Sostenibilidad Química, Nutrición y Salud Ambiental (SISQ)
www.sostenibilidadquimica.com/qa/eng

<http://www.earthdecks.net/endocrine-disruptors/> 10

 **Testing and Assessment of Endocrine disruptors**


Mammalian and Non Mammalian Toxicology	
Level 1 Existing Data and Non-Test Information	<ul style="list-style-type: none"> › Physical & chemical properties, e.g., MW reactivity, volatility, biodegradability. › All available (eco)toxicological data from standardized or non-standardized tests. › Read across, chemical categories, QSARs and other <i>in silico</i> predictions, and ADME model predictions.
Level 2 <i>In vitro</i> assays providing data about selected endocrine mechanism(s) / pathway(s) (Mammalian and non mammalian methods)	<ul style="list-style-type: none"> › Estrogen or androgen receptor binding affinity (OECD TG 493). › Estrogen receptor transactivation (OECD TG 455 & TG 457). › Androgen transactivation assay (OECD TG 458). › Steroidogenesis in vitro (OECD TG 456). › MCF-7 cell proliferation assays (ER ant/agonist). › Other assays as appropriate.

11


 **Testing and Assessment of Endocrine disruptors**

	Mammalian Toxicology	Non-Mammalian Toxicology
Level 3 <i>In vivo</i> assays providing data about selected endocrine mechanism(s) / pathway(s)	<ul style="list-style-type: none"> › Uterotrophic assay (OECD TG 440). › Hershberger assay (OECD TG 441). 	<ul style="list-style-type: none"> › Xenopus embryo thyroid signalling assay (When/if TG is available). › Amphibian metamorphosis assay (OECD TG 231). › Fish Reproductive Screening Assay (OECD TG 229). › Fish Screening Assay (OECD TG 230). › Androgenized female stickleback screen (OECD).

12


 Testing and Assessment of Endocrine disruptors		
	Mammalian Toxicology	Non-Mammalian Toxicology
Level 4 <i>In vivo</i> assays providing data on adverse effects on endocrine relevant endpoints	<ul style="list-style-type: none"> > Repeated dose 28-day study (OECD TG 407). > Repeated dose 90-day study (OECD TG 408). > 1-generation reproduction toxicity study (OECD TG 415). > Male pubertal assay (see GD 150, Chapter C4.3). > Female pubertal assay (see GD 150, Chapter C4.4). > Intact adult male endocrine screening assay (see GD 150, Chapter Annex 2.5). > Prenatal developmental toxicity study (OECD TG 414). > Chronic toxicity and carcinogenicity studies (OECD TG 451-3). > Reproductive screening test (OECD TG 421). > Combined 28-day/reproductive screening assay (OECD TG 422). > Developmental neurotoxicity (OECD TG 426). 	<ul style="list-style-type: none"> > Fish sexual development test (OECD TG 234). > Fish Reproduction Partial Lifecycle Test (when/If TG is Available). > Larval Amphibian Growth & Development Assay (OECD TG 241). > Avian Reproduction Assay (OECD TG 206). > Mollusc Partial Lifecycle Assays (OECD TG 242 & TG 243). > Chironomid Toxicity Test (TG 218 & TG 219). > Daphnia Reproduction Test (with male induction) (OECD TG 211). > Earthworm Reproduction Test (OECD TG 222). > Enchytraeid Reproduction Test (OECD TG 220). > Sediment Water Lumbriculus Toxicity Test Using Spiked Sediment (OECD TG 225). > Predatory mite reproduction test in soil (OECD TG 226). > Collembolan Reproduction Test in Soil (OECD TG 232).

13


 Testing and Assessment of Endocrine disruptors		
	Mammalian Toxicology	Non-Mammalian Toxicology
Level 5 <i>In vivo</i> assays providing more comprehensive data on adverse effects on endocrine relevant endpoints over more extensive parts of the life cycle of the organism.	<ul style="list-style-type: none"> > Extended one-generation reproductive toxicity study (OECD TG 443). > 2-Generation reproduction toxicity study (OECD TG 416). 	<ul style="list-style-type: none"> > FLCTT (Fish LifeCycle Toxicity Test) (when TG is available). > Medaka Extended One Generation Reproduction Toxicity Study Test (OECD TG 240). > Avian 2 generation reproductive toxicity assay (when TG is available). > Mysid Life Cycle Toxicity Test (when TG is available). > Copepod Reproduction and Development Test (when TG is available). > Sediment Water Chironomid Life Cycle Toxicity Test (OECD TG 233); > Mollusc Full Lifecycle Assays (when TG is available). > Daphnia Multigeneration Assay (if TG is available).

14

Métodos Alternativos en la legislación europea de evaluación de la toxicidad

Reglamento REACH  **métodos alternativos** al uso de animales de experimentación.

2006



Directive **2010/63/EU**
(Animal experimentation)

- REACH (including nanoforms)
- PLANT PROTECTION PRODUCTS
- BIOCIDES
- PHARMACEUTICALS (H&V drugs)
- Others?

15

¿Qué respuestas debemos medir?

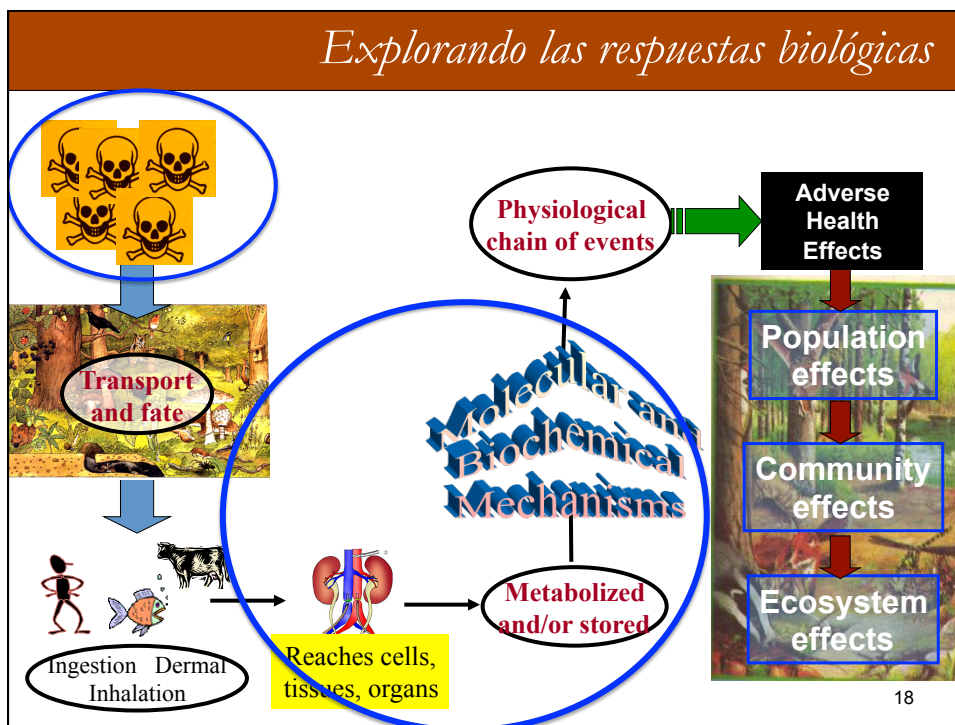
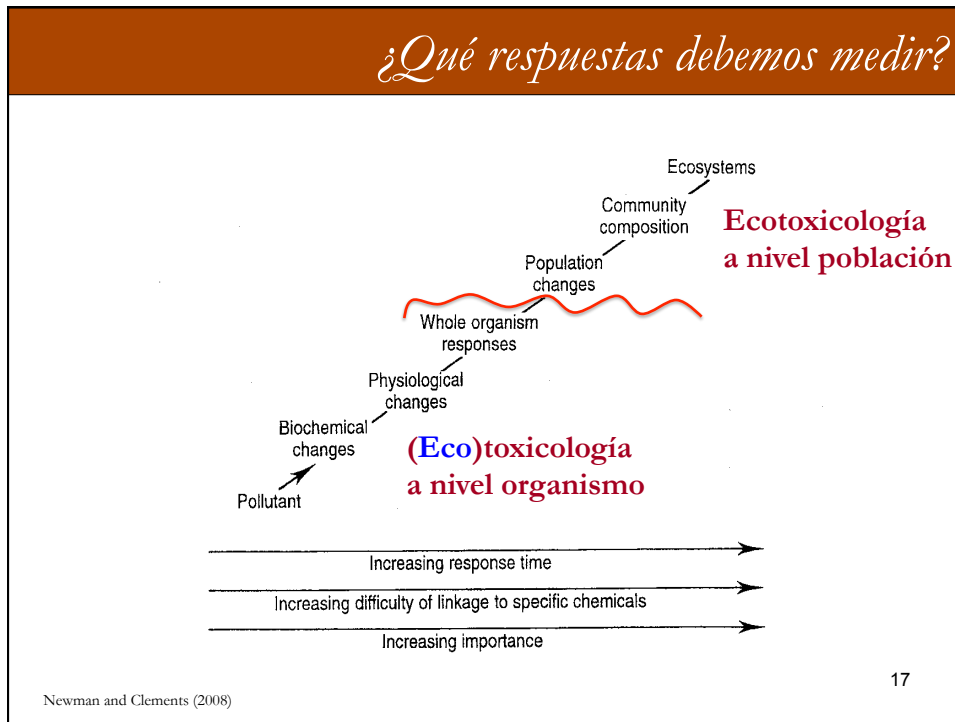
¿Qué podemos medir realmente y qué significado pueden tener nuestras medidas?

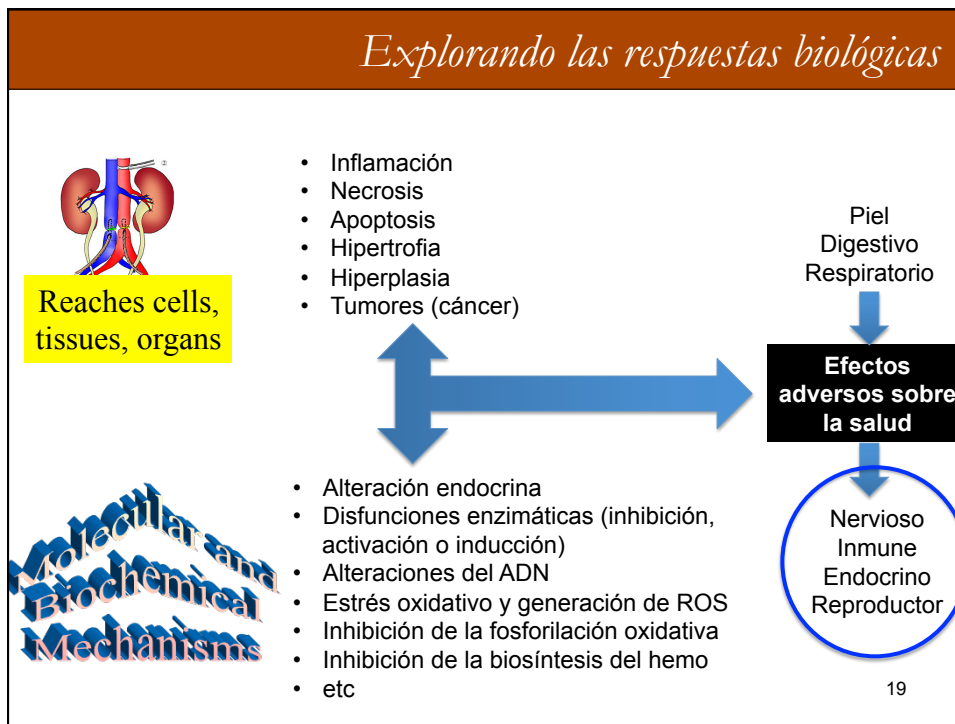


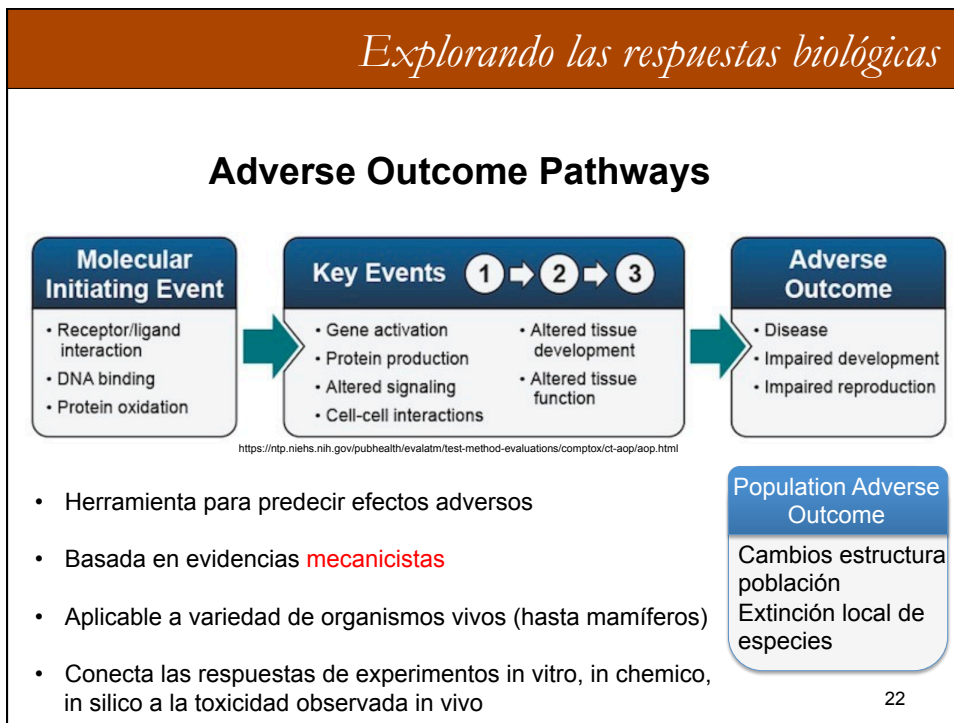
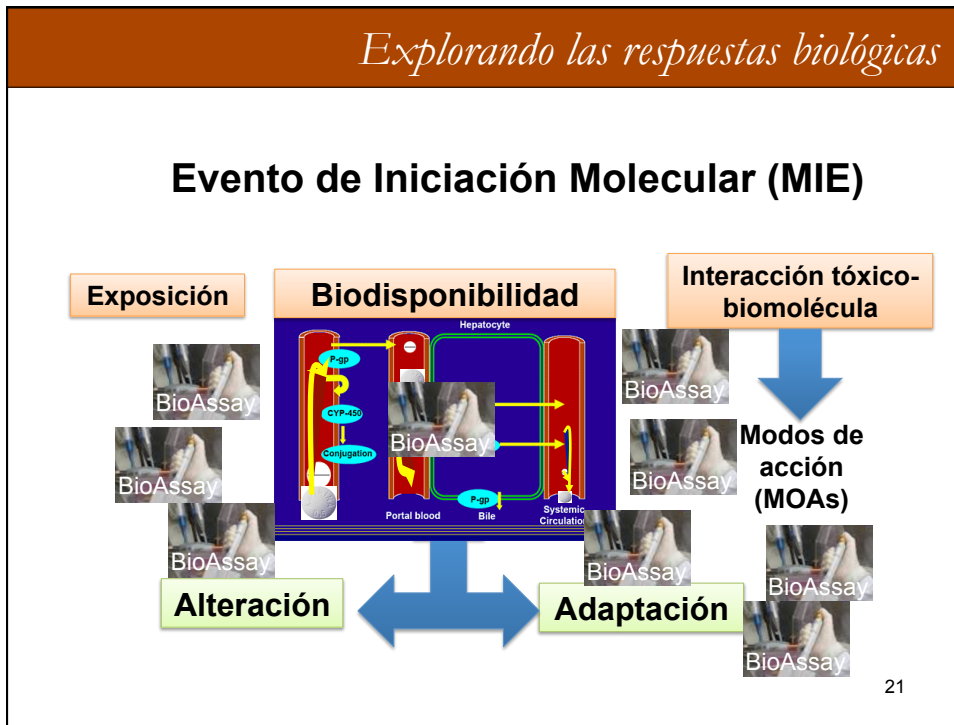
“Escenarios de la Vida real”

- Respuestas: esperadas y observadas
- Molecular - ecosistema
- Mezcla de contaminantes
- Aguas residuales tratadas - no tratadas

16







Explorando las respuestas biológicas

Ecotoxicogenómica

Investiga transcripciones, proteínas y metabolitos, para superar lagunas como la **respuesta a largo plazo** y **las relaciones entre la duración de la exposición y los posibles efectos adversos**.

The diagram illustrates the workflow of ecotoxicogenomics. It starts with 'Known Toxicants' (Oestrogen mimics, Peroxisome proliferators, and Cytochrome P450 inducers) and 'Effluent containing a putative oestrogen mimic'. These lead to 'Exposure' of a fish. This process results in 'Transcript signatures' which are then compared against a database. The comparison can result in a 'Match' or 'No Match'. A Venn diagram on the right shows the intersection of Ecology, Genomics, and Toxicology, with sub-fields like Ecogenomics (Metagenomics), Eco Toxicogenomics, and Toxicogenomics.

Snape et al 2003. Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquatic Toxicology* 67:143-154 (<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.11.011>)

Genomic Response in Daphnia to Chemical Pollutants - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/figure/Schema-of-ecotoxicogenomics_fig1_228973772 [accessed 22 Jun. 2019]

23

Ensayos para testar la ecotoxicidad

Organizaciones y organismos involucrados en ensayos de toxicidad y ecotoxicidad

- Organización para la Cooperación Económica y Desarrollo (OCDE),
- Organización Mundial de la Salud (OMS),
- Alimentación y Organización de Agricultura (FAO),
- Organización Internacional de Normalización (ISO),
- Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM),
- Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA),
- Asociación Americana de Salud Pública (APHA),
- Asociación Francesa de Normalización (AFNOR),
- Deutsches Institut für Normung (DIN),
- Asociación Italiana de Estandarización en el Sector Químico (UNICHIM).
-
-
-

24

Ensayos para testar la ecotoxicidad

De la investigación a los estándares: enfoque multifacético en bioensayos.

- Gran cantidad de protocolos estándar con acciones de normalización superpuestas. ➡ **Armonización / Estandarización / Implementar SGC**
- Faltan **validaciones** de métodos a efectos regulatorios
- En ocasiones se generan **conflictos** en términos de sensibilidad,
- **Brecha** entre la "toxicología académica" y la "toxicología regulatoria" (GLP)



Technical Guidance Document on Risk Assessment
Part III

OECD Test Guidelines for the Chemicals

Test Guidelines

The **OECD Guidelines** are a unique tool for assessing the potential effects of chemicals on human health and the environment. Accepted internationally as standard methods for safety testing, the Guidelines are used by professionals in industry, academia and government involved in the testing and assessment of chemicals (industrial chemicals, pesticides, cosmetics, etc.). These Guidelines are regularly updated with the assistance of hundreds of national experts from OECD member countries.

- > Section 1: Physical Chemical Properties
- > Section 2: Effects on Biotic Systems (Software for TG 223)
- > Section 3: Environmental Fate and Behaviour (Software for TG 305 and TG 318)
- > Section 4: Health Effects (Software for TG 455, TG 432 and TG 429)
- > Section 5: Other Test Guidelines

Information on the Mutual Acceptance of Data (MAD) system, the full list of adopted Test Guidelines, the draft TGs under public commenting rounds, the draft Guidance and review documents are available on the [Test Guidelines Programme](#).

25

Ensayos para testar la ecotoxicidad

Criterios para seleccionar un bioensayo

- Duración
- Volumen (*miniaturización?*, *automatización?*)
- Precio
- Rendimiento
- Sensibilidad (respuestas no monotónicas?)
- Especificidad
- Requisito de capacitación de operadores
- Evaluar agudo/crónico/efectos transgeneracionales
- Estudiar la toxicocinética/vías metabólicas específicas






26

Ensayos para testar la ecotoxicidad

Criterios para seleccionar un bioensayo

- Efectos clave: **genotoxicidad**, **neurotoxicidad** y **daño en células germinales**
- **In silico e in vitro** totalmente automatizados pueden servir de **screening**
- **(Q)SAR** puede **predecir** resultados adversos basados en las concentraciones efectivas.

in vitro

- iPSC differentiation
- Optimisation
- Characterisation
- Exposures
- Toxicity assays and biomarkers
- Omic analysis

in silico

- Bioinformatics
- Quantitative AOPs
- Tissue specificity
- Extrapolation to in vivo
- Individual susceptibility
- Prediction and Risk assessment

integrated

- Software
- Data management
- Modelling
- QSAR, read across
- PBPK
- Reverse Dosimetry

QSAR in Environmental Toxicology - II

27

<https://www.estiv.org/projects-activities/in3/about-in3/>

Evaluación del riesgo ambiental tradicional

Hazard Assessment: Judges the adverse effects the chemical **is able to** provoke.

Risk Assessment: Estimates **the probability** of adverse effects to occur.

Risk Assessment Process

Hazard Identification
What health problems are caused by the pollutant?

Dose-Response Assessment
What are the health problems at different exposures?

Exposure Assessment
How much of the pollutant are people exposed to during a specific time period? How many people are exposed?

Risk Characterization
What is the extra risk of health problems in the exposed population?

Uses the **intrinsic properties** of the chemical to determine which kind of adverse effects should be expected

Compares, quantitatively or qualitatively, exposure and effects determining the probability of each effect to occur.

Scientific support for regulations

NOVEDAR_Consolider

28

Evaluación del riesgo ambiental: retos y limitaciones

¿Cómo de confiable es nuestra evaluación de riesgos en los cuerpos de agua receptores?

- Los datos de ecotoxicidad disponibles son a menudo limitados, especialmente para **metabolitos y productos de transformación**.
- ERA permite el uso de **factores de incertidumbre** cuando los valores PNEC son de datos de toxicidad aguda y con un número limitado de especies.
- **Objetivo:** Predecir una concentración por debajo de la cual un efecto inaceptable probablemente no ocurra.
- **Raramente existen datos suficientes** sobre los efectos a largo plazo en varios niveles tróficos y grupos taxonómicos de un compuesto dado.
- **Efectos combinados** de todos los compuestos en muestras de agua o sedimento se evalúan utilizando un conjunto de tests de toxicidad dirigidos, p. ej. a la **toxicidad de base, actividad estrogénica y mutagénica y estrés oxidativo**.

29



30

“European Union Strategic Approach to Pharmaceuticals in the Environment”

Brussels, **11.3.2019** COM(2019)

COMMUNICATION FROM THE COMMISSION TO THE EUROPEAN PARLIAMENT, THE COUNCIL AND THE EUROPEAN ECONOMIC AND SOCIAL COMMITTEE. Brussels, 11.3.2019 COM(2019) 128 final, 12 pp.



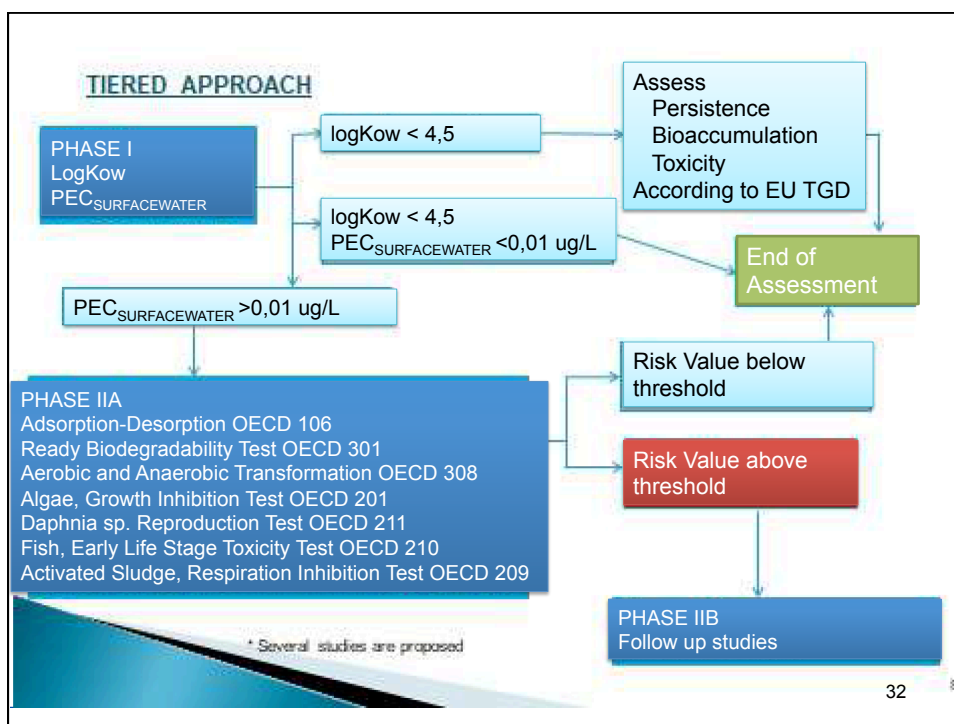
Options for a strategic approach to pharmaceuticals in the environment


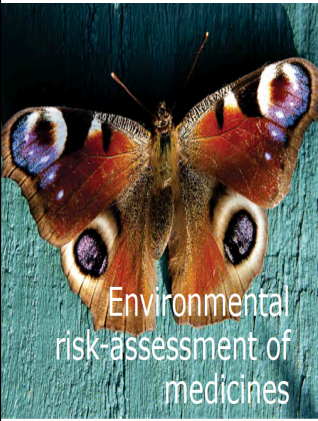
Final Report

In partnership with Milieu Ltd, INERIS and Klaus Kümmerer


July 2018

31



Environmental
risk-assessment of
medicines

An agency of the European Union 

OECD Test Guidelines for the Chemicals

Test Guidelines

The [OECD Guidelines](#) are a unique tool for assessing the potential effects of chemicals on human health and the environment. Accepted internationally as standard methods for safety testing, the Guidelines are used by professionals in industry, academia and government involved in the testing and assessment of chemicals (industrial chemicals, pesticides, cosmetics, etc.). These Guidelines are regularly updated with the assistance of hundreds of national experts from OECD member countries.

- > [Section 1: Physical Chemical Properties](#)
- > [Section 2: Effects on Biotic Systems \(Software for TG 223\)](#)
- > [Section 3: Environmental Fate and Behaviour \(Softwares for TG 305 and TG 318\)](#)
- > [Section 4: Health Effects \(Software for TG 455, TG 432 and TG 425\)](#)
- > [Section 5: Other Test Guidelines](#)

Information on the Mutual Acceptance of Data (MAD) system, the full list of adopted Test Guidelines, the draft TGs under public commenting rounds, the draft Guidance and review documents are available on the [Test Guidelines Programme](#).

33



Study for the strategy for a non-toxic environment of the 7th Environment Action Programme

Final Report








Written by Milieu Ltd, Ökopol, Risk & Policy Analysts (RPA) and RIVM
August 2017

34






Study for the strategy for a non-toxic environment of the 7th Environment Action Programme
Final Report




Written by Milieu Ltd, Okopoi, Risk & Policy Analysts (RPA) and RDM August 2017

- **Remaining gaps** in knowledge on **health and environment hazardous** properties of chemical substances;
- **Slow progress** in identification of **Substances of Very High Concern (SVHC)**, and in substitution of hazardous chemicals in industrial processes and products
- **Lack of information concerning chemicals in articles**, including imported articles, and the resulting exposure
- **Deficits** in the framework for **protection of children and other vulnerable groups**, e.g. from chemicals in products such as e.g. textiles, electronics and others

35




Study for the strategy for a non-toxic environment of the 7th Environment Action Programme
Final Report



Written by Milieu Ltd, Okopoi, Risk & Policy Analysts (RPA) and RDM August 2017


- The still **insufficient management** of a number of aspects related to **exposure and toxicity** (sometimes termed 'emerging issues'), such as:
 - combination effects,
 - cumulative,
 - low dose and long-term exposure,
 - endocrine disruptors,
 - neurotoxicity,
 - protection of children and vulnerable groups, and
 - chemicals in articles including in waste, materials recycling and the circular economy.

36



Study for the strategy for a non-toxic environment of the 7th Environment Action Programme
Final Report

- **Need for better** incentives for development of **new, non-toxic substances** as well as **non-chemical solutions**
- **Need for more** comprehensive compilation of **monitoring data at EU level** and establishment of an **early warning system**.



Written by Milieu Ltd, Ckopol, Risk & Policy Analysts (RPA) and RDM
August 2017

37

Y más ...

- Los bioensayos deben ser elegidos teniendo en cuenta el significado de las respuestas biológicas.
- Los contaminantes traza pueden causar respuestas biológicas impredecibles y no lineales.
- Se debe combinar los resultados de análisis químicos con los de bioensayos
- La variabilidad en la composición y caudal de aguas residuales afecta a cualquier evaluación de toxicidad.

38

IMIB Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria Virgen de la Arrixaca

UNIVERSIDAD DE MURCIA

1º SIMPOSIO NOVEDAR

Evaluación de la toxicidad de contaminantes traza orgánicos en aguas residuales desde una perspectiva europea

MUCHAS GRACIAS POR SU ATENCIÓN

1º SIMPOSIO NOVEDAR

 Novedar

Dr. Antonio J. García Fernández
G.I. "Toxicología y Evaluación de Riesgos"
IMIB-Arrixaca
Universidad de Murcia
www.sertoxmur.com
ajgf@um.es

2019 **PRESENCIA Y ELIMINACIÓN DE MICROCONTAMINANTES EN AGUA**

Santiago de Compostela, 13 y 14 de junio 2019

39